

# К вопросу о формировании цвета цитоплазмы клеток в процессе окраски по Папаниколау.

А.В. Безруков, М.В. Кузнецов, ООО ЭМКО (Москва).

## Введение

Окраска цитологических препаратов по Папаниколау [5,6] - общепризнанный метод, широко применяемый при скрининге рака шейки матки, в цитологической диагностике.

К сожалению, методика довольно сложна и многостадийна. В процессе подготовки препарата, клетки ткани подвергаются воздействию различных красок и технологических жидкостей, окраска структурных составляющих препарата – ядра и, в особенности, цитоплазмы, многократно изменяется. На первом этапе осуществляется окраска гематоксилином (квасцовым гематеином). (Мы будем рассматривать только прогрессивный вариант окраски, при котором процесс окраски прерывается во время прогрессирования - на стадии, когда ядра клеток не перекрашены, а цитоплазма почти не окрашена). Окраска в гематоксилине прерывается промывкой, затем следует отсинивание в щелочной среде. После отсинивания и промывки, следует окраска в первой цитоплазматической краске OG6 (на основе красителя оранжевый G), быстро прокрашивающей цитоплазму всех клеток. Далее, после промежуточной промывки, следует окраска в комбинированной краске «ЕА» (на основе красителей Эозин Y, светло-зеленый SF, и фосфорно-вольфрамовой или фосфорно-молибденовой кислоты), которая служит протравой и обеспечивает дифференциальную окраску цитоплазмы разных клеток в розовый и зелёный цвет [2, стр. 169]. После окраски в ЕА только кератинизированные клетки и чешуйки сохраняют жёлтый цвет, цитоплазма остальных клеток окрашивается в розовый и зелёный цвета. Заканчивается приготовление препарата промывками в ваннах со спиртом, просветлением и заключением под покрывное стекло.

В некоторых работах, в частности, в [3, стр. 166, 169-171], смена цвета цитоплазмы при окраске по Папаниколау рассматривается, как процесс вытеснения одного красителя другим. Т.е. считается, что оранжевый краситель вытесняется эозином, в последующем эозин в части клеток вытесняется светло-зелёным SF. При микроспектрофотометрических исследованиях результат окрашивания рассматривается как результирующая вкладов от разных красителей [1,4]. Не отрицая возможности вытеснения молекул одного красителя молекулами другого, в работе сделана попытка экспериментально показать возможность формирования окраски структурных элементов препарата за счёт наложения результатов окрашивания разными красками (красителями).

Приборы, материалы и методики исследования.

Приборы. Исследования проводили с применением автоматов окраски мазков АФОМК-13-ПАП (13 станций, в том числе – ванна с проточной водой и две станции сушки), производства ООО ЭМКО (Россия, Москва). Морфологические исследования проводили на микроскопе МТ4300L с цифровой камерой и светодиодным осветителем. Изображения, используемые для качественного сравнения результатов, фотографировались при идентичных условиях освещения, а в случае электронной обработки для публикации, подвергались идентичным преобразованиям.

Технологические жидкости. При обработке методик использовали краски и другие технологические жидкости собственного производства, компаний Бивитрум (Россия), Bio-Optica (Италия), Emmonia Biotech (Болгария), J.T. Baker (Голландия).

Препараты. В качестве препаратов использовали мазки с клетками с внутренней поверхности щеки и с клетками эпителия твёрдого нёба. Клетки забирали щёткой сначала с твёрдого нёба, затем – со щеки, наносили на стекло и немедленно погружали в ванну с этиловым спиртом на 15 мин.

Окраска. Основную часть экспериментов проводили с применением варианта прописи прогрессивной окраски по Папаниколу для автомата АФОМК-13-ПАП, «EMCO-PAP-16» [6] на основе «Enviro PAP» по Гиллу [3] (Таблица 1, Рис. 1).

Таблица 1 Протокол технологической программы окраски EMCO-PAP-16

| № Т.О. | № СТ. | ТЕХНОЛОГИЧ. СРЕДА | ВРЕМЯ ОПЕРАЦИИ (ММСС ) | РЕЖИМ (цифра – период активации, с) | ЗАДЕРЖКА (у.е. ~ 2с) |
|--------|-------|-------------------|------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| 1      | 3     | Проточная вода    | 0030                   | АКТИВАЦИЯ-15                        | 5                    |
| 2      | 4     | Промывка *        | 0005                   | ВЫДЕРЖКА                            | 5                    |
| 3      | 5     | Гематоксилин      | 0200                   | АКТИВАЦИЯ -15                       | 5                    |
| 4      | 3     | Проточная вода    | 0200                   | АКТИВАЦИЯ -15                       | 5                    |
| 5      | 6     | Салфетка          | 0000                   | ВЫДЕРЖКА                            | 0                    |
| 6      | 8     | OG 6              | 0015                   | ВЫДЕРЖКА                            | 5                    |
| 7      | 6     | Салфетка          | 0000                   | ВЫДЕРЖКА                            | 0                    |
| 8      | 7     | Изопропанол-1     | 0010                   | АКТИВАЦИЯ -2                        | 5                    |
| 9      | 6     | Салфетка          | 0000                   | ВЫДЕРЖКА                            | 0                    |
| 10     | 9     | EA-50             | 0500                   | АКТИВАЦИЯ-15                        | 5                    |
| 11     | 6     | Салфетка          | 0000                   | ВЫДЕРЖКА                            | 0                    |
| 12     | 7     | Изопропанол-1     | 0010                   | АКТИВАЦИЯ -2                        | 5                    |
| 13     | 6     | Салфетка          | 0000                   | ВЫДЕРЖКА                            | 0                    |
| 14     | 10    | Изопропанол-2     | 0010                   | АКТИВАЦИЯ -2                        | 5                    |
| 15     | 11    | Изопропанол-3     | 0010                   | АКТИВАЦИЯ -2                        | 5                    |
| 16     | 12    | Просветлитель     | 0010                   | АКТИВАЦИЯ -2                        | 9                    |

Т.О. – технологическая операция; СТ. – станция;  
 \* Промывка – 0,5% водный раствор уксусной кислоты, или дистиллированная вода.

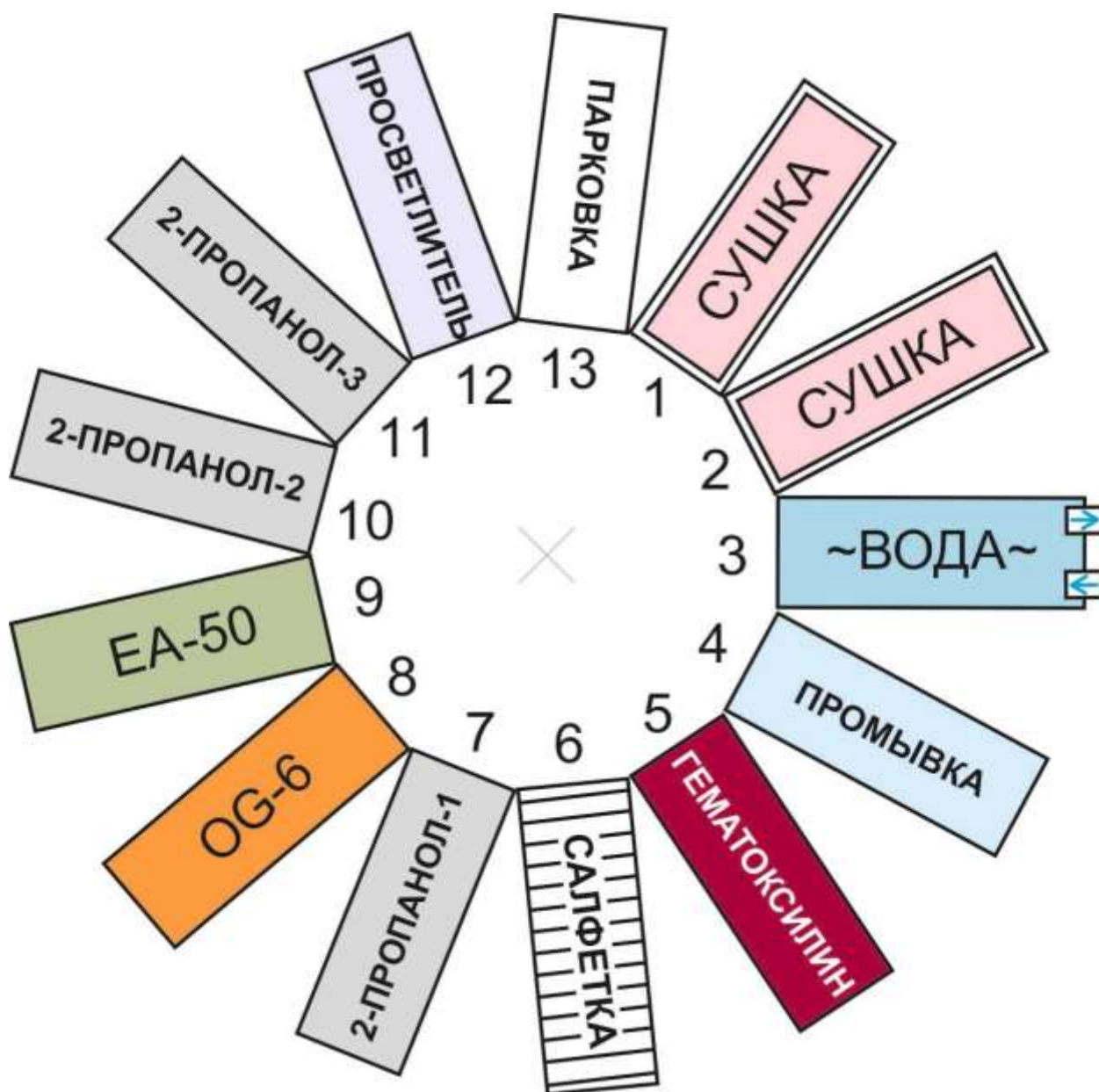


Рис. 1. Конфигурация автомата АФОМК-13-ПАП при выполнении окраски по протоколу «EMCO-PAP-16».

