

	Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava	
Standardný pracovný postup: PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATÝCH VZORIEK Kód: SOP-V-4		Strana: 1 / 8 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

Číslo výtlačku:.....

SOP-V-4

PRÍPRAVA A KRÁJANIE PARAFÍNOVÝCH BLOČKOV

	Meno a funkcia	Dátum	Podpis
Vypracoval:	Bc. Patrícia Karkušová. <i>pracovník výskumu a vývoja</i>		
Schválil:	Doc. MVDr. Norbert Žilka, DrSc. <i>riaditeľ</i>		

Číslo revízie	Dátum revízie	Súhrn zmien	Podpis QA

	Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava
Standardný pracovný postup: PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK Kód: SOP-V-4	Strana: 2 / 8 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

OBSAH

1. Úvod.....	3
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
2. Materiál a prístrojové vybavenie:	4
2.1. Zoznam materiálu:	4
2.2. Roztoky a reagenty.....	4
Chemikálie používané v tejto procedúre	4
3. Postup	5
3.1. Delenie mozgového tkaniva:	5
3.2. Presycovanie	5
3.3. Zalievanie parafínom	6
3.4. Problémy počas presycovania a zalievania tkaniva	7
3.5. Krájanie parafínových vzoriek	7
3.6. Výskyt problémov počas krájania	8
3.7. Kritické body.....	8
3.8. Súvisiace dokumenty	8

	Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava	
Standardný pracovný postup: PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK Kód: SOP-V-4		Strana: 3 / 8 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

1. Úvod

1.1. Cieľ

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

1.2. Účel

Tento SOP je záväzným dokumentom pre všetkých zamestnancov organizácie.

1.3. Zaškolenie

Bc. Patrícia Karkušová 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 - Uchovávať 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 - Uchovávať mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčite

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

	Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava
Standardný pracovný postup: PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK Kód: SOP-V-4	Strana: 4 / 8 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

1.6. Zodpovednosť:

Bc. Patrícia Karkušová 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 reagenty

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

Paraplast X-tra (napr. Leica)

- zmes parafínov s teplotou topenia 52°C

	Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava	
Standardný pracovný postup: PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK Kód: SOP-V-4		Strana: 5 / 8 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

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 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

Jednotlivé vzorky by nemali presahovať veľkosť 1 cm² 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-2 a vložíme ho do nádoby s čistou vodou. Po rozkrájaní celej hemisféry, vzorky v nádobe premývame v čistej vode min. 24h. Nádobu je počas tejto doby umiestnená v chladničke.

3.2. 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-IOM-5, Obrázok 1 presycovací automat). Program určený na presycovanie mozgového tkaniva trvá 24h.



Obrázok 1 Presycovací automat

Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava	
Standardný pracovný postup: PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK Kód: SOP-V-4	Strana: 6 / 8 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

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 automate. 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,C,SOP-IOM-4).

3.3. Zalievanie parafínom

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

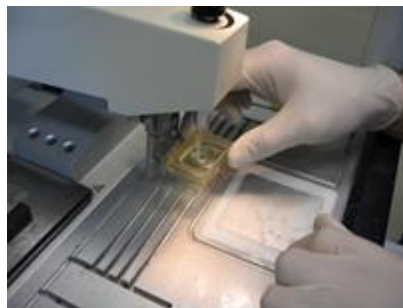
Proces zalievania prebieha rýchlo v parafínovom prístroji (Leica HistoCore Arcadia H). V zbernej nádobe tkanivo nesmie začať schnúť (Obrázok 4 zberná nádoba parafínového automatu). Tkanivo vyber z plastového košíčka a jeho vrchnú pohyblivú krytku odstráň. Do formovacej plastovej nádoby nalej na dno parafín (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 doplna). Časť s označením musí byť na

	Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava
Standardný pracovný postup: PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK Kód: SOP-V-4	Strana: 7 / 8 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

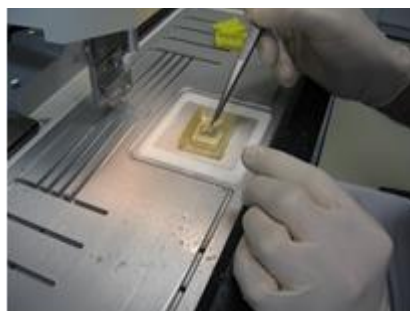
formovacej nádobe prilepená parafínom tak, aby odtiaľ neodpadla a nedošlo k zámene vzoriek. Takto zaliatu vzorku umiestni na chladiaci panel kde parafín zatuhne. Zatuhnutú vzorku umiestni do samostatného malého uzatvárateľného PVC vrečka, na ktorom je čitateľne napísané/nalepené ID kód vzorky a umiestni do zakladača pre vzorky.



Obrázok 4 zberná nádoba parafínového automatu



Obrázok 5 plnenie tvarovacích misiek



Obrázok 6 polohovanie mozgového tkaniva



Obrázok 7 zalievanie vzorky parafínom do plna

3.4. 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 zaliať 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 môžeme začať schnúť a tvrdnúť.

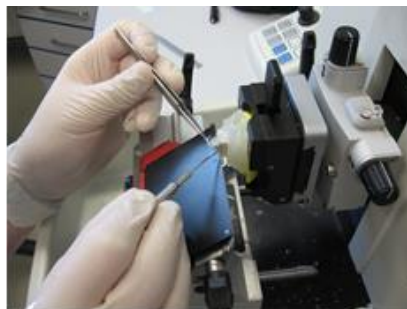
3.5. Krájanie parafínových vzoriek

Na skrajovanie zafixovanej vzorky používame mikrotóm (Leica RM2255, SOP-IOM-2). 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.

	Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava
Standardný pracovný postup: PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK Kód: SOP-V-4	Strana: 8 / 8 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018



Obrázok 8 mikrotóm



Obrázok 9 proces krájania



Obrázok 10 krájanie



Obrázok 11 ohriata voda

3.6. 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.

3.7. 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.

3.8. Súvisiace dokumenty

- Prístrojový manuál Leica RM2255
- Prístrojová kniha k Leica RM2255
- SOP-IOM-5-odvodňovací automat-obsluha a prevádzka
- SOP-IOM-4-parafinová zalievacia- obsluha a prevádzka
- SOP-IOM-2-mikrotóm- obsluha a prevádzka
- SOP-V-1 - Prijem, evidencia a manipulácia s biologickým materiálom (mozgové tkanivo)
- SOP-V-2- 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.