



VERSION 2
SEP 08, 2023

OPEN ACCESS



Protocol Citation: Annika Fendler, Bettina Ergün 2023. Gewebesammlung Frischgewebe Zystektomie. protocols.io <https://protocols.io/view/gewebesammlung-frischgewebe-zystektomie-czrgx53w>Version created by Bettina Ergün

License: This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Protocol status: Working
We use this protocol and it's working

Created: Sep 08, 2023

Last Modified: Sep 08, 2023

Gewebesammlung Frischgewebe Zystektomie V.2

Annika Fendler¹, Bettina Ergün¹

¹Charité
Bettina Ergün: Reviewer

Urology_Research



ABSTRACT

Dieses Protokoll beschreibt die Schritte für die Sammlung von Frischgewebe, Gefriergewebe (Fresh-frozen), und Blut von Patienten mit Harnblasenkarzinom nach Zystektomie.

Verwandte Dokumente:
Protokoll zur Blutaufarbeitung

ATTACHMENTS

- [SOP_Sammlung Gewebe_Blase_Handout für Labor_Stand 8-2023.pdf](#)
- [SOP_Sammlung Gewebe_Handout für OP_Stand 8-2023.pdf](#)
- [SOP_Sammlung Gewebe_Handout für SS_Stand 8-2023.pdf](#)

GUIDELINES

Beschreibung der biologischen Proben:

Probentyp	Kurzbeschreibung Prozess	Zweck	Bemerkung
1 x koaguliertes Blut in CAT tubes	NA	Aufarbeitung und Lagerung von Serum	Findet im Rahmen der Biobank Sammlung statt. Zuständig: Michela de Martino
2 x EDTA	NA	Aufarbeitung und Lagerung von Vollblut und Plasma	Findet im Rahmen der Biobank Sammlung statt. Zuständig: Michela de Martino
Frischgewebe	Sammlung in Transportmedium in 15 ml Falcon.	Aufarbeitung zu Tumorfragmenten und/oder Einzelzellen	Zuständig: Annika Fendler, Bettina Ergün

PROTOCOL integer ID:
87560

Keywords:

Gewebesammlung,
Gewebeaufarbeitung, Blase

Probentyp	Kurzbeschreibung Prozess	Zweck	Bemerkung
Gefriergewebe (Fresh-frozen)	Sammlung in 2 ml Kryoröhrchen, schockfrozen in LN, Lagerung bei -80°C	Lagerung für verschiedene Anwendungen	Findet im Rahmen der Biobank Sammlung statt. Zuständig: Michela de Martino

Tabelle 1: zu sammelnde biologische Proben

Einschlusskriterien für Patienten:

-

weitere Richtlinie zur Probenentnahme:

- falls der Tumor zu klein ist: fresh frozen priorisieren
- falls kein Tumor zu erkennen ist: Normalgewebe nur, falls schon TURB-Material vorhanden ist oder falls Bedarf für bestimmte Experimente ist

Verantwortliche:

Sammlung für folgende Arbeitsgruppen:

AG Fendler (Organoide)

Urologische Forschung

Zuständige Labor:

Annika Fendler, Tel.: 515040

Michela de Martino, Tel.: 515040

Bettina Ergün, Tel. 515128/615009

Zuständige Klinik für Urologie:

Antonia Franz

Kira Kornienko, Tel. 615166

Zuständige Pathologie:

Simon Schallenberg, Tel.: 536054

Florian Roßner, Tel.

Sefer Elezkurtaj

Zuständige Klinik für Radiologie:

Markus Lerchbaumer, Tel.: 657084

Kontakt Patientenmanagement

Silvia Stark, Tel.: 615028

Nadine Stremlau, Tel.: 615029

Kontakt Schnellschnitt

Ines Görmar, Tel.: 536136/636136

MATERIALS

Transportmedium

A	B	C	D	E
Menge		Bestandteil	Cat-No.	Bemerkung
500 ml	98 %	MEM	31095-029	
10,2 ml	2%	Zellshield (100x)	13-0050	vor dem 15.5.2023 wurde nur 1 % Zellshield verwendet

Gefriermedium

Menge	Bestandteil	Cat-No.
10 ml	DMSO	
90 ml	FBS	FBS. S 0615

50 ml Falcons

2 ml Kryoröhrchen (vorgelabelt im Schnellschnitt)

Stanzen 6 mm (hinterlegt im Schnellschnitt)

Gewebeschein + Stifte

Sterile Glas-Petrischale und Pinzette

BEFORE START INSTRUCTIONS

Vor der OP:

Patienten werden von Michela de Martino im Rahmen der Biobank Planung identifiziert und gegebenenfalls gemeinsam besprochen.