Методики исследований. Для корректного сравнения влияния воздействия различных красок, технологических жидкостей, времени технологических операций (окраски, промывки), применяли следующие методические приёмы:

1. Прерывание окраски на разных стадиях с цифровым микрофотографированием одного и того же участка препарата (одной и той же группы клеток). Прерывание окраски осуществлялось промывкой в подкисленной воде, или спирте. Фотографирование проводилось как на препаратах, покрытых плёнкой жидкости, так и на сухих препаратах – без плёнки жидкости на поверхности. Так, с прерываниями, осуществлялась полная процедура окраски. Из-за отсутствия покровного стекла, а также из-за меняющихся условий съёмки вследствие испарения жидкости с поверхности препарата, качество микрофотографий не очень высокое, однако оно вполне позволяет отслеживать изменения в окраске цитоплазмы.

2. Проведение окраски препаратов с пропуском окраски в одной или двух красках, в частности, пропуск окраски в ядерном красителе – гематоксилине.

3. Проведение полного цикла окраски препарата с 50% заполнением ванны одним из красителей (таким образом, верхняя часть стекла в ванне с 50% заполнением, не окрашивалась) (Рис. 2).

4. Проведение окраски препарата с окраской ОГ6 только участка стекла, заключенного между двумя полосами жидкого силикона, нанесенными поперёк стекла непосредственно перед окраской ОГ6. Для этого стекло размещали горизонтально, наносили несмачивающиеся полосы силикона, ограничивающие растекание краски. На поверхность стекла, ограниченную полосами силикона, на заданное время, наносили краску ОГ6 (Рис. 2).

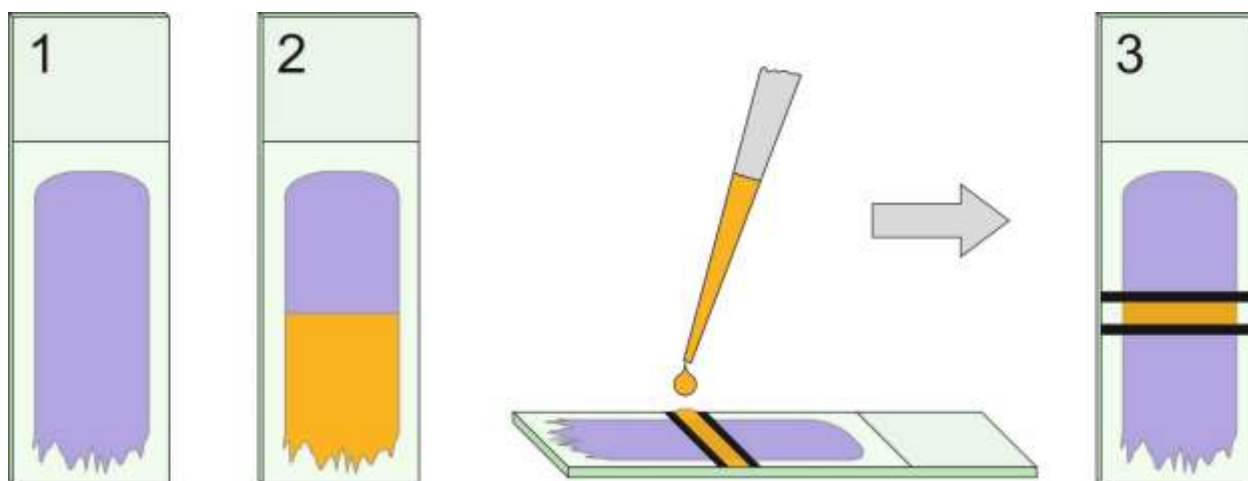


Рис. 2 Методические приёмы, используемые для качественного сравнения действия разных красителей при окраске по Папаниколау. 3- препарат с локальной окраской одной из красок (чёрным обозначены несмачивающиеся полосы из силикона).

5. Часть препаратов после окраски подвергалась промывкам в изопропиловом и этиловом спиртах, в водно-спиртовых растворах, в дистиллированной воде, в воде, подкисленной уксусной кислотой, в водопроводной воде, с прерываниями на разных стадиях для микрофотографирования.

Результаты и обсуждение.

Постадийное окрашивание препаратов.

На Рис. 3-10 приведены микрофотографии препарата, на разных стадиях окраски по Папаниколау. Рис. 11 демонстрирует сводную картину постадийного окрашивания по Папаниколау.

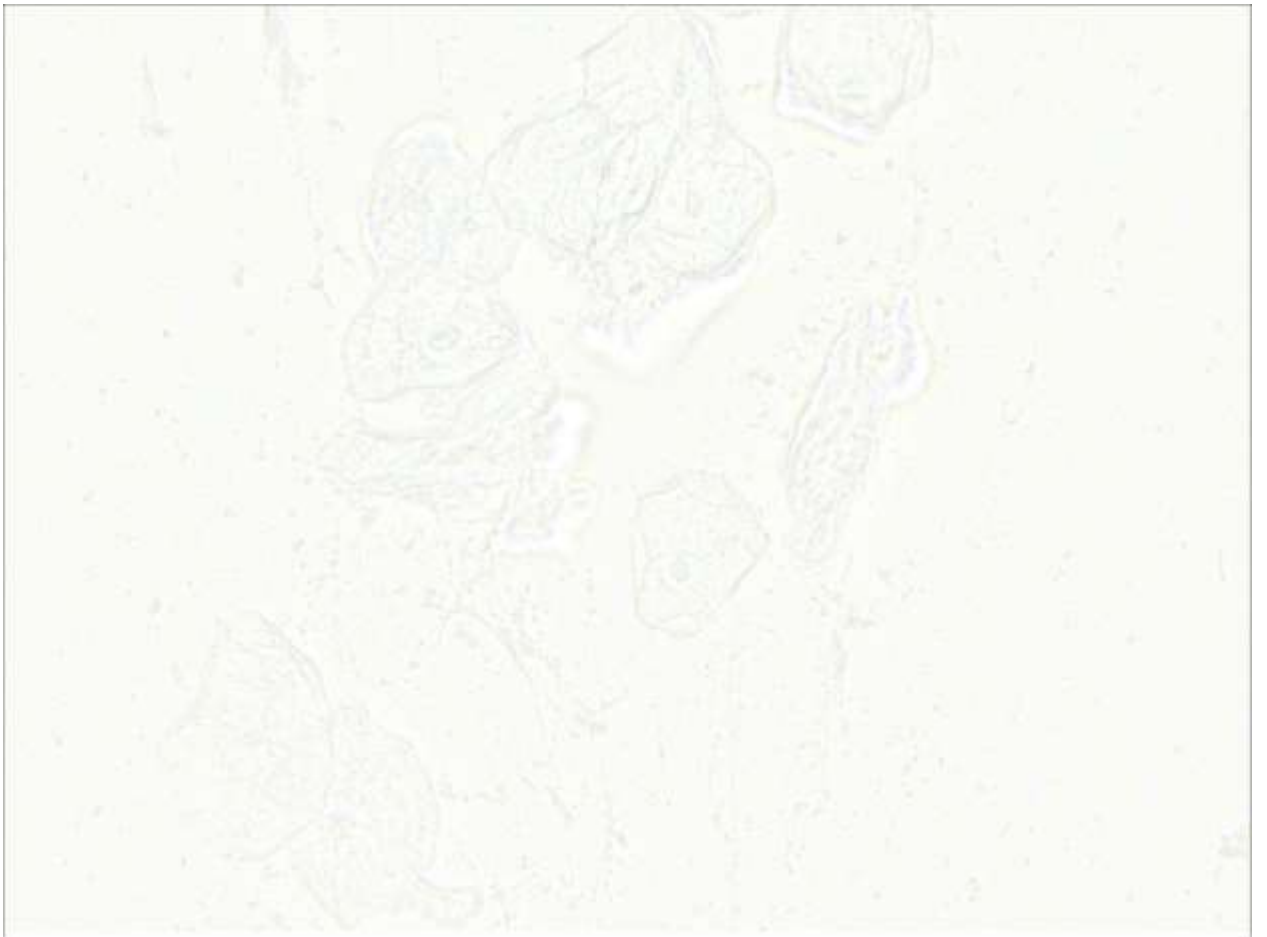


Рис. 3 Микрофотография исходного (фиксированного и высушенного) препарата.

