

Протоколы окраски по Папаниколау II.

Гари В. Гилл: Gary W. Gill Enviro-Pap: An Environmentally Friendly, Economical, and Effective Pap Stain (Enviro-Pap: дружественная к окружающей среде, экономичная и эффективная окраска по Папаниколау).

Подготовка к публикации, перевод и комментарии А.В. Безрукова.

Every silver lining has a cloud, and so it is with staining longer.[1, p.169] G.W.Gill

No.	Solution	Time	Purpose	QA Buccal Smear		
				Hematoxylin	OG	EA
	Water	10 dips	Removes Carbowax	-	-	-
	Water	10 dips	Rinses Carbowax	-	-	-
	Gill's Hmbdn – 1 or 2	1-2 min	Colors chromatin red	✓	-	-
	Water	10 dips	Rinses hematoxylin	✓	-	-
	Water	10 dips	Rinses hematoxylin	✓	-	-
	Water	2 min	Blues red AI-hematein	✓	-	-
	Water	10 dips	Rinses residual dye	✓	-	-
	OG-6*	10 sec	Colors keratin yellow	-	✓	-
	0.5% HOAc	10 dips	Rinse, keeps OG in cells	-	✓	-
	0.5% HOAc	10 dips	Rinse, keeps OG in cells	-	✓	-
	0.5% HOAc	10 dips	Rinse, keeps OG in cells	-	✓	-
	EA	8 min	Colors cyto pink-red & green	-	-	✓
	0.5% HOAc	10 dips	Rinse, keeps dyes in cells	-	-	✓
	0.5% HOAc	10 dips	Rinse, keeps dyes in cells	-	-	✓
	0.5% HOAc	10 dips	Rinse, keeps dyes in cells	-	-	✓
	Absolute ethanol	10 dips	Dehydrates	✓	✓	✓
	Absolute ethanol	10 dips	Dehydrates	✓	✓	✓
	Absolute ethanol	10 dips	Dehydrates	✓	✓	✓
	Xylene	10 dips	Clears	✓	✓	✓
	Xylene	10 dips	Clears	✓	✓	✓
	Xylene	10 dips	Clears	✓	✓	✓

* Dilute the OG-6 if, after staining in EA, cytoplasm is stained orange or green, and not pink, orange, or green.

Таблица приведена в [1].

Перевод

Раствор	Время	Назначение	Оценка качества по буккальному мазку		
			Гематоксилин	OG	EA
Вода	10 окупаний	Удаление плёнки Carbowax (полиэтиленгликоля)	-	-	-
Вода	10 окупаний	Смывка плёнки Carbowax (полиэтиленгликоля)	-	-	-
Гематоксилин (Гилл1, Гилл2)	1-2 мин	Окрашивание хроматина (в красный цвет)**	✓	-	-
Вода	10 окупаний	Ополаскивание гематоксилина	✓	-	-
Вода	10 окупаний	Ополаскивание гематоксилина	✓	-	-

Вода	2 мин	Отсинивание красного Al-гематеина	✓	-	-
Вода	10 окунаний	Ополаскивание остатков краски	✓	-	-
OG-6*	10 сек	Окраска кератина в жёлтый цвет	-	✓	-
0.5% HOAc	10 окунаний	Ополаскивание с сохранением OG в клетках	-	✓	-
0.5% HOAc	10 окунаний	Ополаскивание с сохранением OG в клетках	-	✓	-
0.5% HOAc	10 окунаний	Ополаскивание с сохранением OG в клетках	-	✓	-
EA	8 мин	Окрашивание цитоплазмы в розовый и зелёный цвет	-	-	✓
0.5% HOAc	10 окунаний	Ополаскивание с сохранением красок в клетках	-	-	✓
0.5% HOAc	10 окунаний	Ополаскивание с сохранением красок в клетках	-	-	✓
0.5% HOAc	10 окунаний	Ополаскивание с сохранением красок в клетках	-	-	✓
Этанол 100%	10 окунаний	Дегидратация	✓	✓	✓
Этанол 100%	10 окунаний	Дегидратация	✓	✓	✓
Этанол 100%	10 окунаний	Дегидратация	✓	✓	✓
Ксилол	10 окунаний	Просветление	✓	✓	✓
Ксилол	10 окунаний	Просветление	✓	✓	✓
Ксилол	10 окунаний	Просветление	✓	✓	✓

*Разбавьте OG-6, если после окраски в EA, цитоплазма окрашивается в оранжевый и зелёный, а не в розовый, оранжевый и зелёный.

