

## *Histomorphometric Characterization of Benign and Malignant Salivary Gland Tumors Using Methyl Green Pyronin Staining*

Safoura Seifi<sup>1</sup>,  
Farideh Feizi<sup>2</sup>,  
Masume Yasami<sup>3</sup>,  
Hemmat Gholinia<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Associate Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Oral Health Research Center, Faculty of Dentistry, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Histology, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

<sup>3</sup> Dental Student, Student Research Center, Faculty of Dentistry, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

<sup>4</sup> MSc in Statistics, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

(Received July 10, 2016 ; Accepted August 29, 2016)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Salivary gland neoplasms are heterogeneous and have low prevalence. Hematoxylin- eosin staining is used for their diagnosis, however, sometimes diagnosis may not be made by this method, so other methods are necessary. The aim of this study was to determine whether morphometry is an appropriate method in differentiating benign and malignant salivary tumors or not.

**Materials and methods:** A cross-sectional study was done (in Babol Dental School, 2015) in which 60 paraffin embedded blocks of pleomorphic adenoma, adenoid cystic carcinoma, and mucoepidermoid carcinoma were used. Two 5-micron sections were cut for hematoxylin-eosin and methyl green-pyronin staining. Images of stained slides of tumoral components were acquired at 100x magnification on an Olympus BX41, Japan Optical, in three microscopic thin-sections using lgvc camera, Tokyo, Japan which was connected to a computer. An average of 100 nuclei were examined in three microscopic fields. Morphometric and qualitative evaluation of the nucleoli (single- nucleolus and multi-nucleolar) were performed and data analysis was done applying Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests.

**Results:** The maximum area of nucleus was detected in pleomorphic adenoma and the maximum area of cytoplasm was seen in mucoepidermoid carcinoma. The highest ratio of nuclear to cytoplasmic area and the highest ratio of large to small nuclear diameter were observed in adenoid cystic carcinoma and pleomorphic adenoma, respectively. There were significant differences between three lesions in terms of morphometric characteristics mentioned ( $P < 0.001$ ).

**Conclusion:** The results indicated that histomorphometry using methyl green pyronin staining is not useful in differentiating the benign and malignant salivary gland tumors.

**Keywords:** Pleomorphic Adenoma, Mucoepidermoid Carcinoma, Adenoid Cystic Carcinoma, Histomorphometry, Methyl Green Pyronin

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (145): 143-151 (Persian).

## ارزیابی ویژگی‌های هیستومورفومتریک تومورهای شایع خوش خیم و بدخیم بزاقی با رنگ آمیزی متیل گرین پیرونین

صفورا سیفی<sup>۱</sup>  
فریده فیضی<sup>۲</sup>  
معصومه یاسمی<sup>۳</sup>  
همت قلی‌نیا<sup>۴</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** نئوپلاسم‌های غدد بزاقی دارای شیوع کم و هتروژن بوده و جهت تشخیص آن‌ها رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین انجام می‌شود ولی گاهی اوقات با این رنگ آمیزی قابل تشخیص نیستند و از روش‌های کمکی استفاده می‌گردد. از آن‌جا که تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با ارزش مورفومتری در افتراق تومورهای خوش خیم از بدخیم بزاقی صورت نگرفته است لذا این مطالعه با این هدف انجام شده است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی-تحلیلی به روش مقطعی که در سال ۱۳۹۴ در دانشکده دندان پزشکی بابل انجام گردید از ۶۰ بلوک پارافینه مربوط به پلئومورفیک آدنوما، آدنوئیدسیستیک کارسینوما و موکوپیدرموئید کارسینوما استفاده شد. دو برش ۵ میکرونی برای رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و متیل گرین پیرونین زده شد. تصاویری از اسلایدهای رنگ آمیزی شده با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر با میکروسکوپ (Olympus (Bx41, Japan Optical) توسط دوربین (lgvc, Tokyo, japan) متصل به کامپیوتر در ۳ مقطع میکروسکوپی از اجزاء تومورال به عمل آمد و به طور متوسط ۱۰۰ هسته در ۳ فیلد میکروسکوپی بررسی شد. ارزیابی مورفومتری و بررسی کیفی هستک‌ها (تک هستکی و چند هستکی) انجام شد و نتایج با آنالیزهای آماری Mann-whitney و kruskal-wallis تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** بیش‌ترین اندازه مساحت هسته در پلئومورفیک آدنوما، بیش‌ترین اندازه مساحت سیتوپلاسم در موکوپیدرموئید کارسینوما، بیش‌ترین نسبت هسته به سیتوپلاسم در آدنوئیدسیستیک کارسینوما و بیش‌ترین نسبت قطر بزرگ به کوچک هسته در پلئومورفیک آدنوما دیده شد. اختلاف آماری معنی‌داری از نظر ویژگی‌های مورفومتری فوق بین سه ضایعه دیده شد ( $p < 0/001$ ).