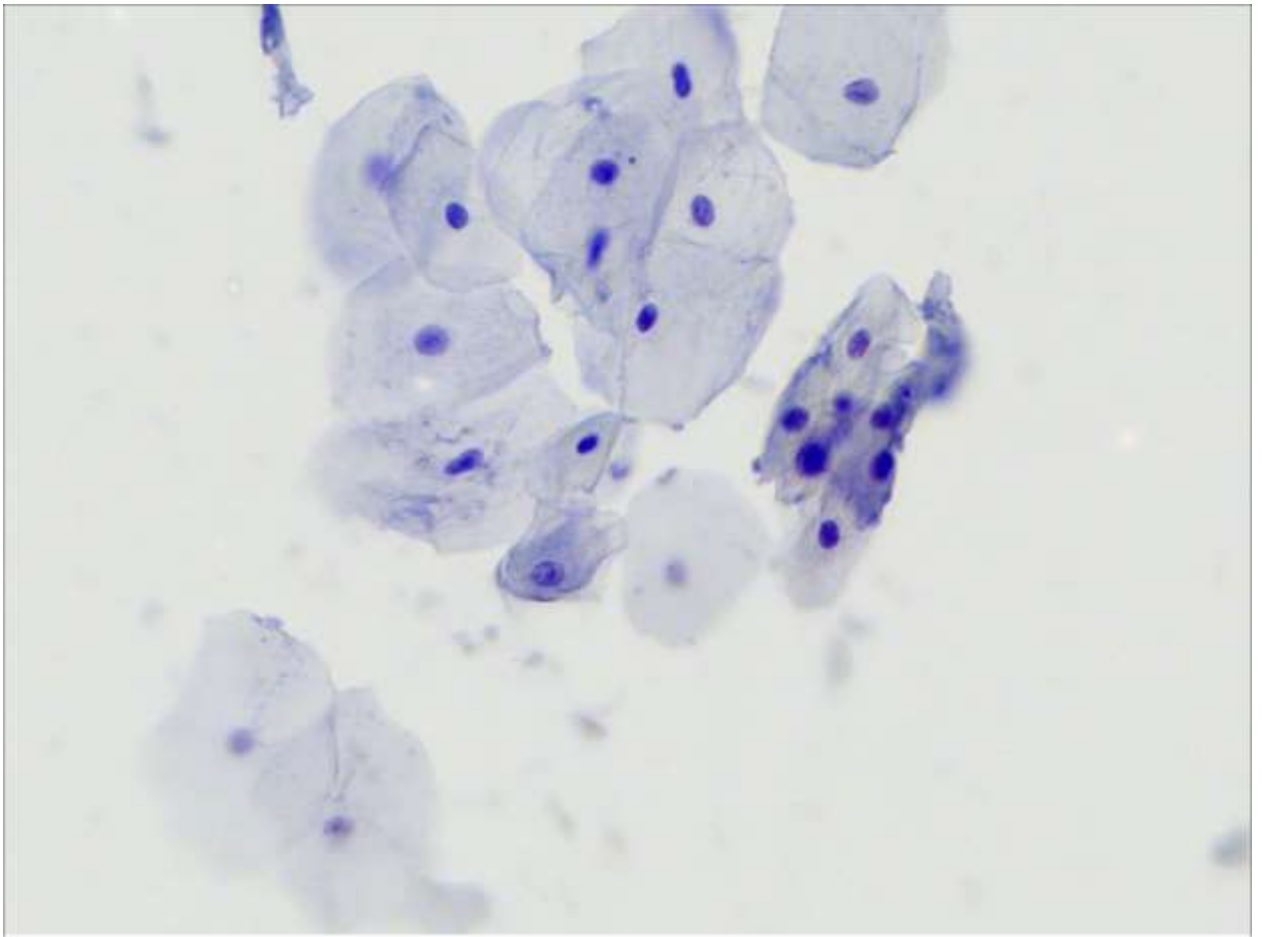


Рис. 4. Окраска гематоксилином без отсинивания.  
Цвет окраски ядер близок к фиолетовому; цитоплазма – слабо окрашена в голубой цвет;  
фон препарата приобретает серовато-голубой цвет.

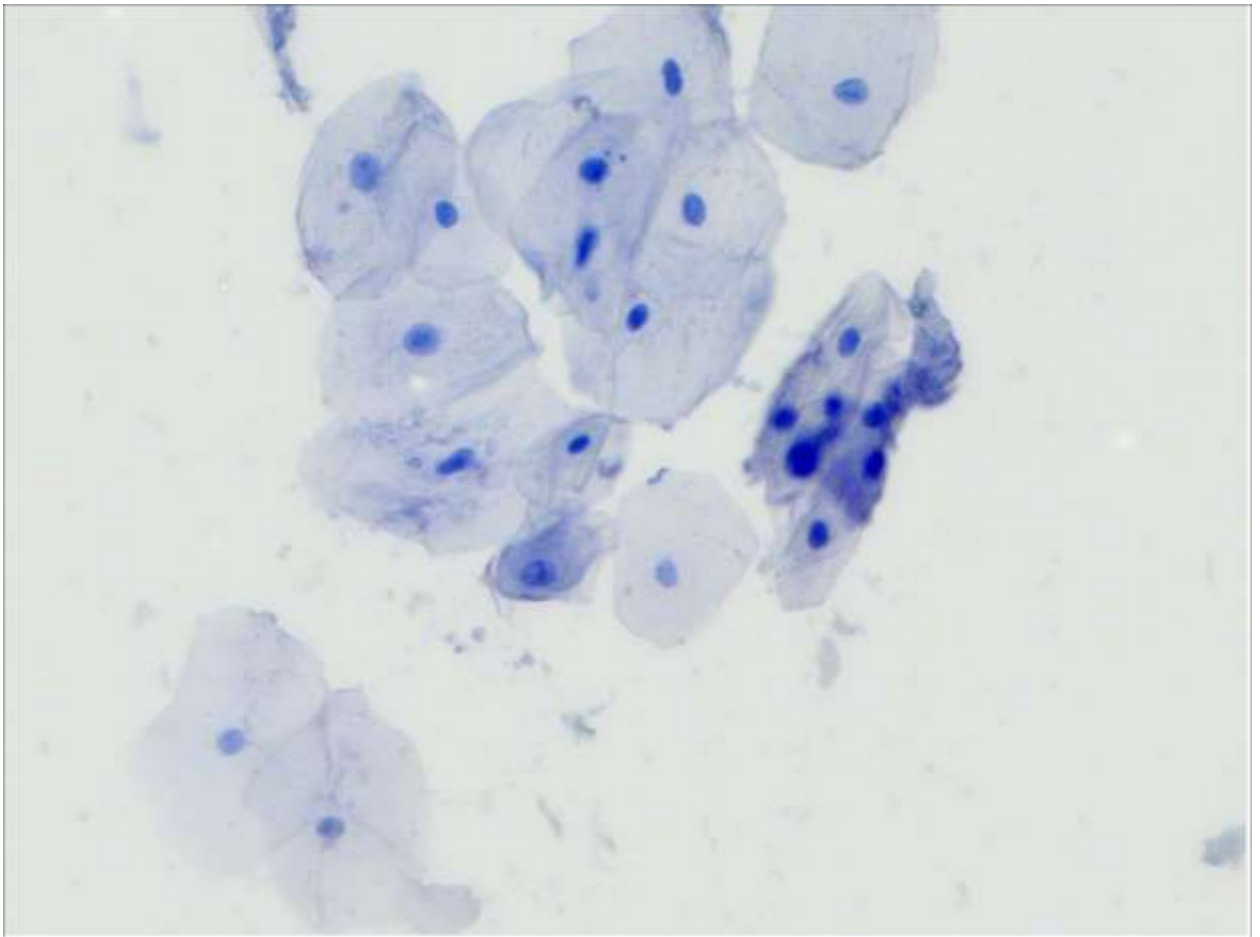


Рис. 5. Окраска гематоксилином + отсинивание.  
Окраска ядер – синяя; цитоплазма – голубая, фон препарата - серовато-синий; окраска «закреплена» -  
переведена в нерастворимую форму.

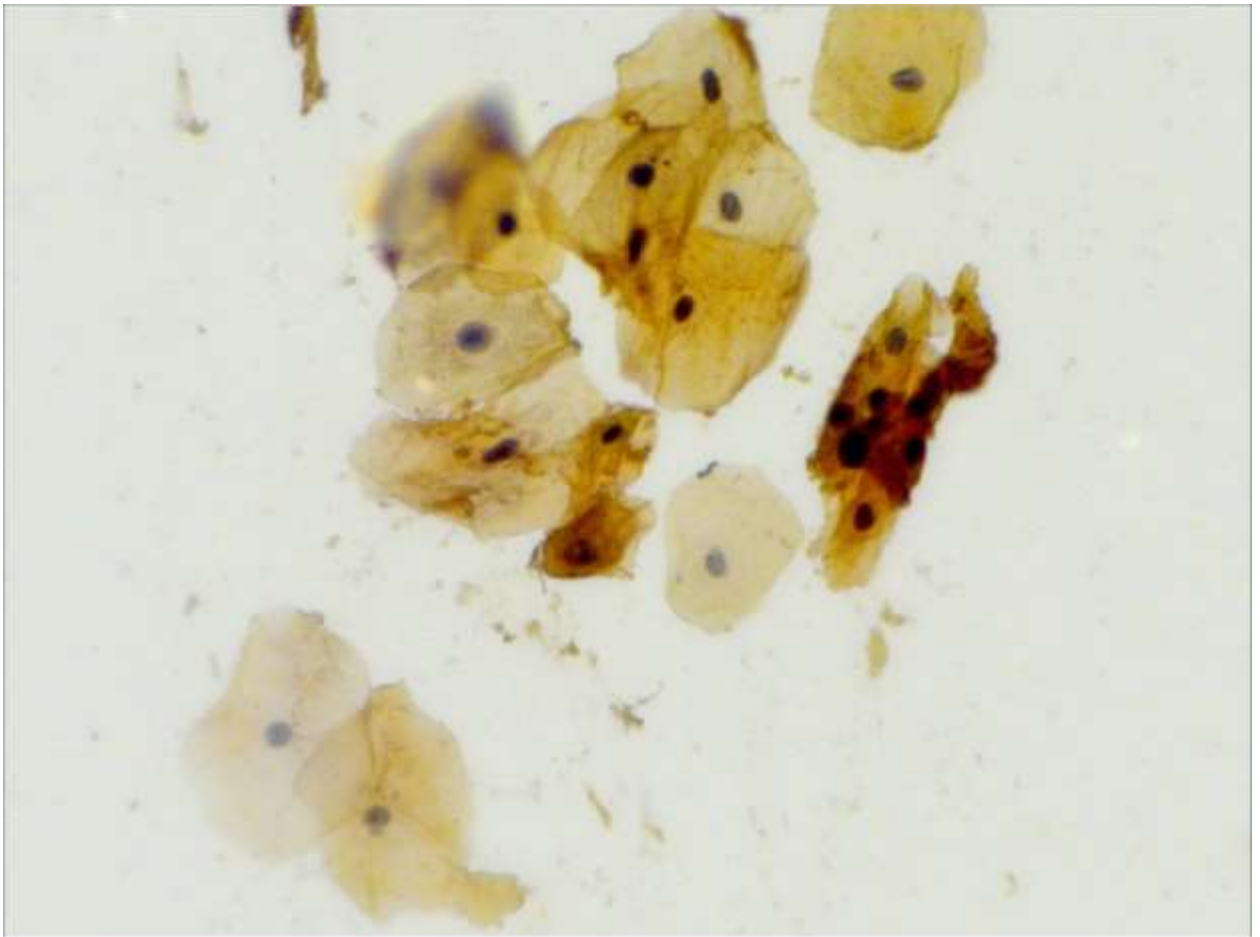


Рис. 6. Окраска гематоксилином + отсинивание + окраска OG 6.  
Цитоплазма всех клеток окрашивается в желто-оранжевый цвет, видна примесь синего цвета за счёт гематоксилина; фон препарата приобретает желтоватый оттенок.



