

Číslo výtlačku:.....

SOP-V-004

## PRÍPRAVA A KRÁJANIE PARAFÍNOVÝCH BLOČKOV

	Meno a funkcia	Dátum	Podpis
<b>Vypracoval:</b>	<b>XXX.</b> pracovník výskumu a vývoja		
<b>Schválil:</b>	<b>XXX</b> riaditeľ		

Číslo revízie	Dátum revízie	Súhrn zmien	Podpis QA

## OBSAH

<b>1. Úvod</b> .....	<b>3</b>
1.1. Cieľ.....	3
1.2. Účel .....	3
1.3. Zaškolenie .....	3
1.4. Definície .....	3
1.5. Zdravotné a bezpečnostné upozornenia: .....	3
1.6. Zodpovednosť: .....	4
<b>2. Materiál a prístrojové vybavenie:</b> .....	<b>4</b>
2.1. Zoznam materiálu:.....	4
2.2. Roztoky a reagenty .....	4
Chemikálie používané v tejto procedúre.....	4
<b>3. Postup</b> .....	<b>5</b>
3.1. Delenie mozgového tkaniva: .....	5
3.2. Presycovanie.....	5
3.3. Zalievanie parafínom.....	7
3.4. Problémy počas presycovania a zalievania tkaniva.....	7
3.5. Krájanie parafínových vzoriek .....	8
3.6. Výskyt problémov počas krájania .....	8
3.7. Kritické body.....	9
3.8. Súvisiace dokumenty.....	9

<b>Prvá slovenská mozgová banka,</b> <b>Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava</b> <b>Tkanivové zariadenie</b>	
Štandardný pracovný postup: <b>PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK</b> Kód: SOP-V-004	Strana: 3 / 9 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

## 1. Úvod

### 1.1. Cieľ

Tento štandardný pracovný postup (skratka SOP z angl. „standard operating procedure“) popisuje postup prípravy parafínových preparátov určených k diagnostike neurodegeneratívnych ochorení.

### 1.2. Účel

Tento SOP je záväzným dokumentom pre všetkých zamestnancov organizácie.

### 1.3. Zaškolenie

XXX je zodpovedná za riadne zaškolenie všetkých pracovníkov.

### 1.4. Definície

#### 1.5. Zdravotné a bezpečnostné upozornenia:

Niekoľko chemikálií vyskytujúcich sa v tomto SOP musia byť používané s opatrnosťou zodpovedajúcou ich charakteru. Preto treba používať laboratórne rukavice, vhodný laboratórny odev a laboratórne okuliare.

#### Xylén (Centralchem, L-00395)

H226 - Horľavá kvapalina a pary  
 H312 - Škodlivý pri kontakte s pokožkou  
 H315 - Dráždi kožu  
 H332 - Škodlivý pri vdýchnutí

#### Bezpečnostné upozornenia:

P280 - Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre

#### Etanol Absolútny (Centralchem, L-00793)

H225 - Vysoko horľavá kvapalina a pary  
 H302 - Zdraviu škodlivý pri požití  
 H371 - Môže spôsobiť poškodenie orgánov

#### Bezpečnostné upozornenia:

P210 - Uchovávajte mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčite  
 P260 - Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/pary/aerosóly

#### Etanol 96% (Centralchem, L-00274 -1L)

H225 - Vysoko horľavá kvapalina a pary  
 H302 - Zdraviu škodlivý pri požití  
 H371 - Môže spôsobiť poškodenie orgánov

#### Bezpečnostné upozornenia:

P210 - Uchovávajte mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčite

<b>Prvá slovenská mozgová banka,</b> <b>Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava</b> <b>Tkanivové zariadenie</b>	
Standardný pracovný postup: <b>PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK</b> Kód: SOP-V-004	Strana: 4 / 9 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

P260 - Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/pary/aerosóly

### 1.6. Zodpovednosť:

XXX je zodpovedná za to, že každý užívateľ tohto SOP je poučený o jednotlivých krokoch procedúry a kritických miestach.

## 2. Materiál a prístrojové vybavenie:

### 2.1. Zoznam materiálu:

Leica ASP 6025  
 Leica HistoCore Arcadia H,C  
 Leica Leica RM2255  
 Paraplast X-tra (napr. Leica, 39603002)  
 pinzety (napr. e-medical, 2688.1)  
 skalpel (napr. Roth, CE25.1)  
 plastové košíky (napr. Jet Cassette II)  
 malé PVC vrecká

### 2.2. Roztoky a reagensy

#### Chemikálie používané v tejto procedúre

**Etanol (50%)** (napr. Centralchem)

- množstvo potrebného alkoholu je dané počtom košíkov so vzorkami.