Die Patientenliste mit Datum der vorstationären Aufnahme wird jeweils am Donnerstag an das Patientenmanagement geschickt.

Wenn ein Patient die EVEs unterschrieben hat und Blut abgenommen wurde, wird in SAP im Bemerkungsfeld für das OP-Personal vermerkt, dass sie die entnommene Blase nativ in das Schnellschnittlabor schicken sollen.

Ebenfalls am Donnerstag der Vorwoche eine Email mit Gewebewünschen an ines.görmar@charite.de aus dem Schnellschnittlabor schicken und ggf. am OP-Tag nochmals telefonische Kontaktaufnahme.

Änderungen im OP-Plan sollten im besten Fall täglich überprüft und mit dem Team abgesprochen werden.

Am Tag der OP:

Vorbereitung:

Lokalisation des Tumors und Vortherapie recherchieren

Flüssigen Stickstoff, sowie die Tüte mit Gewebescheinen; Tubes und Stiften bereit haben.

Gewebesammlung im Schnellschnitt

1

Nach Rückmeldung des Schnellschnitts geht eine Person zur Gewebeentnahme.

1.1

Blase

- Tumorable im Schnellschnitt => Anruf durch SS erfolgt auf 515128 (615009) o. 515040
- vorbereiten: Lokalisation des Tumors und Vortherapie recherchieren
- mitnehmen: Tüte mit Gewebescheinen und Stiften ; bei Bedarf (z.B. Urlaub Fr. Görmar) N2 mitnehmen
- vorhanden in SS: vorgelabelte Röhrchen für FF im Unterschrank, Röhrchen mit Transportmedium im Kühlschrank in Tüte (Uro), Stanzen, N2-Behälter
- Im Schnellschnitt:
 - N2-Behälter auffüllen; Röhrchen bereitlegen; laufende Nummer auf Gewebeschein notieren
 - Entnahme von Fresh frozen und Frischgewebe von Tumor und Normalgewebe nach Schema (siehe unten) durch den Pathologen; das Tumor-Gewebe am besten mit einer Stanze entnehmen; für Normalgewebe nur oberflächliche Epithelschicht (der Pathologe entscheidet aber über das Prozedere)
 - Voraussetzung: Tumor groß genug => ansonsten nur Entnahme von Fresh frozen.
 - Falls kein Tumor zu erkennen ist: Normalgewebe nur, falls wir schon TuRB-Material des Patienten hatten oder falls wir es für bestimmte Experimente brauchen
 - Wenn möglich: Fotos vom Gewebe/Entnahmeort machen
 - Fresh frozen => N2 => Lagerung in Tiefkühler Schnellschnitt (bzw. ggf. sofort mitnehmen (s.o.)); Frischgewebe wird mitgenommen
 - Eintrag in Liste „Harnblasenkarzinome“ mit laufender Nummer im Ordner SS
 - Auf der Gewebescheinkrückseite Histo# notieren

Fresh frozen
 => vorgelabelte Röhrchen „Blase“
 1x T1 (Mucosa-Seite)
 1x T2 (Muskel (invasive) Seite)
 1x N1 (tumornah)
 1x N2 (tumorforn)

Frischgewebe
 => Transportmedium mit laufender Nummer und T1/T2 bzw. N1/N2 beschriften

RCX

	1. Stück	2. Stück (bei Tumor >5cm)
T		
N1 tumornah		
N2 tumorforn		

T1 (Mucosa-Seite)

T2 (Muskel (invasive) Seite)

