

**Standardarbeitsvorschrift im Rahmen des
BMBF Verbundvorhabens**
Validierungsstudie zur Prüfung auf Hautpenetration mit Hilfe von
biotechnologisch hergestellten Hautmodellen

Standard Operating Procedure (SOP)

Titel Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen mit verschiedenen Kunsthauttypen		Version 05	Dokumentennr. SOP_M_KH_05	
Erstausgabedatum 14.03.2003	gültig ab 27.5.2003	Ersteller Sylvia Schreiber, Alexander Vuia, Monika Kaca		Seite von 1 10
Ausgabe	gültig ab	Beschreibung der Änderung		
01	14.03.2003	Erste Ausgabe		
02	27.5.2003	Inhaltsverzeichnis hinzugefügt sowie nicht zu verwendende Kunsthautmodelle eliminiert		
02a	23.06.2003	Wie Ausgabe 2 in kondensierter Darstellung		
03	01.07.2004	Einarbeitung Modell Episkin		
04	07.2005	Formale Anpassung der Seite 1		
05	08.02.2008	Redaktionelle Anpassung		
Genehmigung: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting				
Erstellt: Sylvia Schreiber, Alexander Vuia, Monika Kaca		Geprüft: Dr. Annekatriin Haberland		Genehmigt: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting
Verteiler: Freie Universität Berlin (FU), Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo), Universität des Saarlandes (US), Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), ZEBET Berlin, Across Barriers (ACB), Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Fraunhofer (IGB), BASF AG (BASF), Beiersdorf AG (BDF), Cognis Deutschland GmbH & Co.KG (CND)				

Titel		Version	SOP_M_KH_05	
Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen mit verschiedenen Kunsthauttypen		05		
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite von
14.03.2003	27.5.2003	Sylvia Schreiber, Alexander Vuia, Monika Kaca		2 10

Inhaltsverzeichnis		Seite
1	ZWECK	4
2	EINSATZBEREICH	4
3	ALLGEMEINE MAßNAHMEN UND GERÄTE	4
4	EPIDERM-MODELL (MATTEK, ASHLAND, MA, USA)	5
4.1	Bezeichnung	5
4.2	Lieferung (ab USA)	5
4.3	Kitbestandteile	5
4.4	Lagerung	5
4.5	Präinkubation / Vorbereitung für den Franzzell-Versuch	5
5	SKINETHIC-MODELL (SKINETHIC, NIZZA, FRANKREICH)	6
5.1	Bezeichnung	6
5.2	Lieferung (ab Frankreich)	6
5.3	Kitbestandteile	6
5.4	zusätzliche Verbrauchsmaterialien / Geräte	6
5.5	Lagerung/Präinkubation	7
5.6	Vorbereitung für den Franzzellversuch	7
6	EPISKIN-MODELL (EPISKIN SNC (L'ORÉAL), LYON, FRANKREICH)	7
6.1	Bezeichnung	7
6.2	Lieferung (ab Frankreich)	8
6.3	Kitbestandteile	8
6.4	Transport / Haltbarkeit	8
6.5	Lagerung	8

Titel		Version	SOP_M_KH_05	
Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen mit verschiedenen Kunsthauttypen		05		
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite
14.03.2003	27.5.2003	Sylvia Schreiber, Alexander Vuia, Monika Kaca		von 3 10

6.6	Vorbereitung des EpiSkin®-Hautmodells	9
7	EINBRINGEN DES HAUTMODELLS IN DIE FRANZZELLE (ALLE HAUTMODELLE)	9
8	VITALITÄTSTESTS	10
8.1	Histologie / MTT-Test	10
9	MITGELTENDE UNTERLAGEN	10

Titel		Version		
Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen mit verschiedenen Kunsthauttypen		05	SOP_M_KH_05	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite
14.03.2003	27.5.2003	Sylvia Schreiber, Alexander Vuia, Monika Kaca		von 4 10

1 Zweck

Standardisierte Vorbereitung und Behandlung von Kunsthäuten zur Durchführung von Permeationsversuchen mit Franz-Diffusionszellen.

2 Einsatzbereich

Die Arbeitsanweisung dient der Vereinheitlichung der Permeationsversuche mit Kunsthäuten im Rahmen des BMBF-Projekts (BEO 0312881-6).