**استنتاج:** استفاده از هیستومورفومتری به همراه رنگ آمیزی متیل گرین پیرونین روش کمکی مناسبی در تمایز تومورهای خوش خیم از بدخیم بزاقی نمی‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** پلئومورفیک آدنوما، موکوپیدرموئید کارسینوما، آدنوئیدسیستیک کارسینوما، هیستومورفومتری، متیل گرین پیرونین

### مقدمه

تومورهای غدد بزاقی نئوپلاسم‌هایی با شیوع نسبتاً کم و هتروژن بوده که بخش مهمی از پاتولوژی فک و صورت را تشکیل می‌دهند. شایع‌ترین تومور خوش خیم غده بزاقی پلئومورفیک آدنوما و سپس تومور وارترین

**مؤلف مسئول: معصومه یاسمی** - بابل: دانشگاه علوم پزشکی بابل، مرکز پژوهش‌های دانشجویی دانشکده دندان پزشکی

۱. دانشیار، گروه آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت، مرکز تحقیقات سلامت و بهداشت دهان دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۲. استادیار، گروه بافت‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۳. دانشجوی دندانپزشکی، مرکز پژوهش‌های دانشجویی، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۲۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۴/۲۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۶/۸

است که بهترین روش درمان آن جراحی بوده و معمولاً پیش آگهی بیمار عالی است. شایع ترین تومورهای بدخیم غدد بزاقی، موکوپیدرومئید کارسینوما و سپس آدنوئید سیستیک کارسینوما می باشند که دارای رفتار تهاجمی و تمایل به متاستاز می باشند. موکوپیدرومئید کارسینوما به دلیل درجات مختلف تمایز دارای رفتار بیولوژیکی متفاوتی است. درمان آن جراحی با مارژین وسیع به همراه رادیوتراپی بوده و پیش آگهی آن به درجه تمایز تومور بستگی دارد. در آدنوئید سیستیک کارسینوما به دلیل تمایل تومور به عود موضعی و در نهایت متاستاز دور دست، جراحی اکسیژنال، رادیوتراپی مکمل و شیمی درمانی به کار می رود و در مجموع پیش آگهی ضعیف است (۲۱). تمایز تومورهای بدخیم از خوش خیم بزاقی معمولاً براساس ویژگی های بالینی و هیستوپاتولوژی آن ها با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین صورت می گیرد. در مواردی استفاده از رنگ آمیزی اختصاصی ایمونوهیستوشیمی می تواند کمک کننده باشد (۳) اما در ارتباط با تومورهای غدد بزاقی معمولاً ایمونوهیستوشیمی کاربرد کمی در تشخیص آن ها دارد (۴) و در برخی موارد ممکن است پاتولوژیست ها در ارتباط با درجات مختلف تمایز تومورهای بدخیم بزاقی با یکدیگر اختلاف عقیده داشته باشند (۵۳).

متیل گرین پیرونین یک روش رنگ آمیزی جهت رنگ پذیری انتخابی و آسان اسیدنوکلئیک بوده و به طور اختصاصی به داکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) باند شده به طوری که هسته به رنگ سبز در می آید. پیرونین اختصاصی برای RNA بوده و هستک قرمز می گردد (۶). هیستومورفومتری عبارتند از ارزیابی ویژگی های هیستوپاتولوژی یک بافت شامل اندازه (مساحت، قطر) هسته، اندازه سیتوپلاسم، ضخامت اپی تلیوم، ویژگی های نسج همبندی، تعداد عروق خونی، سلول های آماسی و غیره که توسط دوربین متصل به کامپیوتر و نرم افزار مخصوص بررسی می گردد و روش دقیق تری نسبت به بررسی هیستوپاتولوژی اسلایدهای

میکروسکوپی است (۷). از آن جا که تا به امروز مطالعه ای در زمینه استفاده از هیستومورفومتری به همراه رنگ آمیزی متیل گرین پیرونین به عنوان روش کمکی در تمایز تومورهای خوش خیم از بدخیم بزاقی و یا در افتراق درجات مختلف تمایز تومورهای بدخیم بزاقی صورت نگرفته است لذا مطالعه حاضر با این هدف انجام گرفته است.

