

# Anleitung zur Asservierung von Tumorgewebe und Vergleichsgewebe von Patienten der GPOH-Hirntumorstudien

## A. Benötigtes Material

### 1. diese Anleitung

### 2. Tumorgewebe-Set:

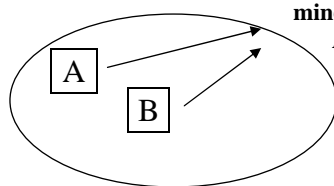
- 20 Superfrost-Objektträger für Tumortupfpräparate
- 5 Objektträger-Boxen
- 1 50 ml Becher für das Handling mit flüssigem Stickstoff
- 7 1,8 ml Standröhrchen für tiefgefrorenes Frischgewebe (6 x ROT für Tumor, 1 x GRÜN für Normalgewebe)
- 1 5 ml Citrat-Monovette für Vergleichsblut
- 1 Einsendebogen

### 3. Bleistift und Permanentmarker (fein) zum Beschriften von Objektträgern und Röhrchen

### 4. "Biocase" (über das Kompetenznetz der GPOH erhältlich, falls noch nicht vorhanden)

### 5. Sterile Kompressen, Skalpell, Pinzette, Handschuhe (im Operationssaal vorrätig)

## B. Vorgehensweise



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

1	2
3	4

- 1 bevor das Tumorstück in Formalin fixiert wird (für Histologie) mind. 10 Tupfpräparate (z. B. für FISH) herstellen
- 2, 3, 4 Einfrieren in flüssigem Stickstoff oder bei  $-70^{\circ}$

## Resektabler Tumor:

### 1. Aufteilen des Tumormaterials

Gemeinsam mit dem zuständigen Pathologen Tumor aufschneiden und Gewebeprobe aus unterschiedlichen, aber mindestens zwei repräsentativen Arealen gewinnen **A** und **B** (Größe  $1\text{ cm}^3$ , wenn möglich mehr: **C**, **D** etc.; nicht vom Tumorrand, kein Bindegewebe, keine nekrotischen Bezirke asservieren). Falls mehr Stücke (**C**, **D**) gewonnen werden, neues Tumor-Röhrchenset verwenden. Die Stücke dann jeweils in 4 repräsentative 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. So schnell wie möglich verarbeiten (optimal: innerhalb von 20 Minuten nach der chirurgischen Entnahme).

### 2. Herstellung von Tupfpräparaten und Asservierung von Gewebe für die histologische Diagnose

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, aber in jedem Operationssaal vorhanden). Von den Tumorteilen **A1** und **B1** jeweils mindestens zehn Tumortupfpräparate herstellen. Behutsames Abtupfen der oberflächlichen Zellschicht der Tumorprobe auf Superfrost-Objektträger (ca. 6 - 8 Tupfungen pro Schnittfläche, max. 10 Objektträger 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 und dem Pathologen übergeben.

### 3. 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 (**A**, **B**) beschriften. Danach aufschrauben. Deckel auf sterile Komresse legen, Röhrchen im Thermogefäß 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 **A2**, **A3**, **A4**, **B2**, **B3** und **B4** rasch, steril und RNase-frei in kleine Stücke schneiden (ca. 5 mm Kantenlänge). Dadurch wird ein gleichmäßiges, rasches Durchfrieren ermöglicht. Schockgefrieren des Ge-

webes durch Einfallen-Lassen der kleingeschnittenen Tumorstücke in den flüssigen Stickstoff (im 50 ml 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. Aus vorgekühlten 1,8 ml Röhrchen flüssigen Stickstoff dekantieren. Dabei darauf achten, daß sich kein flüssiger Stickstoff mehr im 1,8 ml Röhrchen befindet! Schockgefrorenes Tumorgewebe aus dem 50 ml Becher in die roten 1,8 ml Röhrchen transferieren, dabei nach **A** und **B** trennen, verschließen (Schraubdeckel) und im flüssigen Stickstoff gefroren halten.

Auf dem Einsendebogen die Dauer vom Zeitpunkt der Entnahme des Tumorgewebes bis zum Einfrieren notieren.

### **Nichtresektabler Tumor:**

#### **1. Aufteilung des Tumormaterials**

Unter Einbeziehung eines Pathologen von unterschiedlichen Arealen mindestens 2 repräsentative Tumorstücke **A** und **B** (Größe ca. 1 cm<sup>3</sup>) entnehmen (nicht vom Tumorrand, möglichst kein Bindegewebe, keine nekrotischen Bezirke asservieren). Vor der Weiterverarbeitung vorsichtig und steril Blut vom Tumorgewebe abtupfen. **A** und **B** in jeweils 4 repräsentative Tumorstücke **A1, A2, A3, A4** und **B1, B2, B3, B4** teilen.

#### **2. und 3.** Verfahren wie bei resektablem Tumor.

Falls bei einem größeren Operationspräparat der Pathologe nicht das gesamte restliche Tumorgewebe zur Diagnostik braucht, übrig gebliebenes Tumorgewebe kleinschneiden, in 50 ml Becher einfrieren und versenden. Welches Tumorgewebe zusätzlich eingefroren werden kann, entscheidet der Pathologe !

### **C. Gewinnen von Vergleichs-DNA aus Citratblut**

#### **Blut:**

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

### **D. Versand**

1. Einsendebogen vollständig ausfüllen und mit dem Material im Biocase verschicken.
2. Tumorteile **A1** und **B1** bzw. **C1, D1** usw. (in 4% Formalin) und bei resektablem Tumor restliches Tumorgewebe vom zuständigen örtlichen Pathologen befunden lassen.
3. Schockgefrorene Tumorteile **A2, A3, A4** sowie **B2, B3, B4** (evtl. **C2, C3, C4** etc.) und Vergleichsblut bis zum Versand bei -70°C oder in flüssigem Stickstoff lagern. Der Versand erfolgt tiefgefroren auf Trockeneis im "Biocase". Zehn luftgetrocknete Tumortupfpräparate und evtl. Serum im unteren Fach des Biocase (nicht auf Trockeneis) beilegen.