

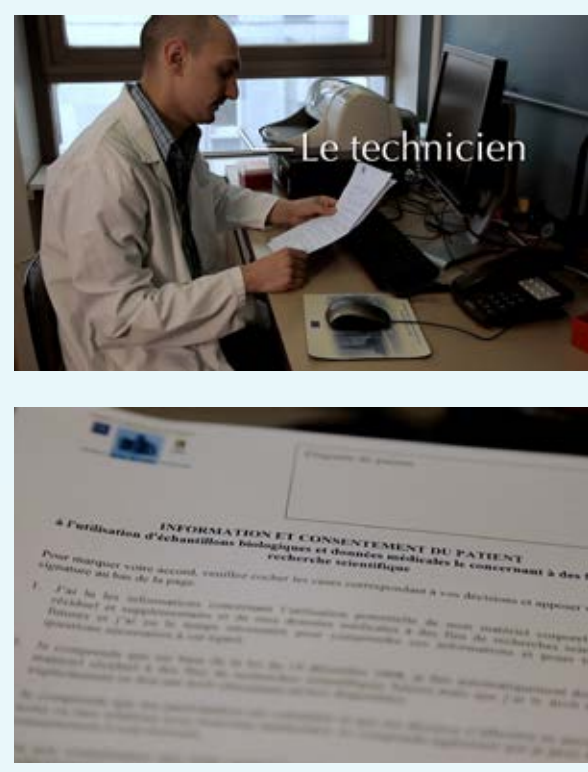
DIE VERBESSERUNG DER TRANSLATORISCHEN FORSCHUNGSPROBENENTNAHME IN INTERNATIONALEN STUDIEN

Beachten Sie Standardarbeitsanweisungen bei der Dokumentation der von Ihnen verwendete Methode. Stellen Sie sicher, dass sich nachvollziehen lässt, wer was wann wie getan hat!

Was ist vor der Probennahme zu beachten?

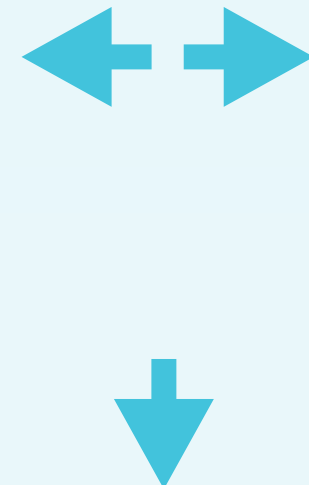
Was ist während der Probenhandhabung zu beachten?

What to do after sample handling?



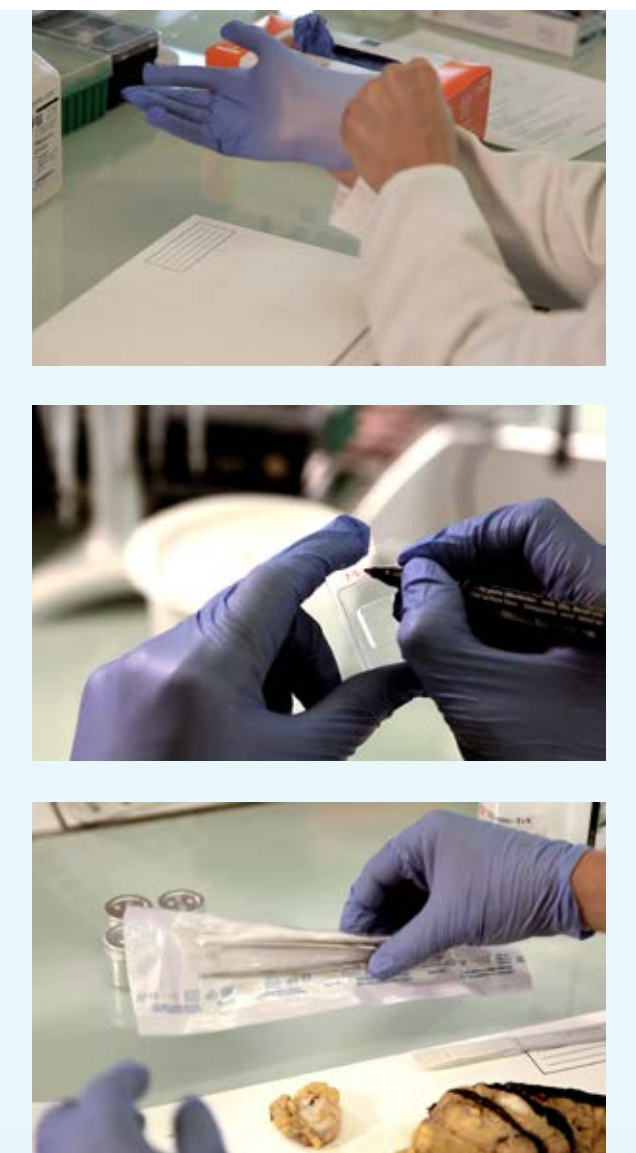
Wichtige Kommunikation:

- Vor der Entnahme von Proben ist es von besonderer Bedeutung, die für die Probensammlung zuständigen Personen zu verständigen. Dabei kann es sich um Chirurgen, Pflege- oder Röntgenpersonal handeln, je nach Art und Herkunft der Gewebeprobe, die Sie entnehmen möchten.
- Es ist unbedingt darauf zu achten, dass sich das zuständige Personal versichert hat, dass der/die Patient/in mit der Probenentnahme zu Forschungszwecken einverstanden ist.



Wichtige Empfehlungen:

- Tragen Sie stets Handschuhe
- Verwenden Sie sterile, DNase- und RNase-freie Materialien/Instrumente.
- Verwenden Sie niemals dasselbe Material / dieselben Instrumente für die Entnahme von Proben aus normalem und aus Tumorgewebe.
- Entnehmen Sie keine Proben aus makroskopisch sichtbar nekrotischen Bereichen.
- Versuchen Sie, bei der Entnahme von Proben aus normalem Gewebe einen möglichst großen Abstand zum Tumorgewebe einzuhalten und vermeiden Sie, ausschließlich Fettgewebe für die Gewinnung normaler Gewebeprobe zu entnehmen (es sei denn, dies ist beabsichtigt).
- Entnehmen Sie niemals Gewebeprobe zu Forschungszwecken, ohne vorher überprüft zu haben, dass die entsprechende Einverständniserklärung des Patienten vorliegt.

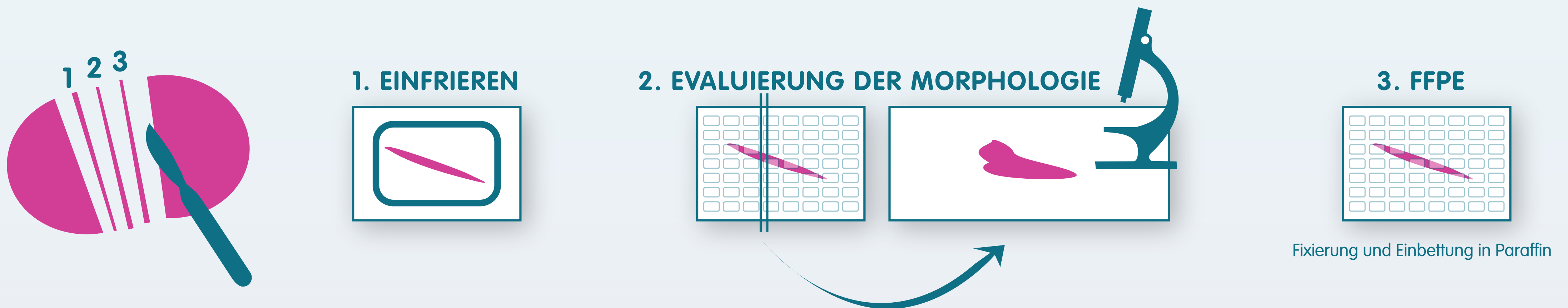


Sobald die Gewebeprobe entnommen ist:

- Schicken Sie das Gewebe umgehend an das Labor. Es ist von zentraler Bedeutung, dass die kalte Ischämiezeit so kurz wie möglich gehalten wird, anzustreben ist eine Bearbeitungszeit von weniger als 30 Minuten nach Probenentnahme.
- Die Zeitspanne zwischen der Probenentnahme und dem Einfrieren sollte möglichst in Echtzeit aufgezeichnet werden.
- Die Probenröhrchen sollten mit dem Code-Namen des Patienten mit Hilfe eines wasserfesten und kälteresistenten Markers beschriftet werden.
- Von großer Bedeutung ist es, die Probe nach oder während der Entnahme nicht zu quetschen oder zu fragmentieren. Gewebeprobe sollten generell sanft und mit großer Sorgfalt behandelt werden.