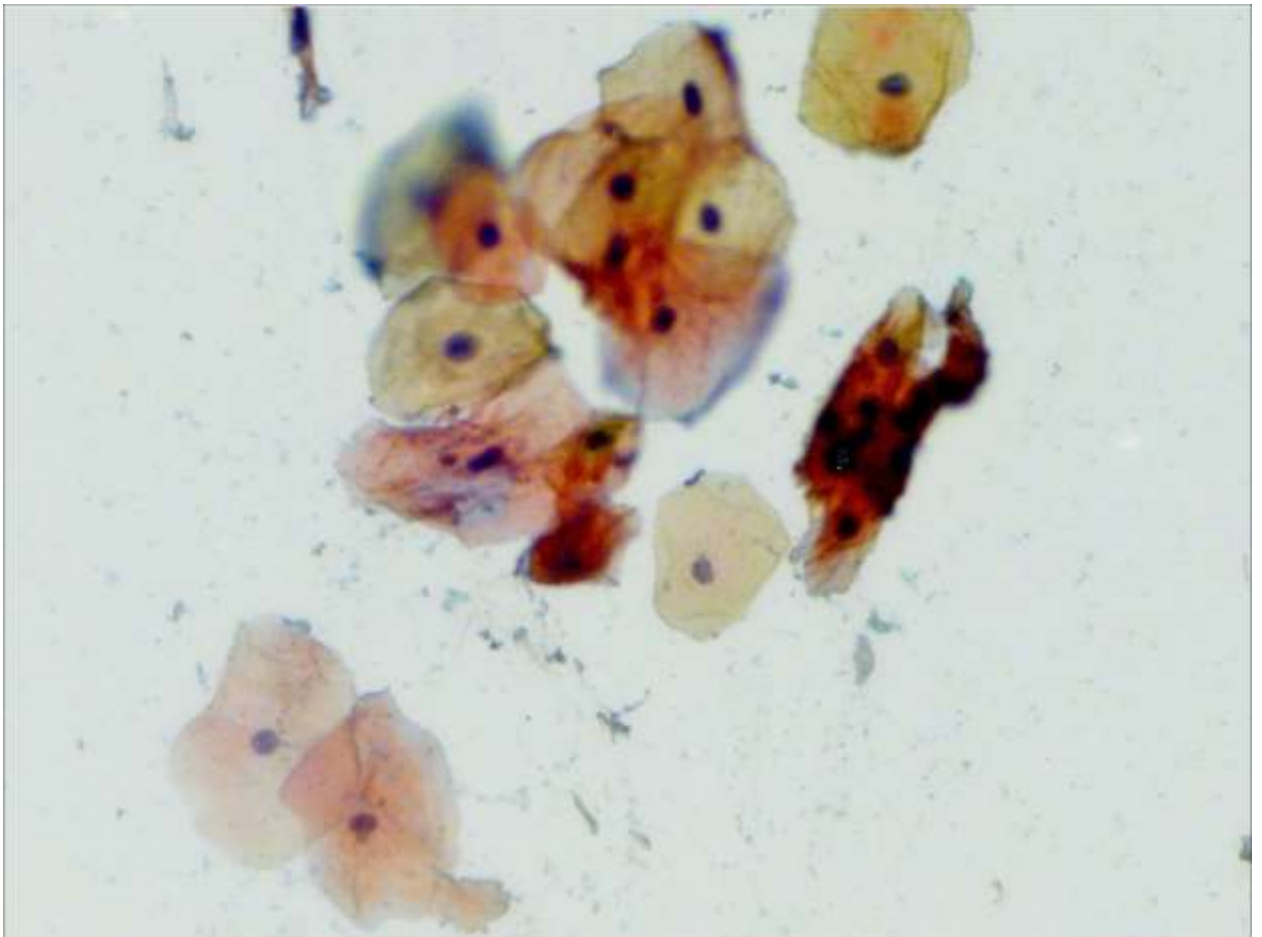


Рис. 7. Окраска гематоксилином + отсинивание + окраска OG6 + окраска EA(~ 1 с)

У цитоплазмы большинства клеток появляется розовый цвет; цитоплазма у части клеток практически не меняет свой желтовато-оранжевый цвет; некоторые участки цитоплазмы «розовых клеток» имеют сине-зеленый оттенок (в последующем, они приобретут зелёный цвет); фон препарата – серо-голубой.

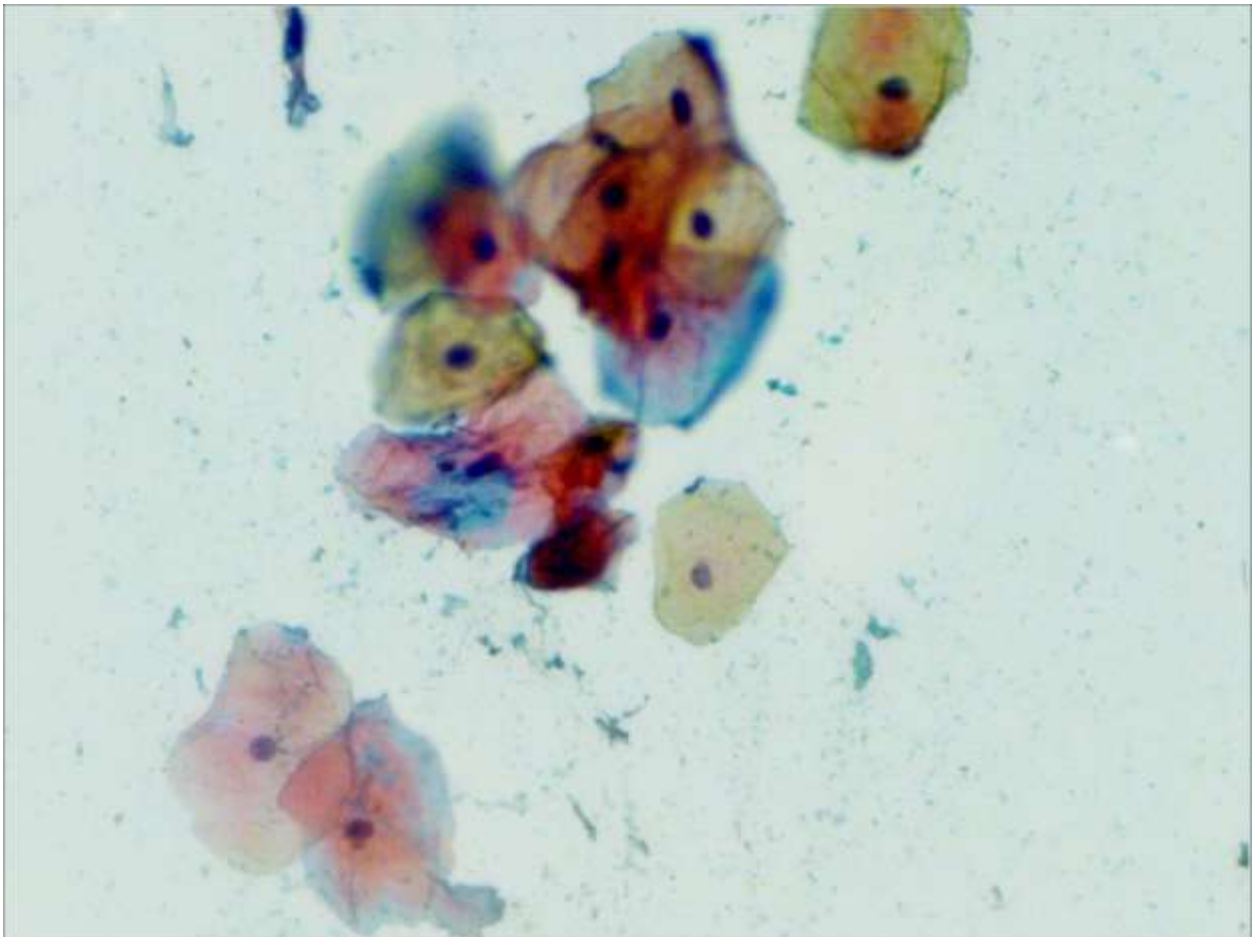


Рис. 8. Окраска гематоксилином + отсинивание + окраска OG6 + окраска EA (~ 8 с)

Усиливается розовая окраска эозином; появляются участки цитоплазмы, окрашенные в зелёный цвет; фон препарата приобретает зеленоватый оттенок.

