

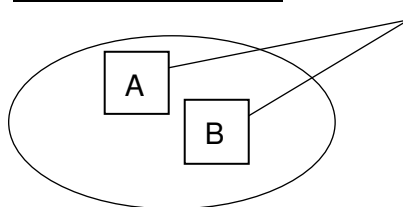
Anleitung zur Asservierung von Tumorgewebe

(Ausnahme: NHL-Studie: Aufarbeitung gemäß der Vorgabe der Studie, s. dort)

A. Benötigtes Material

1. diese Anleitung
2. Tumorgewebe-Set:
 - 20 Superfrost-Objektträger für Tumortupfpräparate
 - 5 Objektträger-Boxen
 - 1 50 ml Becher für das Handling mit flüssigem Stickstoff
 - 7 1,8 ml Standröhrchen für tiefgefrorenes Frischgewebe (6 x ROT für Tumor, 1 x GRÜN für Normalgewebe)
 - 1 5 ml Citrat-Monovette für Vergleichsblut (DNA-Extraktion)
 - 1 Einsendebogen
3. Bleistift und Permanentmarker (fein) zum Beschriften von Objektträgern und Röhrchen
4. Tumorbox
5. Sterile Kompressen, Skalpell, Pinzette, Handschuhe, Deuwer-Gefäß für Stickstoff
Die Sicherheitsvorschriften beim Arbeiten mit flüssigem Stickstoff müssen eingehalten werden.

B. Vorgehensweise



A und B werden jeweils in vier gleiche Stücke geteilt mindestens zwei Tumorstücke A/B sollten von morphologisch unterschiedlichen Arealen entnommen werden.

1	2
3	4

- 1 bevor das Tumorstück in Formalin fixiert wird (für Histologie, örtlicher Pathologe), 10 Tupfpräparate (z. B. für FISH) machen
- 2,3,4 Einfrieren in flüssigem Stickstoff

Resektabler Tumor:

1. Aufteilen des Tumormaterials

Gemeinsam mit dem zuständigen Pathologen Tumor aufschneiden, der Pathologe soll die Aufteilung des Tumors vornehmen. Gewebeproben aus unterschiedlichen, aber mindestens zwei repräsentativen Arealen gewinnen **A** und **B** (Größe 1 cm³, wenn möglich mehr Tumorstücke gewinnen: **C**, **D** etc.; nicht vom Tumorrand (Resektionsränder!), kein Bindegewebe, keine nekrotischen Bezirke asservieren, beim Neuroblastom noduläre Areale immer asservieren). Falls mehr Stücke (C, D) gewonnen werden, neues Tumor-Röhrchenset verwenden. Die Stücke dann jeweils in 4 gleiche Stücke **A1**, **A2**, **A3**, **A4** und **B1**, **B2**, **B3**, **B4** (**C1**, **C2**, **C3**, **C4** etc.) teilen. Vor der Weiterverarbeitung vorsichtig steril Blut vom Tumorgewebe abtupfen. Dabei sind **A1**, **B1** etc. für Tupfpräparate und die histologische Aufarbeitung beim örtlichen Pathologen vorgesehen. **A2**, **A3**, **A4** etc. wird schockgefroren. So schnell wie möglich verarbeiten (optimal: innerhalb von 30 Minuten nach der chirurgischen Entnahme). Dauer sollte auf dem Einsendebogen vermerkt werden. Übriges Tumorgewebe für die histologische Diagnostik in Formalin geben (örtlicher Pathologe). Falls bei einem größeren Operationspräparat der Pathologe nicht das gesamte restliche Tumorgewebe zur Diagnostik braucht, übrig gebliebenes Tumorgewebe klein schneiden, in 50 ml Becher einfrieren und versenden. Welches Tumorgewebe zusätzlich eingefroren werden kann, entscheidet der Pathologe!

2. Frischgewebe schockgefrieren

50 ml Becher mit flüssigem Stickstoff füllen und Deckel locker auflegen, damit die Verdunstung gering bleibt, jedoch auch kein Druck entsteht.

1,8 ml Standröhrchen (rot) mit Namen, Geburtsdatum, Operationsdatum und Tumorlokalisierung (**A2**, usw.) beschriften.

Geschlossene Röhrchen im Deuwer mit flüssigem Stickstoff vorkühlen.

Kompressen, Pinzette und Skalpell steril auspacken und bereitlegen.

Sterile Handschuhe anziehen (zum Schutz des Gewebes vor RNAsen an den Händen und zur Erhaltung der Sterilität)

Tumorteile **A**, **B** in 4 Teile **A1**, **A2**, **A3**, **A4**, **B1**, **B2**, **B3** und **B4** teilen (s. Skizze) und **A2**, **A3**, **A4**, **B2**, **B3**, und **B4** rasch, steril schockgefrieren. Falls die Stücke nicht in die Röhrchen passen teilen bzw. in kleine Stücke schneiden.

Schockgefrieren des Gewebes durch Fallenlassen der Tumorstücke in den flüssigen Stickstoff (im 50ml Becher). Dabei *nicht* mit der Pinzette eintauchen, weil dabei das Tumorgewebe an der Pinzette haften bliebe. Darauf achten, dass die Gewebestücke *nicht* an der Wand des 50 ml Bechers haften.

Schockgefrorenes Tumorgewebe aus dem 50ml Becher in die roten vorgekühlten 1,8 ml Röhrchen transferieren, dabei nach **A** und **B** trennen, verschließen (Schraubdeckel) und im flüssigen Stickstoff gefroren halten.