## مواد و روش ها

این مطالعه به صورت توصیفی - تحلیلی به روش مقطعی در سال ۱۳۹۴ در دانشکده دندان پزشکی بابل انجام شد. ۶۰ بلوک پارافینه مربوط به آرشیو دانشکده دندان پزشکی بابل و سایر مراکز آموزشی - بیمارستانی شامل ۲۰ بلوک مربوط به نئوپلاسم خوش خیم بزاقی (پلئومورفیک آدنوما) و ۴۰ بلوک پارافینه نئوپلاسم بدخیم بزاقی (۲۰ مورد آدنوئیدسیستیک کارسینوما و ۲۰ مورد موکوپیدرومئید کارسینوما) انتخاب شدند. اطلاعات بالینی آن ها شامل سن، جنس و نوع غده بزاقی خارج شد و در جداولی ثبت گردید. جهت تایید تشخیص هیستوپاتولوژی، انتخاب بلوک های مناسب و هم چنین تعیین درجه تمایز موکوپیدرومئید کارسینوما از بلوک های پارافینه دو برش ۵ میکرونی برای رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و متیل گرین پیرونین زده شد. پس از مشاهده توسط پاتولوژیست دهان و تایید تشخیص، بلوک های پارافینه مربوط به نئوپلاسم های خوش خیم و بدخیم بزاقی که جهت ورود به مطالعه مناسب تشخیص داده شدند، در نظر گرفته شدند. هم چنین درجه تمایز موکوپیدرومئید کارسینوما براساس معیارهای Brandwein (۸) تعیین شد. نئوپلاسم های بدخیم براساس رفتار بیولوژیکی در دو گروه بدخیمی با درجه بالا شامل موکوپیدرومئید کارسینوما grade III و آدنوئیدسیستیک کارسینوما و بدخیمی با درجه پایین شامل موکوپیدرومئید کارسینوما grade I طبقه بندی شدند (۲). در رنگ آمیزی متیل گرین پیرونین

آدنوئیدسیستیک کارسینوما و ۲۰ مورد موکوپیدرموئید کارسینوما بود (جدول شماره ۱). هم‌چنین ۱۱ مورد از موکوپیدرموئید کارسینوما ها دارای grade I و ۹ مورد دارای grade III بودند. نمونه‌های آدنوئیدسیستیک کارسینوما هم شامل ۹ مورد نوع tubular، ۷ مورد نوع solid و ۴ مورد نوع cribriform بودند.

جدول شماره ۱: ارزیابی ویژگی‌های بالینی (سن، جنس، نوع غده) در تومورهای شایع خوش خیم و بدخیم بزاقی

نوع تومور	میانگین سنی (انحراف معیار: میانگین)	جنس	نوع غده بزاقی
پلئومورفیک آدنوما	۴۴/۲±۹/۸۵	۱۳ زن	۶ غدد بزاقی اصلی
موکوپیدرموئید کارسینوما	۴۹±۱۵/۳۷	۱۲ زن	۱ غدد بزاقی اصلی
آدنوئیدسیستیک کارسینوما	۴۸/۲۶±۱۴/۹۰	۱۱ زن	۵ غدد بزاقی اصلی
		۹ مرد	۱۵ غدد بزاقی فرعی

آنالیز kruskal-wallis نشان داد که بین ویژگی‌های مورفومتري (اندازه سطح مقطع هسته، سیتوپلاسم ( $\mu\text{m}^2$ ))، نسبت اندازه هسته به سیتوپلاسم و نسبت قطر بزرگ به کوچک هسته) در تومورهای شایع خوش خیم و بدخیم بزاقی اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد ( $p < 0/001$ ) به طوری که میانگین مساحت سیتوپلاسم در موکوپیدرموئید کارسینوما، میانگین مساحت هسته و نسبت قطر بزرگ به کوچک هسته در پلئومورفیک آدنوما و نسبت اندازه هسته به سیتوپلاسم در آدنوئیدسیستیک کارسینوما بیش‌تریش‌ترین بود (جدول شماره ۲).

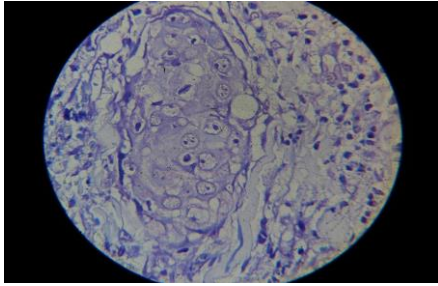
ارتباط آماری معنی‌داری بین رفتار تهاجمی و هم‌چنین درجه تمایز تومورهای شایع غدد بزاقی با ویژگی‌های مورفومتري وجود نداشت (جدول شماره ۳ و ۲).