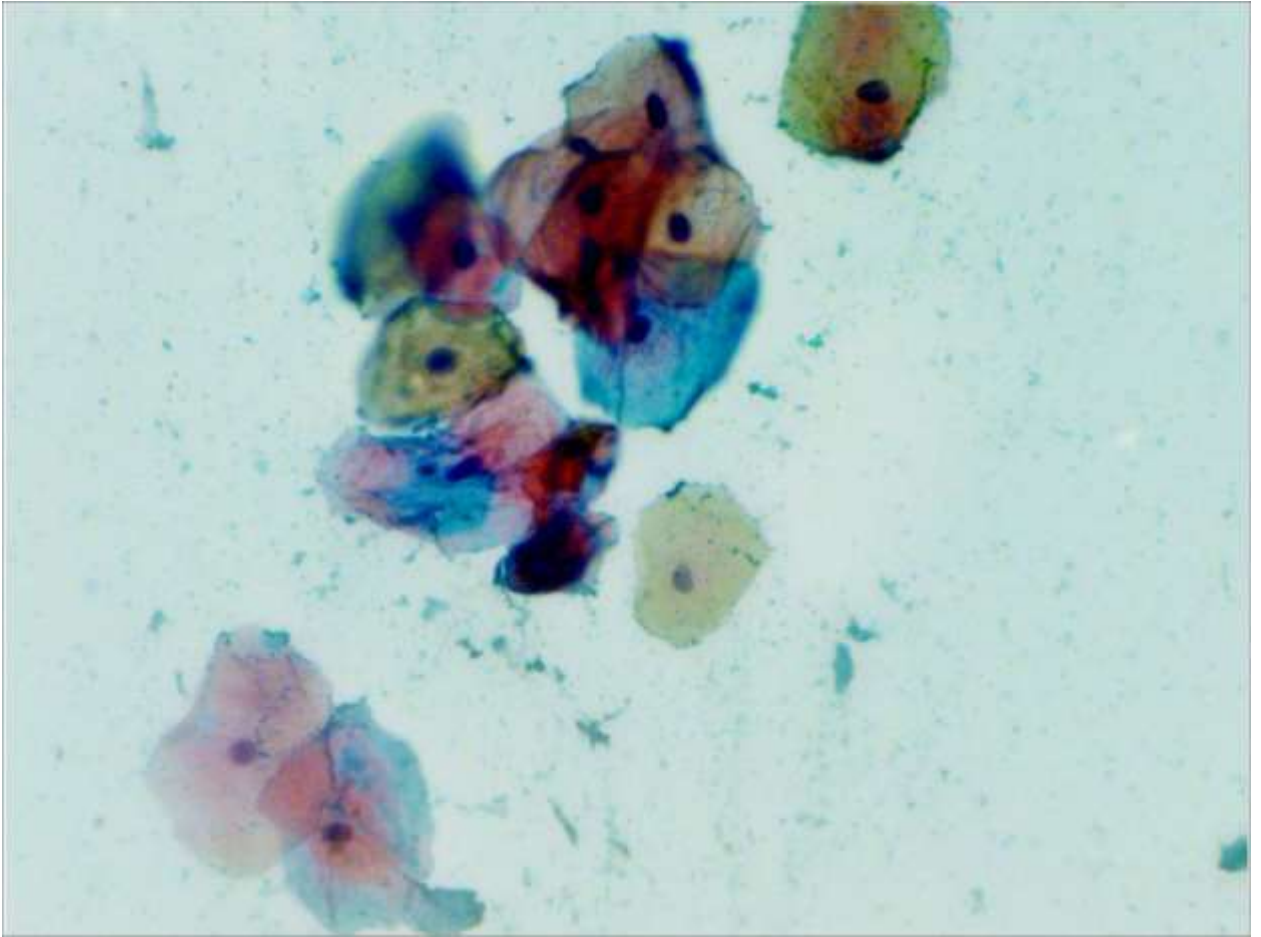


Рис. 9. Окраска гематоксилином + отсинивание + окраска OG6 + окраска EA (~ 16 с).

Усиливается розовая окраска эозином; увеличиваются участки цитоплазмы, окрашенные в зелёный цвет.

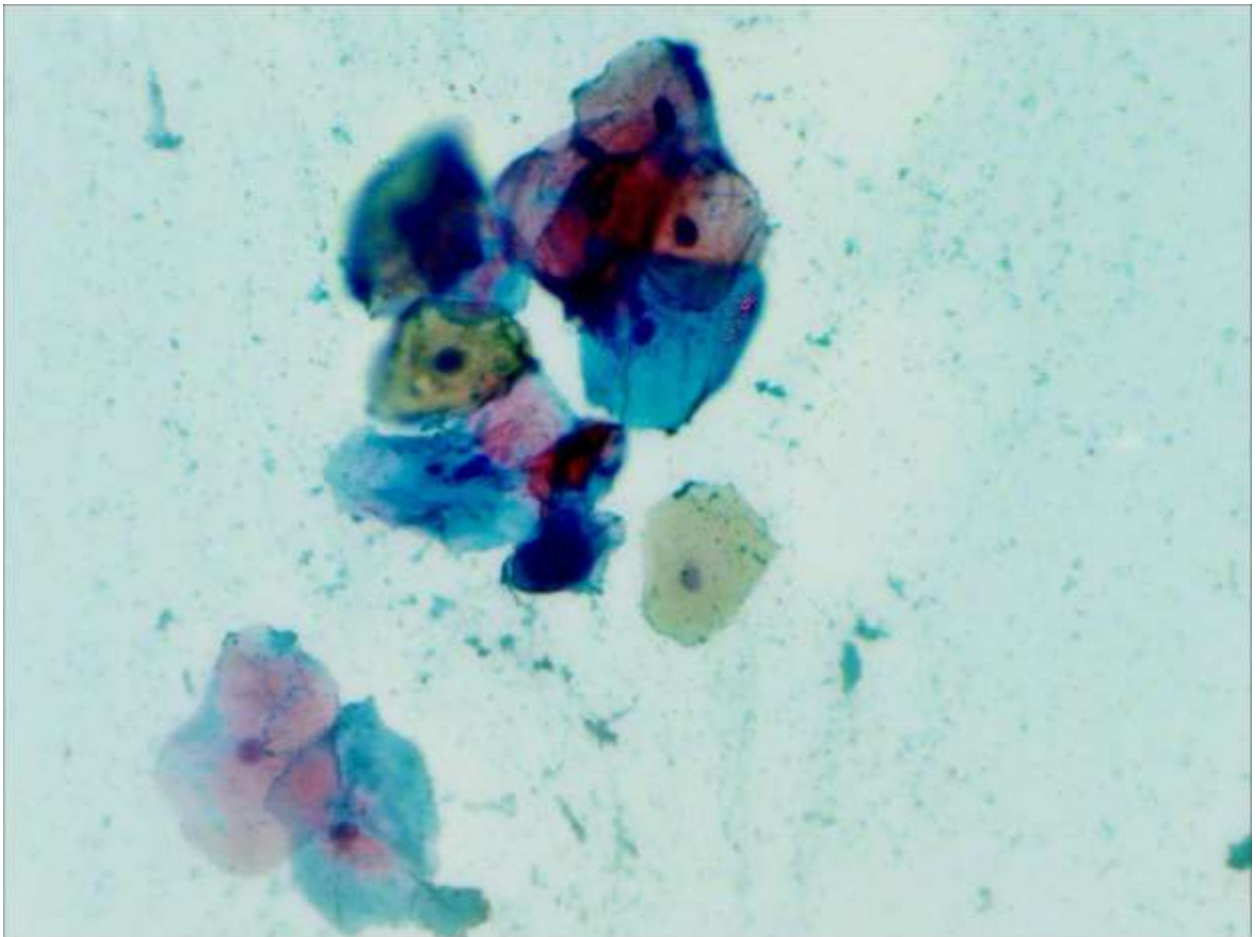


Рис. 10. Окраска гематоксилином + отсинивание + окраска OG6 + окраска EA (~ 120 с)

Розовая окраска эозином не усиливается, препарат практически окрашен, в дальнейшем будет происходить медленное увеличение зелёной окраски, включая фон препарата.

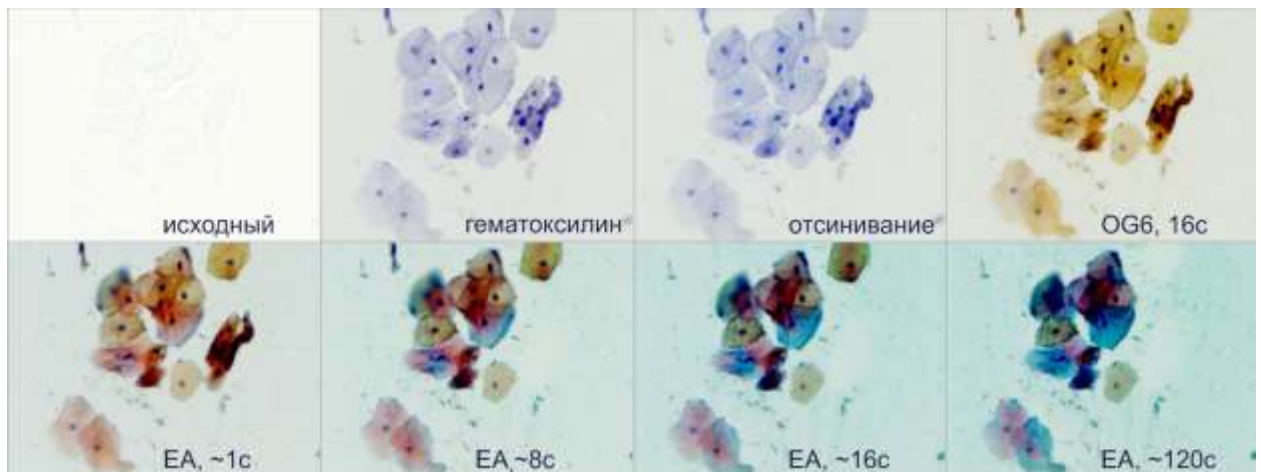


Рис. 11 Сводная картина постадийного окрашивания по Папаниколау.  
Хорошо видно изменение цвета и фона препарата.