Tabuľka - príklad riedenia:

Etanol	Objem 1L
Etanol (96%)	500 ml
Milli-Q-voda	500 ml

**Etanol (70%)**(napr. Centralchem)

- množstvo potrebného alkoholu je dané počtom košíkov so vzorkami.

Tabuľka - príklad riedenia:

Etanol	Objem 1L
Etanol (96%)	700 ml
Milli-Q-voda	300 ml

**Etanol (96%)**(napr. Centralchem)

- dodávaný ako 96%

**Etanol Absolútny**

- dodávaný ako absolútny

**Paraformaldehyd 4%**

- pripravovaný firmou AXON Neuroscience R&D Services SE, oddelenie imunohistochemie a dodávaný s výrobným certifikátom

**Xylén čistý** (napr. Centralchem)

- neriedený, dodávaný v požadovanej koncentrácii a zložení

<b>Prvá slovenská mozgová banka,</b> <b>Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava</b> <b>Tkanivové zariadenie</b>	
Standardný pracovný postup: <b>PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK</b> Kód: <b>SOP-V-004</b>	Strana: 5 / 9 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

## Paraplast X-tra (napr. Leica)

- zmes parafínov s teplotou topenia 52°C

## 3. Postup

### 3.1. Delenie mozgového tkaniva:

Po prijatí a rozdelení mozgového tkaniva na pravú a ľavú hemisféru podľa protokolu SOP-V-1, spracujeme ľavú hemisféru nasledovne:

Ľavú hemisféru vyberieme z nádoby s 4% paraformaldehydom a v digestore celú hemisféru rozkrájame na vzorky pozostávajúce zo 16 základných oblastí (Alafuzoff a kol., 2008):

1. Frontálna kôra
2. Temporálna kôra
3. Opaskový závit
4. Parietálna kôra
5. Pre- a post-centrálny závit
6. Okcipitálna kôra
7. Hipokampus – predná časť
8. Hipokampus – zadná časť
9. Predný bazálny mozog
10. Striatum
11. Talamus
12. Stredný mozog
13. Varolov most
14. Predĺžená miecha
15. Mozoček (vermis)
16. Mozoček

+ prípadné ďalšie oblasti potrebné pre dodatočné vyšetrenie

### 3.2. Príprava vzoriek na presycovanie

Jednotlivé vzorky by nemali presahovať veľkosť 1 cm<sup>2</sup> a po odkrojení ich vkladáme do plastových košíkov Jet Cassette II. Každý jeden košík so vzorkou označíme príslušným ID kódom tej danej vzorky pod ktorým je evidovaná v databáze podľa SOP-V-002 a vložíme ho do nádoby s čistou vodou. Po rozkrájaní celej hemisféry, vzorky v nádobe premývame v čistej vode min. 24h. Nádoba je počas tejto doby umiestnená v chladničke pri teplote +4 - +8 °C.

### 3.3. Presycovanie

Proces presycovania začína dehydratáciou tkaniva tzn. tkanivo sa dostatočne odvodní aby mohlo vstrebať maximálne množstvo parafínu. Využívame na to prístroj/zariadenie autotechnicon (Leica ASP6025, SOP-P-005, Obrázok 1 presycovací automat). Program určený na presycovanie mozgového tkaniva trvá 24h.



Obrázok 1 Presycovací automat

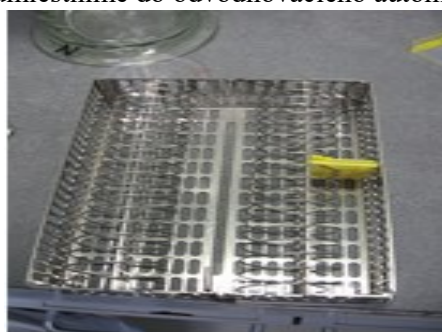
Premyté vzorky v košíkoch vyber a vlož ich do 50% etanolu nariedeného podľa tabuľky na 30 min.

Etanol	Objem 1L
Etanol (96%)	500 ml
Milli-Q-voda	500 ml

Takto pripravené vzorky v košíkoch naskladáme do kovového stojanu, ktorý slúži na usporiadanie a polohovanie vzoriek v odvodňovacom automате. Stojan umiestnime do odvodňovacieho automatu.