با آنالیز Mann-whitney در مقایسه دو به دوی تومورهای بزاقی تفاوت مساحت سلول در پلئومورفیک آدنوما و موکوپیدرموئید کارسینوما معنی‌دار نبود ( $p = 0/46$ ). هم‌چنین نسبت قطر بزرگ به کوچک هسته در موکوپیدرموئید کارسینوما و آدنوئیدسیستیک کارسینوما تفاوت آماری معنی‌داری نداشت ( $p = 0/14$ ). در سایر ویژگی‌های مورفومتري تفاوت آماری معناداری وجود

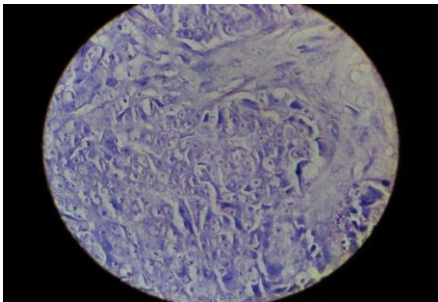
(Merk, Darmstadhto, Germany) ابتدا متیل‌گرین ۱/۵g و پیرونین ۲/۵g در ۲۰۰ ml آب حل شد و سپس با ۶۰ میلی‌لیتر آب و ۲۰ ml با فرسفات (۱/۱۰) PH=۵ ترکیب شده و به محلول قبلی اضافه شد. اسلایدها در یک محلول الکلی (۲۵ درصد اتانول و ۷۵ درصد بوتانل) به مدت ۲ دقیقه قرار گرفته و سپس ۲ دقیقه در گزین غوطه‌ور شدند و سرانجام اسلایدها با چسب انتلان پوشیده شدند (۳). ابتدا تصاویری از اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده با متیل‌گرین پیرونین با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر با میکروسکوپ (Bx41, Japan Optical, Olympus) توسط دوربین (Igc, Tokyo, japan) متصل به کامپیوتر در ۳ مقطع میکروسکوپی پشت سرهم با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر به اندازه  $768 \times 1024$  میلی‌متر و رزولوشن ۱۷ درصد از اجزاء تومورال به عمل آمد و به طور متوسط ۱۰۰ هسته در ۳ فیلد میکروسکوپی بررسی شد. در مجموع ۱۸۰ تصویر میکروسکوپی تهیه شد و سپس تکنیک هیستومورفومتري مطابق با روش shabana (۹) انجام شد. جهت ارزیابی هیستومورفومتري از کامپیوتر متصل به دوربین و از نوع سیستم آنالیز (Motic plus2) استفاده شد. اندازه سطح مقطع هسته، سیتوپلاسم ( $\mu\text{m}^2$ ) و نسبت اندازه هسته به سیتوپلاسم، نسبت قطر بزرگ به کوچک هسته (Ferret ratio) و شکل هسته محاسبه شد و نتایج نهایی به صورت انحراف معیار  $\pm$  میانگین گزارش شد. هم‌چنین بررسی کیفی هستک‌ها (تک-چند هستکی) در ۳ فیلد میکروسکوپی پشت سرهم با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر در هر اسلاید انجام شد. در صورت مشاهده روی هم‌افتادگی سلول‌ها و مشخص نبودن غشاء آن‌ها، در مطالعه وارد نشدند. اطلاعات نمونه‌ها در SPSS ۲۲ وارد شدند و با تست‌های آماری kruskal-wallis و Mann-whitney تجزیه و تحلیل شدند.

## یافته‌ها

از بین ۶۰ نمونه انتخاب شده در این بررسی، ۲۰ مورد مربوط به پلئومورفیک آدنوما، ۲۰ مورد



تصویر شماره ۲: رنگ آمیزی متیل گرین پیرونین در موکوپیدرموئید کارسینوما (X۱۰۰). فلش‌ها نمایانگر هسته‌های چند هستکی می‌باشند.



تصویر شماره ۳: رنگ آمیزی متیل گرین پیرونین در آدنوییدسیستیک کارسینوما (X۱۰۰). فلش‌ها نمایانگر هسته‌های چند هستکی می‌باشند.

داشت. هم‌چنین در بررسی کیفی هستک‌ها با حذف هسته‌های تیره که در آن‌ها هستک مشخص نبود، نتایج زیر حاصل شد:

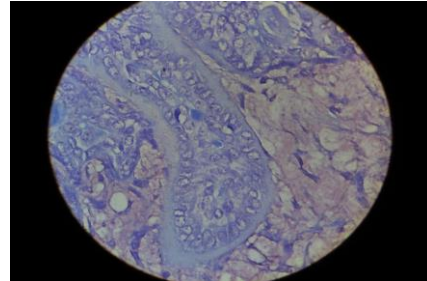
- در بررسی اسلایدهای میکروسکوپی پلئومورفیک آدنوما تقریباً همه سلول‌ها تک هستکی و به‌ندرت سلول چند هستکی مشاهده شد. شکل هسته دارای تنوع زیادی بود اما بیش‌تر هسته‌ها حالت کشیده داشتند.