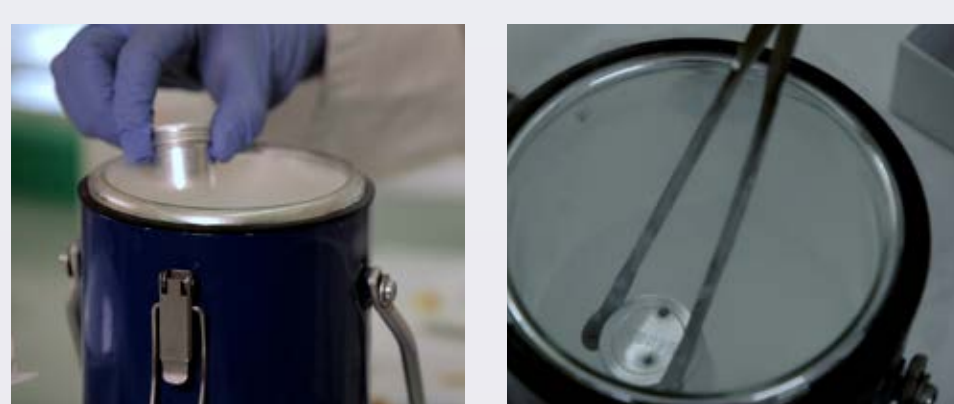
Achten Sie bei der Probennahme auf die Spiegelsymmetrie!

- Das bedeutet, dass ein Gewebeschnitt für die morphologische Bewertung herangezogen wird und Schnitte des benachbarten Gewebes auf beiden Seiten des für die morphologische Bewertung verwendeten Objektträgers eingefroren beziehungsweise fixiert und in Paraffin eingebettet werden.
- Die Spiegelsymmetrie der Schnitte ist wichtig, um Unterschiede zwischen den gefrorenen und den entsprechenden fixierten Proben aus ein und demselben Tumor zu minimieren.



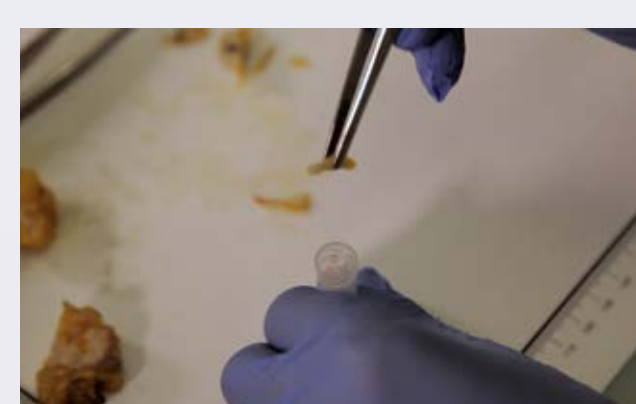
Drei Methoden stehen für das Gefrieren von Gewebe zur Auswahl:

DIE VERWENDUNG VON FLÜSSIGSTICKSTOFF:



- Das Gewebe wird in Flüssigstickstoff bei Temperaturen zwischen -160 und -190°C schockgefroren, danach werden die Proben in einem -80°C Gefrierschrank gelagert.
- Der Hauptnachteil dieser Methode liegt darin, dass Gefrierbrandartefakte entstehen können.
- Der Hauptvorteil liegt in ihrer Einfachheit und relativen Schnelligkeit.

DIE VERWENDUNG VON RNALATER:



- Zunächst wird die Probe in RNAlater eingetaucht.
- Danach kann die Probe einige Tage lang bei Raumtemperatur oder bei 4-5°C im Kühlschrank aufbewahrt werden, bevor sie einige Wochen bei -20°C gelagert wird, um schließlich in einen -80°C Gefrierschrank transferiert zu werden.
- Am besten kühlt man das RNAlater-behandelte Gewebe langsam herunter. Die Probe sollte möglichst klein sein, damit das RNAlater die gesamte Probe durchdringen kann.
- Der Hauptnachteil dieser Methode liegt in der Schwierigkeit, die Morphologie richtig zu bewerten, insbesondere in Bezug auf Lymphozyteninfiltration.
- Der wichtigste Vorteil dieser Methode ist die hervorragende RNA-Konservierung. Damit fällt die Notwendigkeit weg, für den Erhalt der RNA Trockeneis oder flüssigen Stickstoff zu benutzen, was den Umgang mit der Probe allgemein vereinfacht.

DIE VERWENDUNG VON OCT:



- Aus Gründen des Gefrierschutzes wird das Gewebe in OCT eingetaucht und anschließend in einem -80°C Gefrierschrank gelagert.
- Wichtig ist, dass das Gewebe luftblasenfrei im OCT-Medium eingebettet ist.
- Die Gewebeprobe sollte möglichst flach sein und zentral platziert werden; es sollte darauf geachtet werden, nicht zu viel OCT hinzuzufügen.
- Danach wird die Probe zur Aufbewahrung bei -80°C gelagert.
- Ein großer Vorteil dieser Methode ist der Schutz gegen Gefrierbrandartefakte; außerdem bleibt die Gewebemorphologie gut erhalten, selbst wenn die Probe aufgetaut und wieder eingefroren wird, z. B. während eines Probentransport von einem Aufbewahrungsort zum anderen.
- Ein Nachteil dieser Einfriermethode ist jedoch, dass das Einbettmedium PCR-Reaktionen stören kann.