#### Вклад окраски гематоксилином

После полного цикла окраски по Папаниколау, препарат последовательно промывался водопроводной водой ( $pH \approx 7$ ). (В соответствии с п.1 раздела «Методики исследования».) В цитоплазме клеток, окрашенных по Папаниколау и промытых в

течение длительного времени (несколько минут) в водопроводной воде, последовательно вымывается окраска эозином, светло-зелёным SF, OG6 и остаётся окраска, характерная для стадии «окраска гематоксилином + отсинивание». На Рис. 12. приведены исходная и конечная микрофотографии одного и того же препарата.

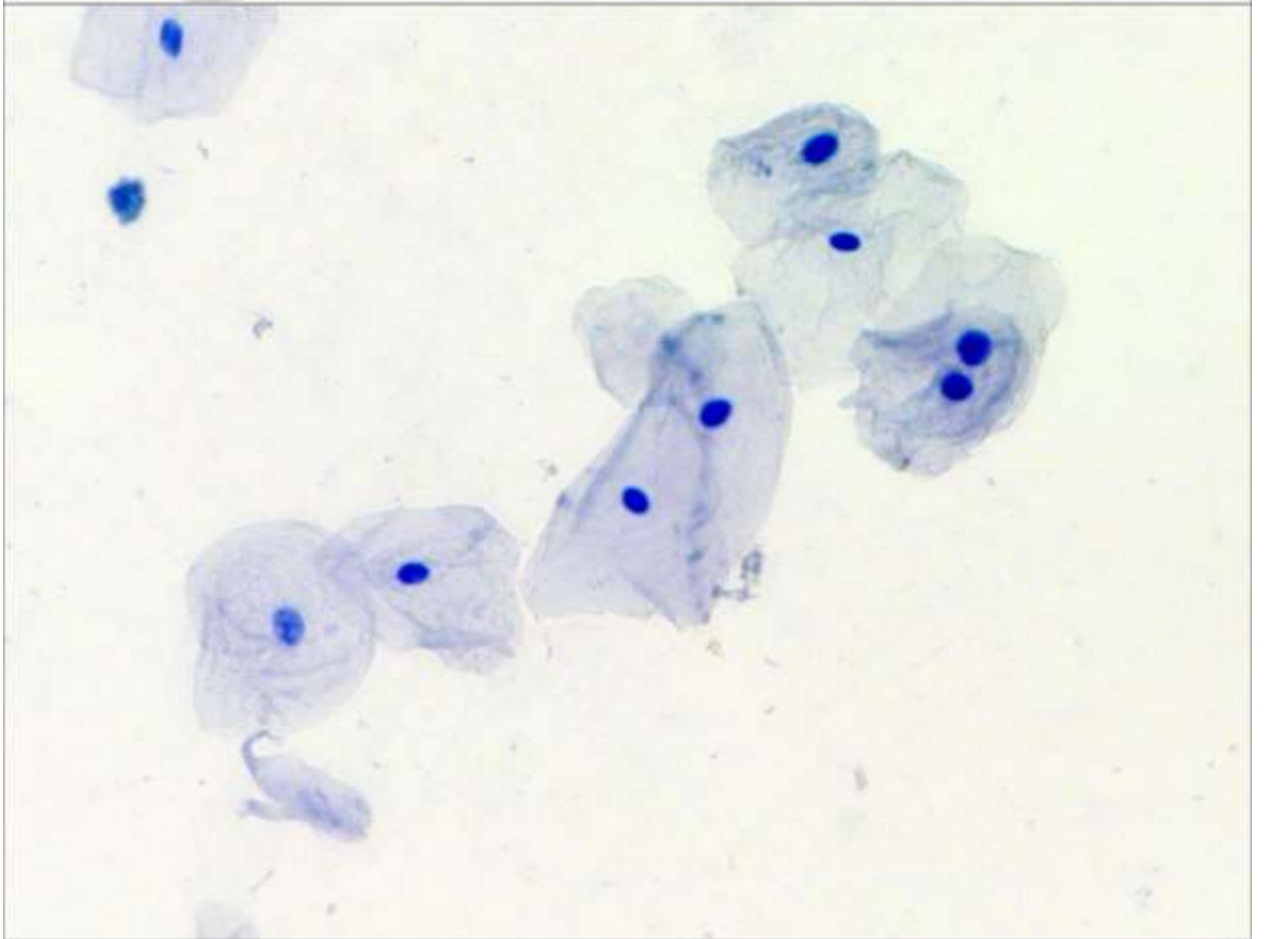
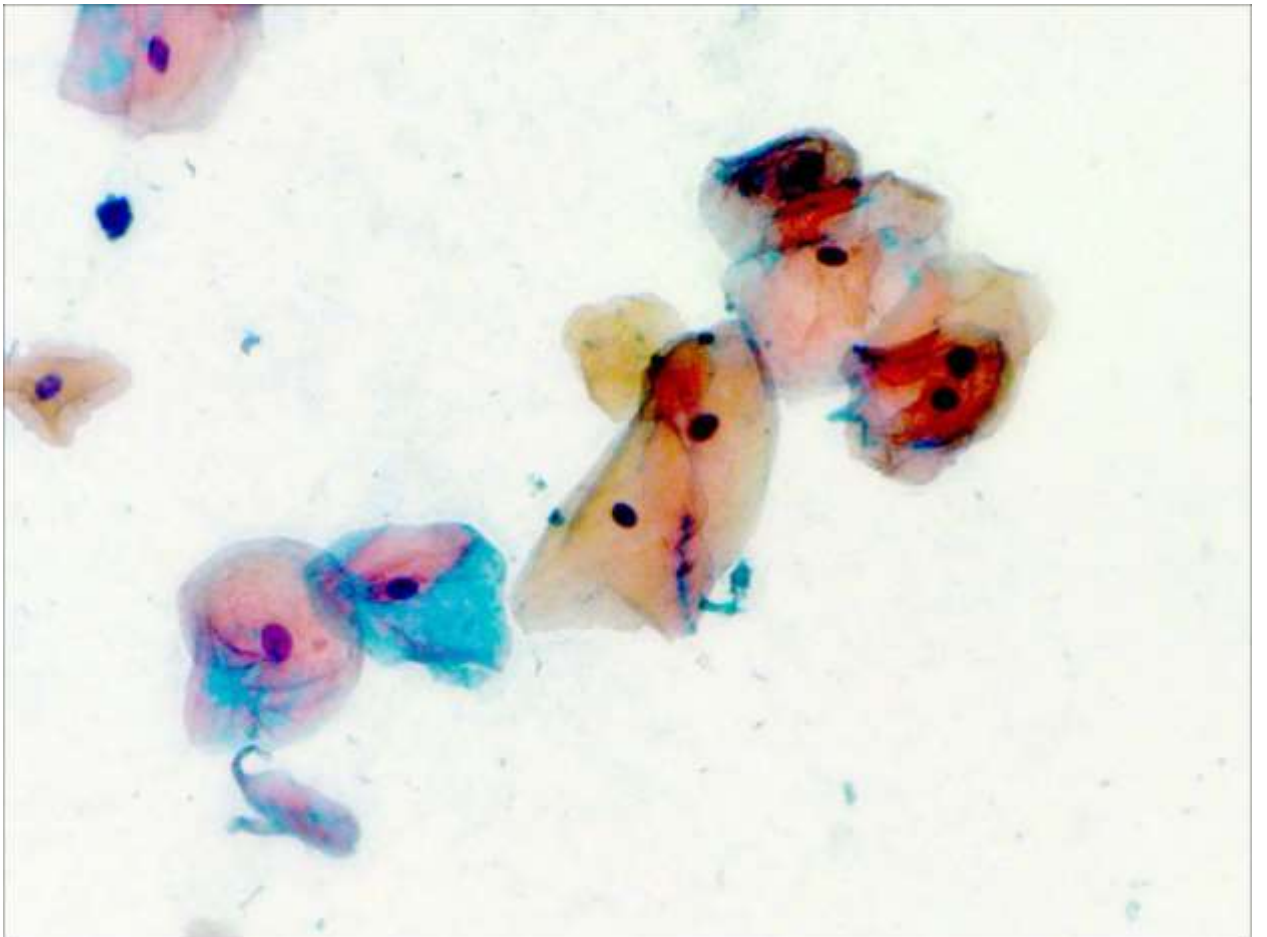


Рис. 12 Окраска гематоксилином + отсинивание + окраска OG6 + окраска EA + промывка в водопроводной воде (фото промытого препарата – внизу, окраска аналогична Рис. 5).

6 и EA (локальная окраска OG6)

В этой серии экспериментов использовалась локальная окраска препарата краской OG6 (см. Рис. 2 (стекло 3)).