در بررسی اسلایدهای میکروسکوپی موکوپیدرموئید کارسینوما حدود ۷۰ درصد سلول‌ها چند هستکی و ۳۰ درصد سلول‌ها تک هستکی بودند که در هسته‌های تک هستکی هم اندازه هستک بزرگ بود. هسته‌ها به شکل بیضی و زاویه دار مشاهده شدند.

- در بررسی اسلایدهای میکروسکوپی آدنوییدسیستیک کارسینوما حدود ۵۵ درصد سلول‌ها چند هستکی و ۴۵ درصد سلول‌ها تک هستکی بودند. در بیش‌تر سلول‌ها هسته‌ها تقریباً کروی مشاهده شدند (تصاویر شماره ۱ تا ۳).

## بحث

از نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که اگر چه از نظر ویژگی‌های مورفومتری اختلاف آماری معنی‌داری بین تومورهای شایع خوش خیم و بدخیم بزاقی مشاهده شد ولی این ویژگی‌ها مرتبط با رفتار تهاجمی ضایعات فوق نبود. به طوری که بیش‌تر بیش‌ترین میزان مساحت هسته در پلئومورفیک آدنوما، بیش‌تر بیش‌ترین میزان مساحت



تصویر شماره ۱: رنگ آمیزی متیل گرین پیرونین در پلئومورفیک آدنوما (X۱۰۰). فلش‌ها نمایانگر هسته‌های تک هستکی می‌باشند.

جدول شماره ۲: ارزیابی ویژگی‌های مورفومتری تومورهای شایع خوش خیم و بدخیم بزاقی با رنگ آمیزی متیل گرین پیرونین

گروه	مساحت سیتوپلاسم (انحراف معیار± میانگین)	مساحت هسته (انحراف معیار± میانگین)	نسبت مساحت هسته به سیتوپلاسم (انحراف معیار± میانگین)	نسبت قطر بزرگ به کوچک هسته (انحراف معیار± میانگین)
پلئومورفیک آدنوما	۴۶۱۵/۳۵±۱۵۹۶/۶۵	۱۱۱۴/۴۷±۶۳۵/۶۷	۰/۲۴±۰/۱۲	۱/۹۵±۰/۷۸
موکوپیدرموئید کارسینوما	۴۶۹۹/۴۰±۲۰۹۴/۰۳	۹۹۱/۴۹±۷۰۰/۲۳	۰/۲۲±۰/۱۴	۱/۶۰±۰/۵۱
آدنوییدسیستیک کارسینوما	۲۶۷۲/۳۵±۱۲۰۶/۸۶	۷۳۷/۳۹±۴۰۱/۰۸	۰/۲۸±۰/۱۱	۱/۴۷±۰/۳۵
سطح معنی داری	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

جدول شماره ۳: ارزیابی ویژگی‌های مورفومتری تومورهای شایع بزاقی با درجه بدخیمی بالا و پایین با رنگ آمیزی متیل گرین پیرونین

گروه	مساحت سیتوپلاسم (انحراف معیار± میانگین)	مساحت هسته (انحراف معیار± میانگین)	نسبت مساحت هسته به سیتوپلاسم (انحراف معیار± میانگین)	نسبت قطر بزرگ به کوچک هسته (انحراف معیار± میانگین)
درجه بدخیمی بالا	۳۶۶۱/۱۴±۱۶۸۷/۹۸	۷۴۷/۵۷±۵۴۱/۹۹	۰/۲۲±۰/۱۱	۱/۴۲±۰/۳۱
درجه بدخیمی پایین	۵۹۷۰/۱۲±۲۷۸۰/۱۸	۱۰۵۲/۰۰±۴۳۱/۳۲	۰/۱۹±۰/۰۹	۱/۶۹±۰/۴۱
سطح معنی داری	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