Arbeitsanleitung

- 4x 15 ml Falcons mit 12,2 ml Transportmedium (bis 9/2023 50 ml Falcon mit 15 ml) aus dem Kühlschrank im Schnellschnitt nehmen.
Bis 9/2023: Vorgelabelte Röhrchen aus dem Unterschrank nehmen und Probennummer auf Gewebeschein notieren.
Ab 9/2023: Röhrchen mit in den Schnellschnitt nehmen; zu vergebenen Probennummer vorher recherchieren und auf Gewebeschein notieren + Tubes labeln wenn klar ist, dass eine Gewebeentnahme erfolgen kann
- Entnahmen durch den Pathologen:

Kriterium	Beschreibung Planung
Makroskopische Heterogenität	Falls makroskopisch unterschiedliche Regionen zu erkennen sind, bitte Proben aus den unterschiedlichen Regionen entnehmen.
Vorbehandlung mit neoadjuvanter chemotherapy	Im Falle eines guten Ansprechens auf die neoadjuvante Therapie, möglichst eine Probe aus nicht-viablem Gewebe entnehmen. Rest aus viablen Bereichen.

- Mit einer Stanze 2x (für Frischgewebe und Fresh Frozen) je ein Stück Tumorgewebe entnehmen, welches horizontal in Mucosa- und Muskuläre (invasive) Seite geteilt und auf 2 Mediumröhrchen bzw. 2 Kryoröhrchen verteilt wird. Hierbei ist die Beschriftung T1 für die Mucosa und T2 für die Invasive Seite zu verwenden. (Pro 5 cm Durchmesser des Tumors wird eine Probe gesammelt.)
 - Mit einem Messer ein möglichst flaches Gewebestück aus dem tumornahen Normalgewebe, welches auf ein Mediumröhrchen und ein Kryoröhrchen aufgeteilt wird.

3.3 Dito für ein tumorfernes Normalgewebe.

3.4 wenn möglich Fotos der Blase/Entnahmestelle machen



4 Eintragen der Stücke in den Gewebeschein.

5 Eintragen der Patientendaten in die entsprechende Liste des Gewebeordners im Schnellschnitt.

6 Ggf. Lagerung der Fresh Frozen-Proben im TK des Schnellschnitts, sonst Mitnahme ins Labor und Lagerung in -70°C TK.

Aufarbeitung im Labor

1h

7 Gewebe sollte, wenn möglich am selben Tag verarbeitet werden, kann aber maximal über Nacht bei 4°C gelagert werden
Zur Reduktion der Keimbelastung sollte das Gewebe  01:00:00 bei  Room temperature inkubiert werden

1h

8 Das Gewebe wird im Labor in Stücke mit 1-2 mm Kantenlänge aufgeteilt.
Die Fragmente eines Tumorstückes mixen, damit jedes Aliquot möglichst repräsentativ für das Tumoreareal ist.

9 Je 8 (Entscheidung vom 29.6.2023: 16) Fragmente werden in 1 ml Gefriermedium in einem Kryoröhrchen gelagert.
Falls genug Fragmente für mehr als 4 Kryoröhrchen vorhanden sind, können auch mehr

Fragmente in einem Röhrchen vereinigt werden. Maximal werden 5 Kryoröhrchen jeder Entität eingefroren.

10 Proben über Nacht in Mr. Frosty einfrieren.

11 Am nächsten Tag werden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank überführt und im Ordner "N2-Tank" dokumentiert.

Dokumentation

12 Patientendaten in Datei hinterlegen und korrespondierende Liquidnummer eintragen:
\\Charite.de\Centren\C08\UR\FO\Intern\PROBEN_PATIENTEN\01-Gewebe\Gewebe_FF\Biobank_Gewebe_ab01012019.xlsx

13 In der Liquid-Sammelliste die korrespondierende Gewebenummer eintragen:
\\Charite.de\Centren\C08\UR\FO\Intern\PROBEN_PATIENTEN\02-Liquid\Uro-Biobank\Biobanking-lfdListe_ab190311.xlsx

14 In Labfolder die Vorlage "Tissue_Collection_Fragments" bzw. seit dem 15.5.2023 "Tissue_Collection_Fragments_new_15052023" ausfüllen und Bilder des Gewebebegleitscheins sowie des Entnahmeorts und des Gewebes vor der Aufarbeitung im Labor einfügen.