3. Herstellung von Tupfpräparaten und Formalinfixierung von Gewebe

2 Gefäße für die Histologie mit Namen, Geburtsdatum und Operationsdatum beschriften und mit gepufferter 4%iger Formalinlösung füllen. (Diese Gefäße sind nicht im Tumorgewebe-Set enthalten.)

Von den Tumorteilen **A1** und **B1** jeweils zehn Tumortupfpräparate herstellen. *Behutsames* Abtupfen der oberflächlichen Zellschicht der Tumorprobe auf *Superfrost-Objekträger* (ca. 4-6 Tupfungen pro Objekträger, max. 10 Objekträger pro Stück, nicht wischen). Präparate beschriften und lufttrocknen.

Danach die Tumorteile **A1** und **B1** unzerkleinert (!) in je 1 Histologiegefäß mit 4%iger Formalin-Lösung einbringen für die örtliche Pathologie zur histologischen Aufarbeitung und Bestimmung des Tumorzellgehalts.

Nichtresektabler Tumor:

1. Aufteilung des Tumormaterials

Die Aufteilung des Tumorgewebes hängt von der Größe der Biopsie ab und soll vom *Pathologen* vorgenommen werden. Falls möglich, sollte der Chirurg beim Neuroblastom 2 unterschiedliche Areale **A** und **B** (Größe ca. 1cm³) entnehmen. Vor der Weiterverarbeitung vorsichtig und steril Blut vom Tumorgewebe abtupfen. Abhängig von der Biopsiegröße einen Teil für die histologische Diagnostik asservieren und restliche Tumorteile tiefgefrieren (s. o.). Bei kleinen Biopsien entscheidet der Pathologen, wie viel Gewebe eingefroren werden kann, was möglichst geschehen sollte.

2. und 3.

Verfahren wie bei resektablem Tumor.

C. Gewinnen von Vergleichs-DNA und Leukozyten aus Citratblut und/oder Normalgewebe

Blut:

5-10 ml Begleitblut vom Patienten in Vacutainer-Citrat-Monovetten (**grün**) gewinnen, gut durchmischen (nicht schütteln) und unsepariert im Thermogefäß mit flüssigem Stickstoff einfrieren.

Tumorarten: alle

Normalgewebe:

Wenn bei der gleichen Operation (z.B. Nephrektomie, Leberteilresektion) normales Gewebe aus chirurgisch technischen Gründen mitentfernt werden **muss**, eignet sich dies noch besser als Vergleichsgewebe. **Das darf aber keinesfalls zu einer zusätzlichen Resektion oder Erweiterung der Resektionsränder führen.**

Tumorarten: alle

Das Vergleichsgewebe wird wie das Tumorgewebe im **grünen** Röhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

D. Versand

1. Einsendebogen vollständig ausfüllen und mit dem Material in der Tumorbox an das zuständige Labor senden.
2. Tumorteile **A1** und **B1** bzw. **C1**, **D1** usw. (in 4% Formalin) und übriges Tumorgewebe vom zuständigen örtlichen Pathologen befunden lassen, mit der Bitte um Referenzhistologie.
3. Schockgefrorene Tumorteile **A2**, **A3**, **A4** sowie **B2**, **B3**, **B4** (evtl. **C2**, **C3**, **C4** etc.) und Vergleichsblut bzw. Normalgewebe bis zum Versand bei -70 bzw. -80°C oder in flüssigem Stickstoff lagern. Der Versand erfolgt per Express tiefgefroren auf Trockeneis in der Tumorbox an das zuständige molekulargenetische Labor. Die gesamte Kammer der Tumorbox muss mit Trockeneis aufgefüllt werden. Die luftgetrockneten Tumortupfpräparate und evtl. Serum, Knochenmark im Deckel der Tumorbox (nicht auf Trockeneis) beilegen.

Achtung: NHL-Studie: Knochenmark + EDTA-Blut getrennt direkt nach Entnahme über Nacht versenden.

E. Adressen:

Hirn- und Lebertumoren:

Prof. Dr. T. Pietsch
Institut für Neuropathologie der Universität Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25
53105 Bonn
Tel.: 0228-287-14332

Nierentumoren:

Prof. Dr. M. Gessler
Institut für Entwicklungsbiochemie
Biozentrum der Universität Würzburg
Am Hubland
97074 Würzburg
Tel.: 0931-318 4159

Neuroblastom, Keimzelltumoren,

seltene embryonale Tumoren:

Prof. Dr. F. Berthold
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin -
Zentrum für Kinderonkologie - Gebäude 26
Kerpener Str. 62
50924 Köln
Tel.: 0221-478 6843

CWS-Studie:

PD Dr. E. Koscielniak
Olgaspedial Stuttgart
Onkologisches Labor
Bismarckstr. 8
70176 Stuttgart
Tel.: 0711-27873504

Langerhanszell-Histiozytose:

St. Anna Kinderspital
Kinderspitalgasse 6
A-1090 Wien
Tel.: +43-40170476
Fax: +43-40170430
e-mail: LCH@stanna.at

Non-Hodgkin-Lymphome:

Prof. Dr. A. Reiter
Zentrum für Kinderheilkunde
Hämatologie und Onkologie
Feulgenstr. 12
35392 Gießen
Tel.: 0641-9943508