Obrázok 2 Plastové košíčky na tkanivo



Obrázok 3 Kovový stojan na plastové košíčky

Na dostatočnú dehydratáciu ľudského mozgového tkaniva a jeho následné presýtenie parafínom používame postup:

Krok	Reagenty	Čas	Teplota	Tlak
1	70 % ethanol	2,30 h	37°C	-
2	96 % ethanol	1 h	37°C	-
3	96 % ethanol	2 h	37°C	-
4	absolute ethanol	1 h	37°C	-
5	absolute ethanol	1,30 h	37°C	-
6	absolute ethanol	2 h	37°C	-
7	xylene	1 h	37°C	-
8	xylene	1 h	37°C	-
9	xylene	2 h	37°C	-
10	Histowax I (Paraplast X-tra)	2 h	56°C	vákuum
11	Histowax II. (Paraplast X-tra)	3 h	56°C	vákuum
12	Histowax III (Paraplast X-tra)	5 h	56°C	vákuum

Po ukončení procesu vzorky vyber a vlož do vopred nahriatej parafínovej zalievачky (Leica HistoCore Arcadia H, SOP-P-004).

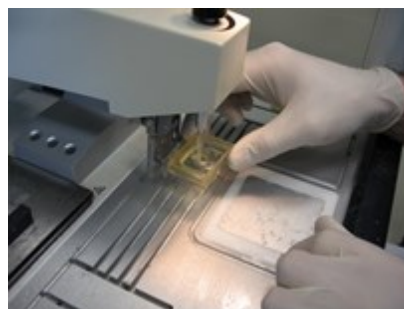
### 3.4. Zalievanie parafínom

Pred procesom zalievania skontroluj množstvo parafínu v prístrojovej zbernej nádobe (kritický bod).

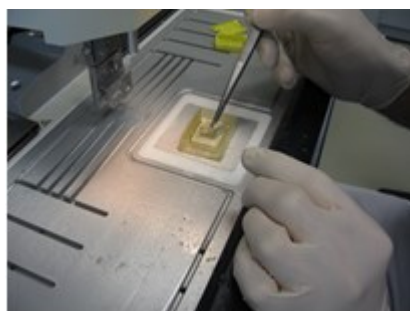
Proces zalievania prebieha rýchlo v parafínovom prístroji (Leica HistoCore Arcadia H). V zbernej nádobe tkanivo nesmie začať schnúť (Obrázok 4 zberná nádoba parafínového automatu). Tkanivo vyber z plastového košíčka a jeho vrchnú pohyblivú krytku odstráň. Do formovacej plastovej nádobky nalej na dno parafín (Obrázok 5 plnenie tvarovacích misiek) v takom množstve, aby bolo dno celé zaliate. Parafín nechaj chvíľku tuhnúť (do 5 sekúnd) a následne na čiastočne zatuhnutý parafín umiestni tkanivo v požadovanej polohe (Obrázok 6 polohovanie mozgového tkaniva). Zvyšok vzorky zalej parafínom tak, aby žiadna časť nevyčnievala. Zaliatu vzorku prikry tou časťou plastového košíčka, na ktorej je označenie vzorky (Obrázok 7 zalievanie vzorky parafínom do plna). Časť s označením musí byť na formovacej nádobe prilepená parafínom tak, aby odtiaľ neodpadla a nedošlo k zámene vzoriek. Takto zaliatu vzorku umiestni na chladiaci panel kde parafín zatuhne.



Obrázok 4 zberná nádoba parafínového automatu



Obrázok 5 plnenie tvarovacích misiek



Obrázok 6 polohovanie mozgového tkaniva



Obrázok 7 zalievanie vzorky parafínom do plna

### 3.5. Problémy počas presycovania a zalievania tkaniva

Počas presycovania môže dôjsť k výpadku prúdu a prístroj sa vypne. Prístroj je nastavený tak, že vzorky ostanú v reagente v ktorom sa nachádzali pred vypnutím prístroja. Ak sa vzorky nevyberú po výpadku elektriny a nepremiestnia do nasledujúceho reagentu v priebehu 2h, budú znehodnotené a celý process je potrebné zopakovať nanovo s novými vzorkami.

Počas zalievania môžu vo vzorke vzniknúť bubliny ktoré je potrebné odstrániť alebo opätovne zaliat vzorku bez bublín. Dôležité je sledovať množstvo parafínu v zbernej nádobe a podľa potreby ho dopĺňať. Ak počas zalievania vyčerpáme celý roztopený parafín, trvá dlhší čas, kým sa nový rozpustí a počas tejto doby nám vzorky môžu začať schnúť a tvrdnúť.