سیتوپلاسم در موکوپایدرموئید کارسینوما، بیش تر بیش ترین میزان نسبت هسته به سیتوپلاسم در آدنوئیدسیستیک کارسینوما و بیش تر بیش ترین اندازه قطر بزرگ به کوچک هسته در پلئومورفیک آدنوما وجود داشت. از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای در زمینه استفاده از هیستومورفومتري و یا به طور اختصاصی رنگ آمیزی متیل گرین پیرونین به عنوان روش کمکی در تمایز تومورهای بزاقی صورت نگرفته که از نکات مثبت این مطالعه استلذا برای نگارش بحث مطالعه یاد شده محدودیت‌هایی وجود داشته و امکان مقایسه مستقیم یافته‌های این مطالعه با مقاله‌های دیگر وجود ندارد. اغلب در مطالعات گذشته از نسبت مساحت هسته به سیتوپلاسم به عنوان مشخصه اصلی تغییرات بدخیمی نام برده می‌شد (۱۱،۱۰) در صورتی که در مطالعه حاضر این نسبت در پلئومورفیک آدنوما بیش تر از موکوپایدرموئید کارسینوما بود. به عبارتی ارتباطی بین رفتار تهاجمی تومورهای بزاقی با ویژگی‌های مورفومتري دیده نشد.

در مطالعه Khandelwal و همکاران نسبت هسته به سیتوپلاسم با رنگ آمیزی پاپانیکولانو در نمونه‌های سیتولوژی مخاط دهان افراد مصرف کننده تنباکو کمتر از افراد مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی بود (۱۱) و به نظر می‌رسد مورفومتري روش ارزشمندی در افتراق ضایعات پیش بدخیم ناشی از تنباکو از کارسینوم سلول سنگفرشی باشد که در تضاد با نتایج مطالعه حاضر است. محتشم و همکاران ویژگی‌های سیتومورفومتريک هسته و هستک را در مخاط نرمال، مخاط دیسپلاستیک و کارسینوم سلول سنگفرشی به وسیله رنگ آمیزی متیل گرین پیرونین بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که این روش رنگ آمیزی به همراه مورفومتري روش کمکی ارزشمندی جهت ارزیابی تغییرات هسته و هستک در ضایعات پیش بدخیم حفره دهان است (۳).

Metgud و همکاران مطرح کردند که رنگ آمیزی متیل گرین پیرونین روش ارزشمندی جهت ارزیابی هم زمان DNA و RNA در کارسینوم سلول سنگفرشی و

دیسپلازی اپیتلیالی است. این روش ساده بوده و جهت معاینات معمول روزانه نسبت به رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اؤزین و feulgen روش مفیدتری است (۱۲). این گونه به نظر می‌رسد که پارامترهای مورفومتريک جهت تمایز ضایعات پیش بدخیم از بدخیم اپی تلیالی مفید باشد اما در ارتباط با تومورهای بزاقی روش کمکی ارزشمندی نمی‌باشد. البته اگرچه تومورهای بزاقی ممکن است در نمای میکروسکوپی شباهت‌های زیادی با هم داشته باشند و گاهی تمایز آن‌ها بسیار مشکل باشد اما ایمونوهیستوشیمی و مورفومتري روش‌های کمکی ارزشمندی در افتراق آن‌ها نمی‌باشند (۴).

سیفی و همکاران به ارزیابی پارامترهای مورفومتريک در تومور ادنوئیدیک کراتوسیست و کیست دنتی ژروس با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اؤزین پرداختند. ایشان افزایش نسبت هسته به سیتوپلاسم، تراکم عروق خونی و افزایش نسبت قطر بزرگ به کوچک هسته را در تومور ادنوئیدیک کراتوسیست نسبت به کیست دنتی ژروس مطرح کردند و مورفومتري را روش ارزشمندی در توجیه عود رفتار تهاجمی کراتوسیست بیان کردند که با نتایج مطالعه حاضر در تضاد است (۱۳).

در مطالعه Karpinska- kaczmarczyk و همکاران ویژگی‌های مورفومتري هسته و هستک در تومورهای پستان و ارتباط آن با طول عمر کلی بیماران ارزیابی شد. ایشان گزارش نمودند که ارتباط مثبتی بین پلی مورفیسم هسته و تعداد هستک‌های موجود در هسته سلول‌های تومورال و relapse-free survival rate وجود دارد اما ارتباطی با طول عمر کلی بیماران مشاهده نشد. هم چنین برخی از پارامترهای مورفومتريک هسته و هستک در کارسینوم تهاجمی پستان را مرتبط با فاکتورهای بالینی-پاتولوژی مطرح کردند به طوری که مساحت هسته، تعداد هستک‌ها و پلی مورفیسم هسته در کارسینوم با پروليفراسیون کم و بیان گیرنده استروژن کم تر از کارسینوما با پروليفراسیون بالا و عدم بیان گیرنده استروژن بود (۱۴).