**В нашей практике хроматин окрашивается в фиолетовый цвет см. В [2], р. 166 приводятся микрофотографии препарата до и после отсинивания. Цвет микропрепарата до отсинивания скорее фиолетовый, чем красный, причём, препарат, судя по всему – гистологический, неизвестно, как осуществлялась фиксация.

Комментарии

Методика разрабатывалась, начиная с 1995г. [2], р. 157; опубликована в 1998г. [2], р. 144. Целью разработки было сокращение расходов на тест по Папаниколау.

Отличия методики:

1. Отказ от отсинивающих реагентов (было показано, что водопроводная вода отсинивает ядра в достаточной степени за приемлемое время, как правило, достаточно 2х минут).

2. Промывка в спирте перед ОГ заменена на ополаскивание в водопроводной воде (показано, что это не портит краску ОГ 6).

3. Показано, что окраска в ОГ и ЕА взаимосвязаны: слишком длительная окраска в ОГ (1 мин) и слишком короткая окраска в ЕА, приводят к тому, что красный цвет заменяется на оранжевый. ***.

4. Промывка в 0,5% уксусной кислоте заменяет промывки в спирте после ОГ и ЕА. Кислотный рН удерживает красители в клетках, давая тот же эффект, что и этанол. При этом, рН 0,5% раствора кислоты слишком мал, чтобы удалить гематоксилин.

5. В [2], р169-171 Г. Гилл пишет: «Every silver lining has a cloud, and so it is with staining longer. Staining longer promotes uniform staining in thick areas, but it can also increase the optical density so much that discerning chromatin details becomes impossible.» Здесь «Every silver lining has a cloud» - перевернутая Гарри Гиллом английская поговорка «Every cloud has a silver lining» - У каждой тучи – серебристая окантовка, или, по-русски: «Нет худа без добра». Соответственно, переведем выше приведенную цитату: «Нет добра без худа – так и с увеличением времени окраски. Длительное окрашивание обеспечивает однородное окрашивание в толстых областях, но оно также увеличивает оптическую плотность препарата так сильно, что различить детали строения хроматина становится невозможно.». Выбор времени окрашивания в ЕА при использовании протоколов окраски Г. Папаниколау и – Г. Гилла - выбор компромиссного варианта между прозрачностью препарата и однородного окрашивания цитоплазматическими красками.

*** Г. Гилл считает, что формирование цвета цитоплазмы клеток при окраске ЕА после ОГ идет путем вытеснения эозином оранжевого красителя из цитоплазмы всех клеток, кроме кератинизированных. В дальнейшем эозин из части клеток вытесняется красителем «светло-зелёный SF». В [3] показано, что оранжевый краситель остаётся в клетках после окраски в ЕА и участвует в формировании окраски цитоплазмы, что объясняет эффект взаимозависимости времени окраски в ОГ 6 и ЕА, наблюдавшийся Гиллом.

Литература

1. Gary W. Gill Enviro-Pap: An Environmentally Friendly, Economical, and Effective Pap Stain P. 106 LABMEDICINE _ Volume 37 Number 2 _ February 2006.

2. Gill G. W. Cytopreparation Principles & Practice, стр. 150-151, Springer ISBN: 978-1461449324 с.144, 154-157.

3. Безруков А.В., Кузнецов М.В. К вопросу о формировании цвета цитоплазмы клеток в процессе окраски по Папаниколау.