

UKLAPANJE U PARAFIN

TEORIJSKE POSTAVKE: Ova metoda koristi se za prožimanje tkiva parafinom te oblikovanje parafinskog bloka, što omogućuje izradu parafinskih rezova. Rezovi se potom mogu obojati standardnim histološkim metodama bojenja ili upotrijebiti za razne imunohistokemijske i molekularno biološke reakcije.

MATERIJALI:

parafin¹
parafinsko ulje
filter papir
metalne ili porculanske šalice
embrio posudice²
drveni blokovi
piceta
igla
plamenik
skalpel

INSTRUMENT:

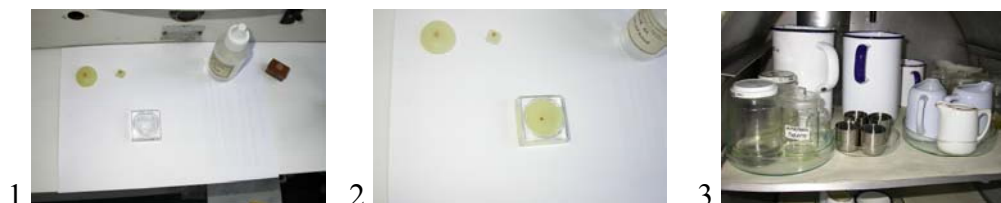
termostat

POSTUPAK:

1. Nakon prethodne fiksacije i dehidracije tkivo se obično nalazi u tzv. intermediju. Najčešće se u tu svrhu koristi ksilol. Tkivo se mora prožeti intermedijem sve dok ne padne na dno posude odnosno ne postane prozirno³.
2. Uzorak tkiva prebaciti u posudicu s mješavinom ksilola i parafina (1:1) (termostat, 56° C 10 min.)⁴.
3. Tkivo staviti u posudicu s parafinom. Nakon sat vremena, tkivo prebaciti u svježi parafin. Parafin u kojem je prethodno bilo tkivo se filtrira ili, ovisno o čistoći i konzistenciji, više ne rabi. Ponoviti postupak nakon sat vremena (ukupno 3 svježih parafina, svaki po sat vremena, sve u termostatu koji osigurava da parafin bude tekuć).
4. Uklopiti tkivo. U tu svrhu koristi se embrio posudica prethodno namazana parafinskim uljem na sobnoj temperaturi. Uliti u posudicu tekući profiltrirani ili svježi parafin. Izvaditi tkivo iz termostata (iz posudice s parafinom u kojem je tkivo) te tkivo uroniti u embrio posudicu⁵.
5. Tkivo postaviti u središte embrio šalice pomoću prethodno lagano zagrijane anatomske pincete (koristiti plamenik). Dodatno se položaj može ispraviti korištenjem iglice ili/i pincete.
6. Embrio posudicu zajedno s parafinom staviti u bazen s vodovodnom hladnom

vodom. Blok se tom prilikom (zbog stvrdnuća parafina) često sam odvoji od stijenke embrio posudice. U protivnom slučaju, lagano istisnuti blok iz udubljenog dijela embrio posudice.

7. Osušiti blok pamučnom krpom (glatke površine).
8. Oblikovati blok koristeći skalpel (opasnost od povrede!). Izrezati što je moguće veći suvišak parafina i formirati 4-stranu piramidu bez vrha.
9. Postaviti blok na drveni podložak. U tu svrhu na podložak nakapati malo tekućeg parafina i odmah potom postaviti prethodno oblikovani blok. Uroniti u bazen s hladnom vodovodnom vodom kako bi se parafin što prije stvrdnuo.
10. Pohraniti blok (najbolje na 4° C, osobito ako se planiraju imunohistokemijske reakcije). Uoči rezanja također je poželjno blok staviti na par sati u hladnjak na 4° C.



Slika 1. Priprema za uklapanje tkiva. Vidi se staklena embrio posudica namazana parafinskim uljem.
 Slika 2. Svježe uklopljeno tkivo (u sredini embrio posudice). Lijevo se nalazi jedan neoblikovani i jedan oblikovani parafinski blok.
 Slika 3. Unutrašnjost termostata s posudicama za parafin.

PROBLEM	MOGUĆI UZROCI	PREPORUKA
Blok se ne odvaja od embrio posudice	Udubljeni dio embrio posudice nije dobro namazan parafinskim uljem	Obilnije namazati parafinsko ulje na embrio posudicu prije uklapanja
Blok ne prijanja na drveni podložak	Parafin nanesen na podložak prije prijanjanja bloka s tkivom se prerano stvrdnuo.	Skalpelom odstraniti blok s tkivom te suvišak parafina i ponoviti korak 9
Parafin u termostatu nije tekuć	Nedovoljno visoka temperatura ili oštećenje termostata	Prekontrolirati visinu temperature u termostatu i njegov rad

¹Parafini imaju različito talište. Ukoliko to eksperimentalni uvjeti zahtjevaju (detekcija izrazito termolabilnih molekula i sl.) preporučuju se parafini niskog tališta (tzv. low-melting)

²Umjesto embrio posudica mogu se koristiti komercijalni plastični blokovi različitih veličina

³Ovaj korak ovisi o veličini tkiva i traje 10-30 min. (katkada i dulje) te se odvija na sobnoj temperaturi.

⁴Uobičajena temperatura u termostatu je 56° C.

⁵Katkada je neobično važno pravilno orijentirati tkivo u smjeru gore-dolje. U slučaju embrio posudice, prvo će se rezati dijelovi tkiva koji gledaju prema dnu posudice. U slučaju izrade serijskih rezova (npr.

analiza neke strukture, embrija, regije mozga i sl.) orijentaciji tkiva unutar parafinskog bloka treba posvetiti posebnu pažnju.

PRIPREMIO: Dr. sc. Davor Ježek