Das Fixieren der Probe in Formalin:

- Tragen Sie stets Handschuhe.
- Die kalte Ischämiezeit ist so kurz wie möglich zu halten, fixieren Sie die Probenkerne oder Proben so rasch wie möglich in Fixiermittel!
- Zur Fixierung wird am häufigsten gepuffertes Formalin verwendet. Verwenden Sie bitte gepuffertes Formalin, um Ihre Proben gut zu fixieren.
- Wenn Sie ein anderes Fixiermittel als Formalin verwenden, testen Sie es bitte, bevor Sie es routinemäßig benutzen! Abschließend beachten Sie bitte, dass die Fixierungszeit idealerweise zwischen 6 und 48 Stunden liegt. Zu kurze Fixierungszeiten kann für die Epitop-Erkennung durch den Antikörper genauso problematisch sein wie zu lange Fixierung!

Nachdem die Proben eingelagert wurden:

- Erwägen Sie zumindest zwei Mal pro Jahr eine Qualitätskontrolle der DNA, RNA und der Proteine von mindestens 1% Ihrer (zufällig ausgewählten) Proben, wenn die Proben zu Forschungs- oder Diagnosezwecken genutzt werden sollen.
- Benutzen Sie außerdem Trockeneis für den Transport der Proben, um unnötiges Auftauen zu vermeiden.
- Stellen Sie sicher, dass sämtliche verwendeten Instrumente und Materialien, soweit nötig, validiert sind.
- Eine kontinuierliche Temperaturüberwachung aller wichtigen Kühlschränke und Gefriermaschinen mit einem direkt angeschlossenen Alarm- und Aufzeichnungssystem wird dringend empfohlen.

Weitere Informationen finden Sie in unserem Video- und Broschürenmaterial zur angemessenen Handhabung von Gewebeprobe auf www.BIGagainstbreastcancer.org

HAFTUNGS-AUSSCHLUSS

Dieses Unterrichtsmaterial dient zur Erläuterung der „Guten Laborpraxis“ in Bezug auf die Handhabung von Gewebeprobe in klinischen Krebsstudien. Wir haben uns in dieser Erläuterung auf die am häufigsten verwendeten Methoden beschränkt, wohlwissend, dass in einigen Labors auch andere Methoden und Konservierungs-/Fixierungsmittel zum Einsatz kommen. Wir möchten darauf hinweisen, dass diese Auswahl nicht aufgrund einer Bewertung der Methoden, sondern ausschließlich aufgrund der Häufigkeit ihrer Nutzung erfolgte. Die Breast International Group (BIG) übernimmt keinerlei Verantwortung für die Anwendung der hier aufgeführten Inhalte.

DANKSAGUNG

Dieses Unterrichtsmaterial entstand mit freundlicher Unterstützung der Universität Michigan und der US-amerikanischen Brustkrebs-Forschungsstiftung „Breast Cancer Research Foundation“. Darüber hinaus möchten wir uns bei folgenden Personen und Einrichtungen für die wertvolle Mitarbeit bedanken (in alphabetischer Reihenfolge): Jean-Benoit Burron, Institut Jules Bordet (Belgium) / Ligia Craciun, Tumorbank, Institut Jules Bordet / Lorena de la Peña, Grupo Español de Estudio, Tratamiento y Otras Estrategias Experimentales en Tumores Sólidos (Spain), BIG / Dominique de Valeriola, Institut Jules Bordet / Phuong Dinh, BIG / Juergen Dittmer, Research Laboratory, Clinic for Gynecology, University of Halle-Wittenberg (Germany) / Debora Fumagalli, Breast Cancer Translational Research Laboratory, Institut Jules Bordet, BIG / Denis Larsimont, Institut Jules Bordet / José Jimenez, Molecular Oncology Laboratory, Hospital Vall d'Hebron (Spain) / Marion Maetens, Breast Cancer Translational Research Laboratory, Institut Jules Bordet, BIG / Martine Piccart, BIG, Institut Jules Bordet / Jeanne Richard, Quality Assurance Unit, Department of Pathology, Institut Jules Bordet / Roberto Salgado, Breast Cancer Translational Research Laboratory, Institut Jules Bordet, BIG / Alex Selim-Spinette, Tumorbank, Institut Jules Bordet / Carolyn Straehle, BIG / Alastair Thompson, National Cancer Research Institute Clinical Studies Group (UK), Dundee Cancer Centre (UK), BIG / Giuseppe Viale, University of Milan (Italy), European Institute of Oncology (Italy), BIG / Gunter von Minckwitz, German Breast Group (Germany), University Hospital Frankfurt & LUISENKRANKENHAUS DÜSSELDORF (Germany), BIG / Cecilia Waldvogel, BIG / And all members of the BIG Executive Board