### 3.6. Balenie a skladovanie vzoriek konzervovaných vo forme parafínových bločkov

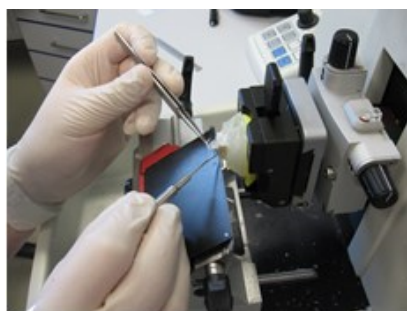
Zatuhnutá vzorka sa opatrne vyberie zo zalievacej formičky. Následne sa vzorka umiestni do samostatného malého uzatvárateľného PVC vrečka, na ktorom je čitateľne napísané/nalepené ID kód vzorky, kód pacienta a zabalené vzorky sa umiestnia do zakladača/boxu pre vzorky v miestnosti určenej na skladovanie vzoriek. Vzorky konzervované vo forme parafínových bločkov sú skladované na izbovej teplote. Teplota v skladovacej miestnosti sa nezaznamenáva, nakoľko parafínové bločky sú stabilné až do teploty 50 °C. Maximálna doba skladovania za takýchto podmienok nie je zatiaľ podľa dostupnej literatúry obmedzená.

### 3.7. Krájanie parafínových vzoriek

Na skrajovanie zafixovanej vzorky používame mikrotóm (Leica RM2255, SOP-P-002). Vzorku upevníme na posuvný stolček (*Obrázok 8 mikrotóm*). Polohovanie vzorky rob podľa tvaru a požadovanej oblasti, ktorú na vzorke chceš skrajovať. Takto pripravenú vzorku najskôr uprav a odstráň nepotrebný parafín čiastočným skrojením povrchovej vrstvy, kým sa nepriblížiš k samotnému tkanivu. Hrúbku rezu tkaniva nastav na 7 µm. Vzorku následne krájaj automaticky podľa nastaveného programu. Odkrojený plátok premiestni pomocou nástrojov (*Obrázok 9 proces krájania*) na hladinu studenej destilovanej vody. Odtiaľ ho pomocou podložného sklíčka prenies na hladinu ohriatej vody (42-48°C) (*Obrázok 11 ohriata voda*). Na hladine ohriatej vody sa tkanivo začne pomaly narovnávať. Počkaj, kým nie je celý rez vyrovnaný.



Obrázok 8 mikrotóm



Obrázok 9 proces krájania



Obrázok 10 krájanie



Obrázok 11 ohriata voda

### 3.8. Výskyt problémov počas krájania

- Počas skrajovania môže dôjsť k chybe prístroja a prístroj nebude dodržiavať zadané parametre (napr. hrúbka rezu, rýchlosť skrajovania, a iné...). V takomto prípade je nutné prestať krájať, prístroj vypnúť a poruchu je nutné nahlásiť a zapísať do prístrojovej knihy/zošita.
- V závislosti od typu tkaniva sa tkanivo môže začať vlniť, alebo sa zle vyrovnáva. V takomto prípade je potrebné vyskúšať rôzne teploty vodného kúpeľa, alebo častejšie meniť žiletku v prístroji.



### 3.9. Kritické body

nasledujúce body sú kritické pre správne vykonanie procedúry:

- dostatočné množstvá reagentov v prístroji Leica ASP 6025. Skontroluj pred každým zapnutím prístroja.
- dostatočné množstvo parafínu X-tra v prístroji Leica HistoCore Arcadia H. Skontroluj pred každým zapnutím prístroja.

## 4. História dokumentu

verzia	od	do	zmena
1.			
2.			

## 5. Súvisiace dokumenty

- Prístrojový manuál Leica RM2255
- Prístrojová kniha k Leica RM2255
- SOP-P-005-odvodňovací automat-obsluha a prevádzka
- SOP-P-004-parafínová zalievačka- obsluha a prevádzka
- SOP-P-002-mikrotóm- obsluha a prevádzka
- SOP-V-001 - Prijem, evidencia a manipulácia s biologickým materiálom (mozgové tkanivo)
- SOP-V-002- Vedenie databázy a evidencia biologického materiálu (mozgové tkanivo)
- Alafuzoff I, Arzberger T, Al-Sarraj S, Bodi I, Bogdanovic N, Braak H et al. (2008) Staging of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease: a study of the BrainNet Europe Consortium. Brain Pathol 18(4):484–496.