بلو و متیل گرین پیرونین جهت مشاهده و بررسی پارامترهای هسته و هستک به ویژه در ضایعات اپی تلایالی استفاده می‌گردد (۳).

سیفی و همکاران با رنگ آمیزی نیترات نقره و تعداد نقاط رنگ پذیر شده رفتار تهاجمی آملوبلاستوما را نسبت به ضایعات ادنتوژنیک دیگر توجیه کردند (۱۸) اما مشکل رنگ آمیزی نیترات نقره این است که گاهی رسوبات رنگ پذیری به جای نقاط رنگ پذیر شده با میکروسکوپ نوری محاسبه می‌گردد.

Pyronin جهت رنگ پذیری هستک و RNA و تولوئیدین بلو، azure B، متیل گرین برای تشخیص DNA به کار می‌روند اما متیل گرین پیرونین روش رنگ آمیزی ارزشمندی در تمایز DNA از RNA می‌باشد به طوری که DNA سبز رنگ و RNA قرمز می‌شود. هم چنین روش رنگ آمیزی متیل گرین پیرونین ساده و نسبتاً ارزان بوده (۲۰، ۱۹، ۶)، لذا در مطالعه حاضر جهت بررسی کلیه ویژگی‌های مورفومتری تومورهای بزاقی از این روش رنگ آمیزی استفاده شد.

در پایان می‌توان نتیجه گیری کرد که مورفومتری و رنگ آمیزی متیل گرین پیرونین بر خلاف ضایعات اپی تلایالی در تومورهای غدد بزاقی روش کمکی ارزشمندی در تشخیص افتراقی میکروسکوپی آنها در موارد مشکل ساز نمی‌باشد و با این روش نمی‌توان تومورهای خوش خیم از بدخیم بزاقی را افتراق داد و ویژگی‌های مورفومتری ارتباطی با درجه بدخیمی و رفتار تهاجمی تومورهای بزاقی ندارد.

### سپاسگزاری

این مطالعه یک پایان نامه دانشجویی در دانشکده دندان پزشکی بابل بوده است که هزینه‌های آن توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل تأمین شده است. نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از خانم ابراهیم پور و آقای نوری به علت رنگ کردن نمونه‌ها به عمل می‌آورند.

Sneha Singh و همکاران به بررسی ویژگی‌های مورفومتری در لکوپلاکیای دهانی، فیروز زیرمخاطی دهانی و مخاط نرمال دهانی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین پرداختند و بیان کردند که این ویژگی‌ها از فیروز زیرمخاطی تا مخاط نرمال دهانی کاهش می‌یابد. در نتیجه هیستومورفومتری یک روش کمی مناسب برای تشخیص ضایعات با پتانسیل بدخیمی می‌باشد (۱۵). Mohanta و همکاران به بررسی ویژگی‌های مورفومتری سلول و هسته در کارسینوم سلول سنگفرشی با رنگ آمیزی پاپانیکولاو پرداختند. ایشان کاهش پارامترهای سلول و افزایش پارامترهای هسته را در سلول‌های سنگفرشی غیر کراتینیزه نسبت به سلول نرمال مطرح کردند و مورفومتری را به عنوان روش مناسبی برای تشخیص زود هنگام کارسینوم سلول سنگفرشی بیان کردند (۱۶).

Udayashankar و همکاران بیان کردند که ویژگی‌های مورفومتری سلول و هسته به ترتیب در کارسینوم سلول سنگفرشی، مصرف کنندگان تنباکو و افراد نرمال کاهش می‌یابد و می‌توان از مورفومتری برای تشخیص تغییرات بدخیمی قبل از ظهور بالینی ضایعات استفاده کرد (۱۷).

در مطالعه حاضر اگرچه در ارتباط با ویژگی‌های مورفومتری و درجه تمایز تومورهای بدخیم بزاقی در برخی پارامترها اختلاف آماری معنی داری وجود دارد اما روند منطقی با رفتار تهاجمی ضایعات بزاقی نمی‌توان در نظر گرفت. با توجه به این که کاربرد مورفومتری دارای نتایج مثبتی در ضایعات اپیتلیالی و پستان می‌باشد اما در ارتباط با تومورهای غده بزاقی نتایج منطقی دیده نشد. بنابراین این چنین می‌توان بیان کرد که نتایج مورفومتری بر حسب نوع تومور (اپیتلیالی، مزانشیمی، اپیتلیالی مزانشیمی) و نوع استروما متفاوت می‌باشد و شاید عدم مثبت بودن نتایج به دلیل شباهت بسیار زیاد تومورهای غده بزاقی از نظر نمای هیستوپاتولوژی آنها باشد. از روش‌های رنگ آمیزی متعددی مانند pyronin Y، azure B، feulgen، AgNOR، تولوئیدین