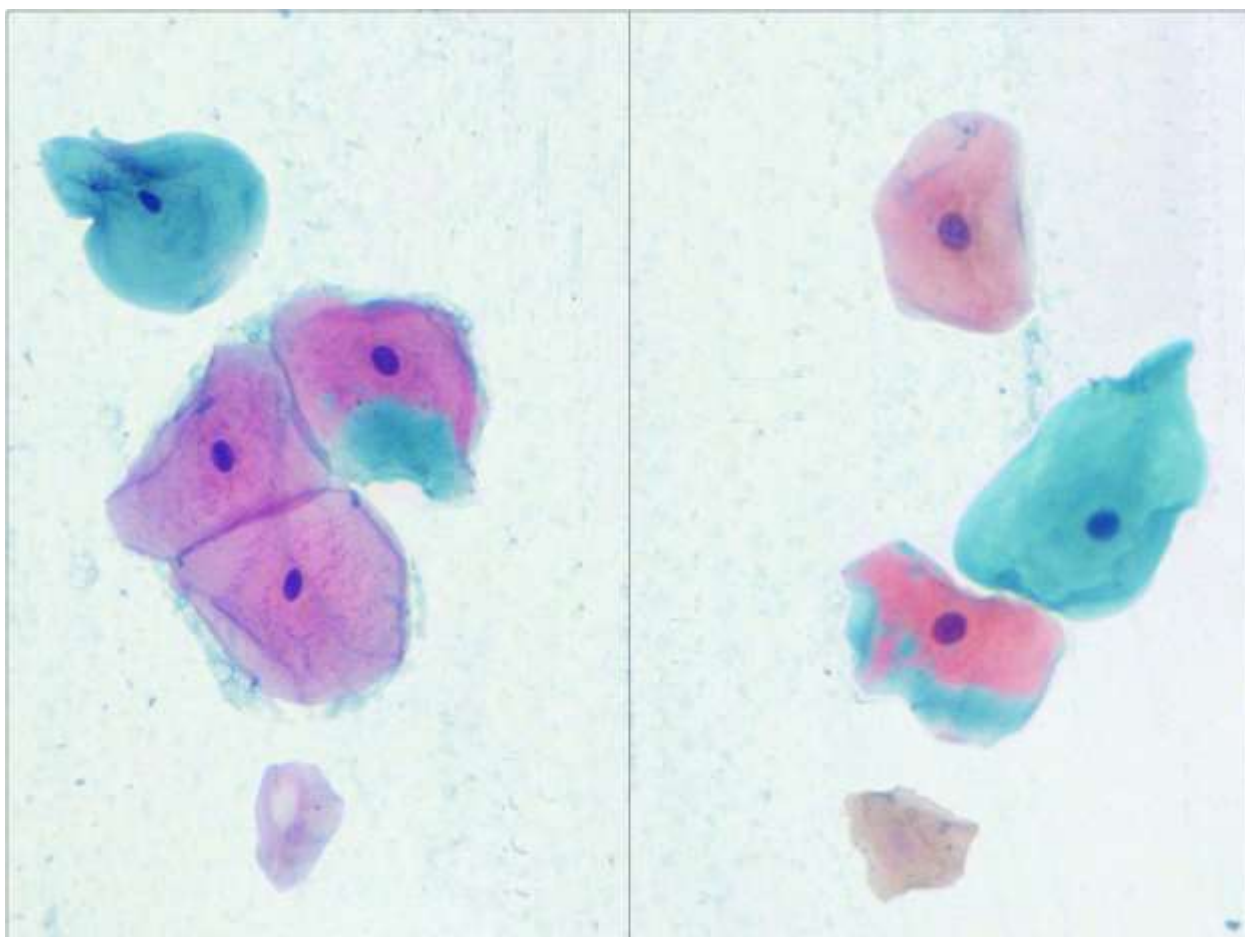


Рис. 13 Локальная окраска препарата краской OG6. В левой части фото – клетки с участков стекла, окрашенных без OG6, наблюдается синеватый оттенок, особенно хорошо заметный у розовых клеток. Чешуйка окрасилась эозином и, в меньшей степени, зелёным красителем. В правой части фото – клетки с участков стекла, подвергнутых локальной окраске OG6. Наблюдается желтоватый оттенок особенно хорошо заметный у розовых клеток. Чешуйка окрашена в серовато-желтый цвет.

(вымывание красителей)

По данным [9], растворимость цитоплазматических красителей, применяемых при окраске по Папаниколау, сильно различается. Причём, растворимость в воде у всех красителей существенно выше, чем в спирте. Особенно выделяется разница в растворимости Оранжевого G и Эозина Y в спирте (См. Таблицу 2). Такая разница в растворимостях даёт основание полагать, что при промывках в воде, спирте, водно-спиртовых растворах, кинетика вымывания разных красителей будет различаться, что может дать возможность выявления присутствия различных красителей в цитоплазме.

Таблица 2 Растворимость красителей, г на 100 мл

|                   |                  |      |
|-------------------|------------------|------|
| Растворитель      | H <sub>2</sub> O | EtOH |
| Краситель         |                  |      |
| ОРАНЖЕВЫЙ G       | 10,86            | 0,22 |
| СВЕТЛО-ЗЕЛЕНЫЙ SF | 20,35            | 0,82 |
| ЭОЗИН Y           | 44,2             | 2,18 |

В эксперименте с промывкой окрашенного препарата в водопроводной воде (см. Рис. 12), было показано, что гематоксилин даёт вклад в окраску цитоплазмы и остаётся в ней после длительной промывки в воде. Наблюдалось последовательное вымывание эозина, светло-зелёного SF и оранжевого G. Однако, наличие окраски цитоплазмы гематоксилином, затрудняет возможность наблюдения изменения окраски в процессе промывок. В связи с этим, использовались препараты, окрашенные только в двух красках – OG6 и EA (окраска в гематоксилине и отсинивание были пропущены).

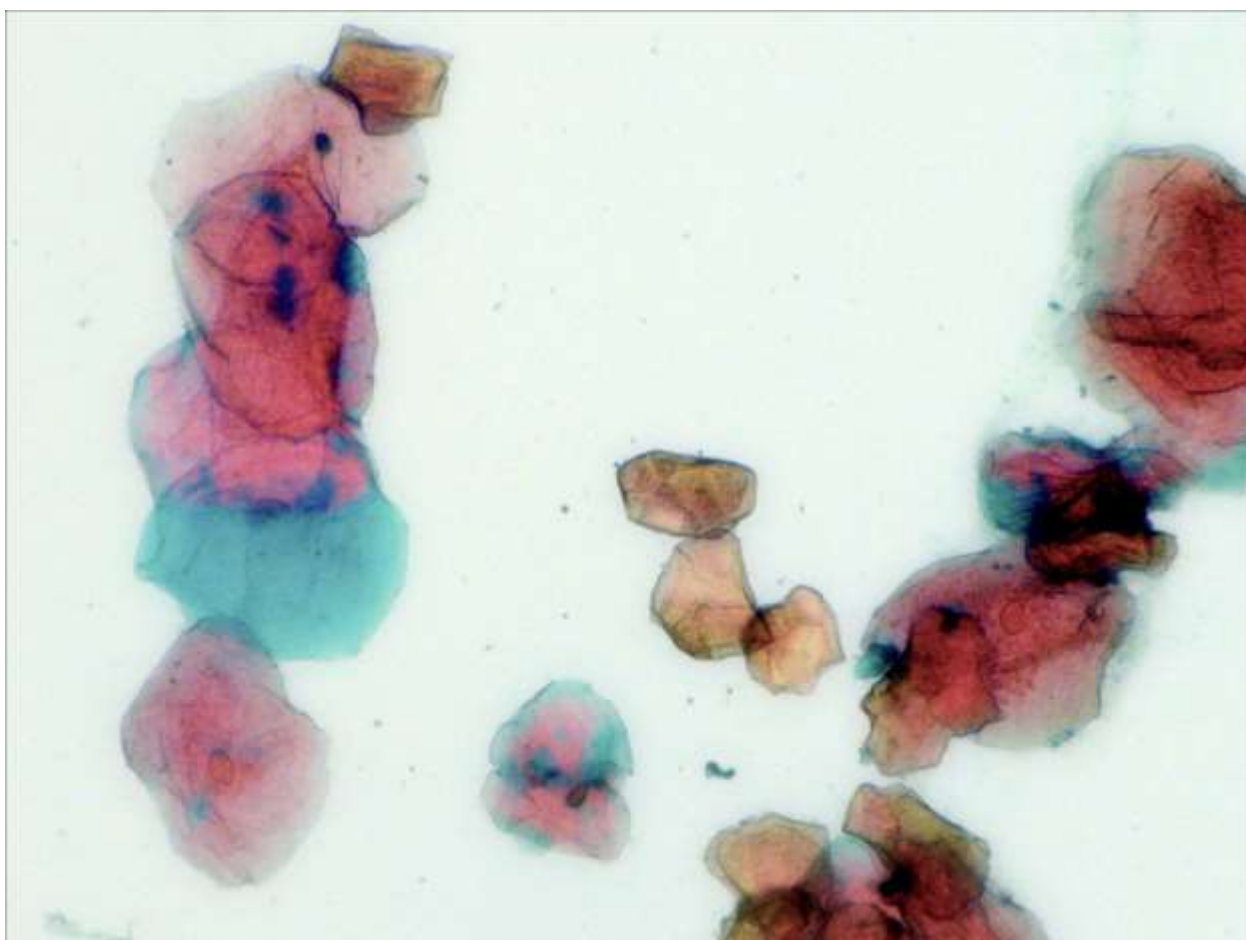


Рис. 14. Исходная окраска препарата OG6 и EA 50 (без окраски гематоксилином).



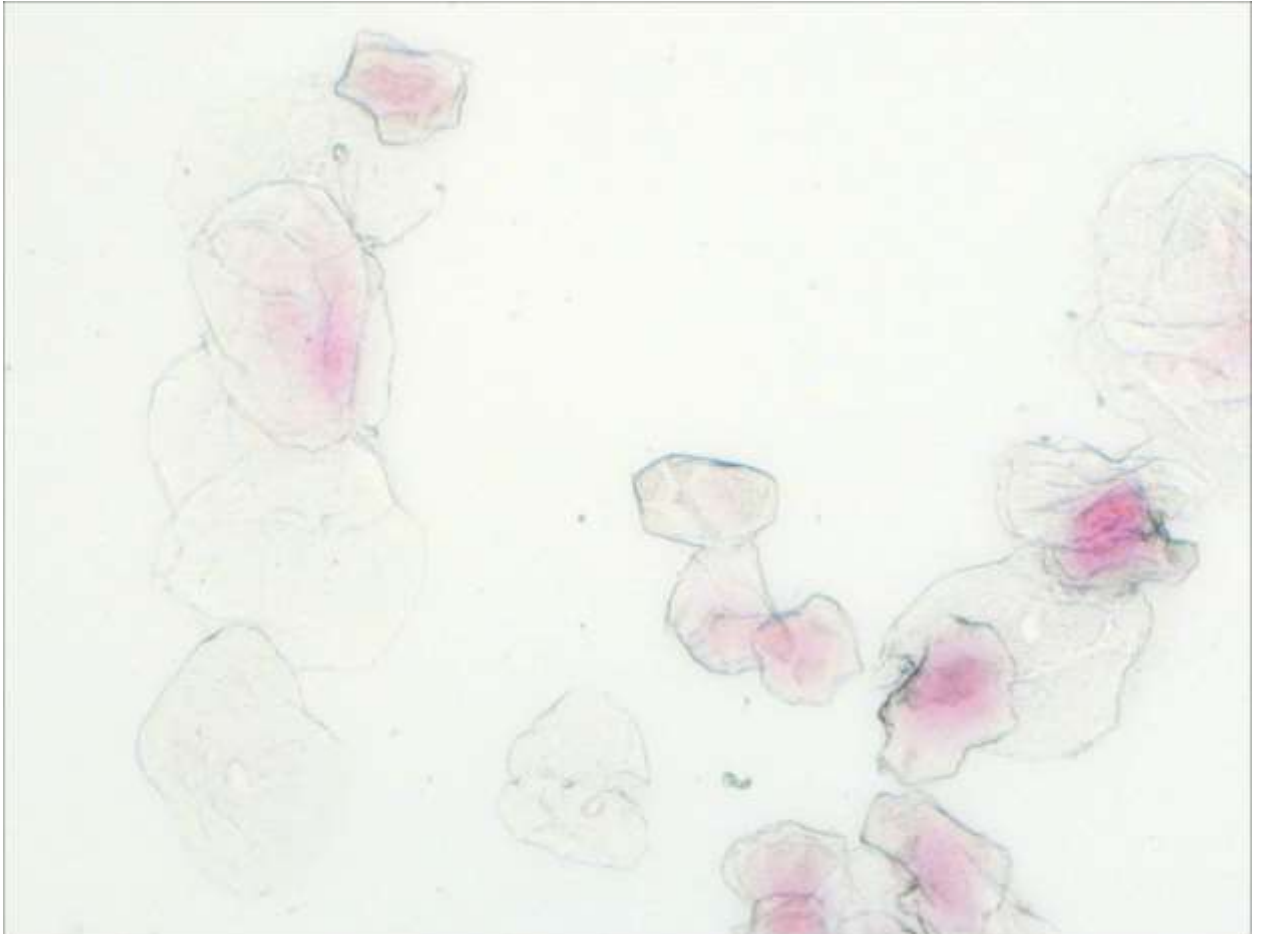
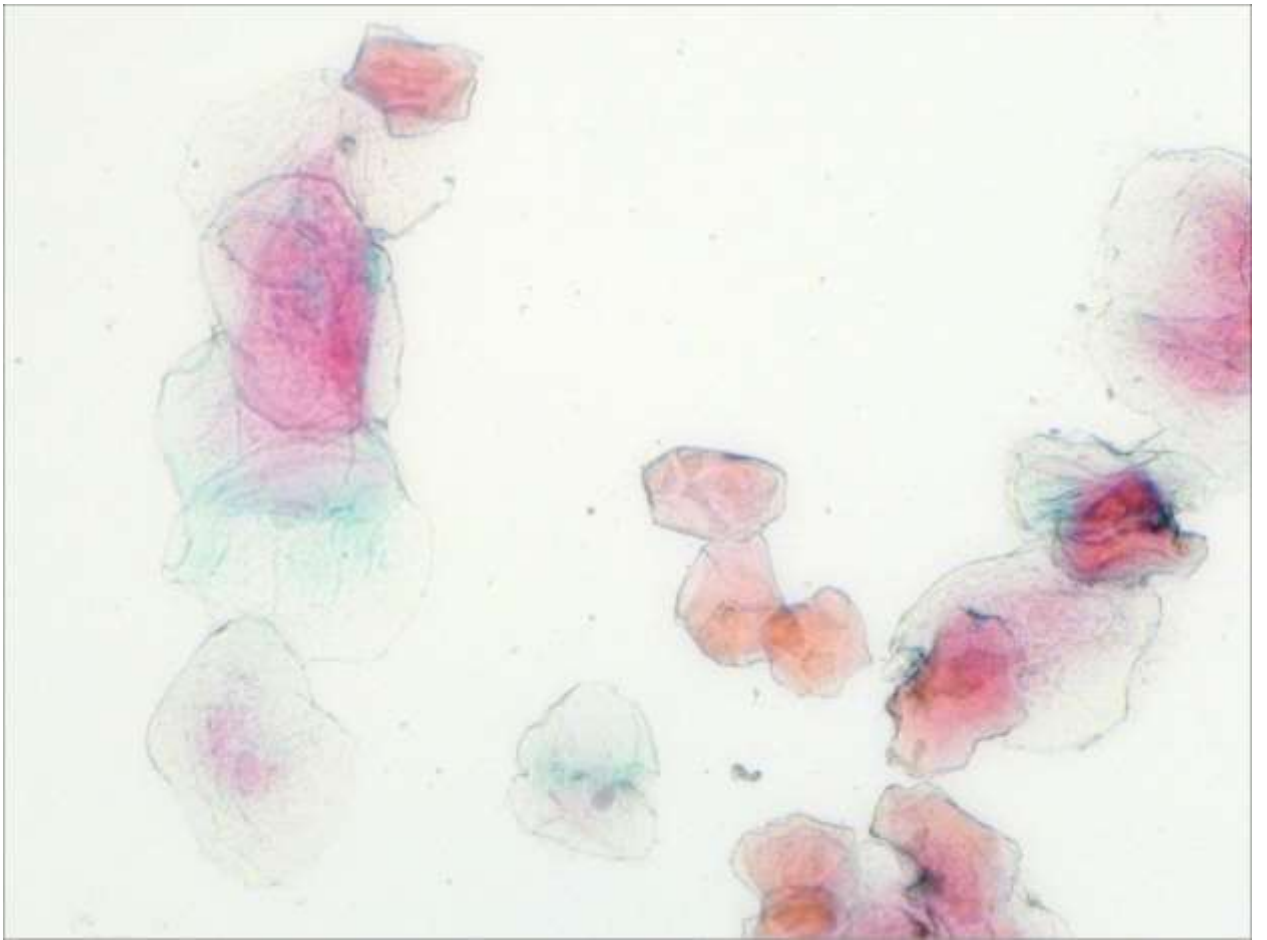


Рис. 15. Промывка препарата в 50% этаноле: сверху – 30 секунд, внизу – 135 секунд.

Последовательно исчезает розовая и зелёная окраска цитоплазмы одиночных (без наслаений одна на другую) некератинизированных клеток. На нижней фотографии очевидно присутствие окраски эозином чешуек, видна слабая жёлтая окраска цитоплазмы всех клеток, наиболее явная для кератинизированных чешуек.

## Выводы

Полученные результаты показывают, что окраска цитоплазмы гематоксилином остаётся при последующих технологических обработках, включая окраску в красках OG6 и EA и даёт вклад в общую окраску цитоплазмы. Желтый краситель остаётся в цитоплазме всех клеток после окраски в EA и даёт клеткам соответствующий оттенок. Если вытеснение OG6 и происходит, то, во всяком случае, не полностью. В отсутствии окраски OG6, например, при ускоренной окраске [7], цитоплазма кератинизированных клеток (чешуек) окрашиваются преимущественно эозином. При полной окраске по Папаниколау (с применением краски OG6), кератинизированные клетки окрашиваются не только желтым красителем OG6, но и эозином, что даёт этим клеткам оранжевый оттенок.

В целом, результат окраски цитоплазмы клеток по Папаниколау, можно рассматривать, как наложение вкладов различных красителей, включая ядерный краситель – гематоксилин. Результирующий цвет зависит от соотношения разных красителей в цитоплазме клеток. Приведенные результаты и выводы не противоречат микроспектрофотометрическим данным [1,4].

1. Galbraith W, Marshall PN. Studies on Papanicolaou staining. III. Quantitative investigations of orangeophilia and cyanophilia. *Stain Technol.* 1984 May;59(3):133-42.
2. Gill G. W. *Cytopreparation Principles & Practice*, стр. 150-151, Springer ISBN: 978-1461449324
3. Gill . G. W *Enviro-Pap: An Environmentally Friendly, Economical, and Effective Pap Stain.* February 2006 Volume 37 Number 2 105-108 \_ LABMEDICINE
4. Marshall PN, Galbraith W, Bacus JW. Studies on Papanicolaou staining. II. Quantitation of dye components bound to cervical cells. *Anal Quant. Cytol.* 1979 Nov-Dec;1(3):169-78.
5. Papanicolaou GN. A new procedure for staining vaginal smears. *Science.* 1942;95:438–9.
6. Papanicolaou GN. Traut 1 IE. *Diagnosis of uterine cancer by the vagina smear.* Commonwealth Eund. New York. 1943.
7. Yang GCH, Alvarez II. Ultrafast Papanicolaou stain. An alternative preparation for fine needle aspiration cytology. *Acta Cytol* 1995;39:55-60.
8. Безруков А.В., Безруков М.В., Беланов М.Е., Бухаров Г.А., Касоян К.Т. Окраска по Папаниколау на отечественных автоматах окраски мазков ЭМКОСТЕЙНЕР. *Лаборатория*, 2012 №3 с.34-36.
9. Лилли Р. *Патогистологическая техника и практическая гистохимия.* М, «МИР», 1969, с. 115-122.