## References

1. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and Maxillofacial pathology. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Saunders; 2009.
2. Regezi J, Scuba J, Jordan CK. Oral pathology, Clinical pathologic correlations. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders; 2008.
3. Mohtasham N, Mahdavi-Shahri N, Salehinejad J, Ejtehad H, Torabi-Parizi M, Ghazi N. Detection of nucleoproteins in squamous cell carcinoma, and dysplastic and normal mucosa in the oral cavity by methyl green-pyronin staining. *J Oral Sci* 2010; 52(2): 239-243.
4. Nagao T, Sato E, Inoue R, Oshiro H, H Takahashi R, Nagai T, et al. Immunohistochemical analysis of salivary gland tumors: application for surgical pathology practice. *Acta Histochem Cytochem* 2012; 45(5): 269-282.
5. Zarbo RJ. Salivary gland neoplasia: a review for the practicing pathologist. *Mod pathol* 2002; 15(3): 298-323.
6. Prentø P, Lyon HO. Methyl green-pyronin Y staining of nucleic acids: studies on the effects of staining time, dye composition and diffusion rates. *Biotech Histochem* 2003; 78(1): 27-33.
7. Günhan O, Yildiz E, Karslıoğlu Y, Aydıntuğ Y, Doğan N, Celasun B. Nuclear morphometric features of epithelial cells lining keratocysts. *Anal Quant Cytol Histol* 2003; 25(2): 85-89.
8. Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, Hille JJ, Wang B, Fahmy A, et al. Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(7): 835-845.
9. Shabana AH, El-Labban NG, Lee KW, Kramer IR. Morphometric analysis of suprabasal cells in oral white lesions. *J Clin Pathol* 1989; 42(3): 264-270.
10. Samsonidze GG. Nucleo-cytoplasmic and nucleolo-nuclear ratios in basal cells of the epithelium of the regenerating gingival mucous membrane. *Bull Exp Biol Med* 1970; 70(3): 1058-1059.
11. Khandelwal S, Solomon MC. Cytomorphological analysis of keratinocytes in oral smears from tobacco users and oral squamous cell carcinoma lesions—A histochemical approach. *Int J Oral Sci* 2010; 2(1): 45-52.
12. Metgud R, Gupta K, Chandra U. Simultaneous quantification of nucleoproteins and comparison of methyl green-pyronin Y and Feulgen staining in sections of oral squamous cell carcinoma, dysplastic lesions and normal mucosa. *Biotech Histochem* 2014; 89(4): 267-272.
13. Seifi S, Feizi F, Nafarzadeh S', Avesta A. Histomorphometric comparative evaluation of keratocystic odontogenic tumor and dentigerous cyst. *Daneshvar* 2011; 18(93): 43-50 (Persian).
14. Karpinska- kaczmarczyk K, Kram A, kaczmarczyk M, Domagula W. Prognostic significance of morphometric parameters of nucleoli and nuclei of invasive ductal breast carcinomas. *Pol J Pathol* 2008; 60(3): 124-129.
15. Singh S, Shyamala K, Girish HC, Murgod S, Rani V, Prakash R. Cytomorphometric analysis of basal cells: An objective mean for the diagnosis of oral leukoplakia and oral submucous fibrosis. *RJPBCS* 2015; 6(5): 597-603.
16. Mohanta A, Prafulla KM. Cytomorphometric Analysis of Non-keratinized Malignant Squamous Cells in Exfoliated Cytosmears of

- Human Oral Neoplasm. *J Carcinog Mutagen* 2016; 7(1): 2-8.
17. Udayashankar U, Guduru VS, Ananthaneni A, Ramisetty SD, Kuberappa PH, Namala S. Evaluation of cytomorphometric changes in tobacco users and diagnosed oral squamous cell carcinoma individuals. *J of Cytol* 2016; 33(3): 125-129.
18. Seifi S, Shafigh E, Allaie A. Quantitative and qualitative analysis of argyrophilic nuclear organizer regions in follicular cyst, keratocystic odontogenic tumor and ameloblastoma. *J Canc Res Therap* 2011; 7(3): 280-285.
19. Ehrig T, Abdulkadir SA, Dintzis SM, Milbrandt J, Watson MA. Quantitative amplification of genomic DNA from histological tissue sections after staining with nuclear dyes and laser capture microdissection. *J Mol Diagn* 2001; 3(1): 22-25.
20. Li B, Wu Y, Gao XM. Pyronin Y as a fluorescent stain for paraffin sections. *Histochem J* 2002; 34(6): 299-303.