3 Allgemeine Maßnahmen und Geräte

Die in speziellen Transportgefäßen gelieferten Kunsthäute werden entsprechend den Anweisungen des jeweiligen Herstellers gelagert und für den Versuch vorbereitet. Außer der Kunsthaut enthalten die Kits spezielle Lösungen. Darüber hinaus werden folgende Arbeitsmaterialien für alle Kunsthäute benötigt:

- Chirurgische Pinzette
- Papiertücher (z.B. Kleenex®)
- isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS): Normale Pufferkapazität (siehe SOP_M_LÖS_04)

pH-Werteinstellung auf pH = 7,4 mit NaOH bzw. HCl

Die entsprechenden Mengen der Salze sind mit Aqua bidest. anzusetzen. Nach Kontrolle des pH-Werts wird die Lösung durch Filtermembranen mit einem Porendurchmesser von 0,22 µm steril filtriert und die Lösung in verschließbaren Glasflaschen bei 4°C gelagert.

- sterile Einmalpipetten (5 ml)

Vor Verwendung der Kunsthaut ist das mitgelieferte Technical Data and Safety Sheet auf seine Richtigkeit zu überprüfen sowie das Verfallsdatum des Hautmodells zu beachten.

Titel		Version	SOP_M_KH_05	
Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen mit verschiedenen Kunsthauttypen		05		
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite
14.03.2003	27.5.2003	Sylvia Schreiber, Alexander Vuia, Monika Kaca		5 von 10

4 EpiDerm-Modell (Mattek, Ashland, MA, USA)

4.1 Bezeichnung:

- EPI-606x (Durchmesser 22 mm)

4.2 Lieferung (ab USA)

- jeden Montag als T1-Lieferung
- Auslieferung bis Donnerstag je nach Auslieferungsort

4.3 Kitbestandteile

- versiegelte 6-well-Platte mit 6 EpiDerm™-Kunsthäuten
- sterile Petrischalen (100 mm Durchmesser)
- 200 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
- 100 ml Assaymedium

4.4 Lagerung

Die Kunsthaut kann in der versiegelten 6-well-Platte (enthält das Hautmodell auf Nährmedium) im Kühlschrank (4°C) für **max. 48 h** gelagert werden. Das mitgelieferte Erhaltungsmedium wird ebenfalls bei 4°C gelagert. Die sofortige Verwendung der Kunsthaut ist möglich. Die Lagerdauer ist zu dokumentieren.

4.5 Präinkubation / Vorbereitung für den Franzzell-Versuch

Zur Vorbereitung auf den Versuch werden die Kunsthäute samt ihren Halterungen (Inserts) einzeln entnommen und noch anhaftende Agarose durch leichtes Klopfen auf steriles Filterpapier entfernt. Die Kunsthäute werden sofort jeweils in eine mit Erhaltungsmedium gefüllte Petrischale gelegt und mindestens 1 h bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Dabei muss ein Aus-

Titel		Version	SOP_M_KH_05	
Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen mit verschiedenen Kunsthauttypen		05		
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite von
14.03.2003	27.5.2003	Sylvia Schreiber, Alexander Vuia, Monika Kaca		6 10

trocknen der Kunsthäute unbedingt verhindert werden, zudem dürfen sich keine Luftblasen unter der Kunsthaut bilden.

Nach der Inkubation werden die Kunsthäute vom Zellkulturinsert entfernt: 3-4 Papiertücher (z.B. Kleenex®) werden einmal (halbe Größe) gefaltet und mit PBS angefeuchtet. Das Zellkulturinsert mit der Epiderm™-Kunsthaut wird auf die Tücher gelegt und die „Füße“ des Inserts in die Tücher gedrückt. Da ein Ausstanzen der Kunsthaut aus den Inserts zu Schädigungen führt, wird die Kunsthaut mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette vorsichtig vom Rand aus dem Insert herausgeschnitten und mit einer Pinzette entnommen. Die Kunsthaut darf sich nicht von der Stützmembran lösen.

5 SkinEthic-Modell (SkinEthic, Nizza, Frankreich)

5.1 Bezeichnung

- SkinEthic® 4 cm² Epidermis

5.2 Lieferung (ab Frankreich)

- jeden Montag
- Auslieferung Dienstag je nach Auslieferungsort

5.3 Kitbestandteile

- versiegelte 6-well-Platte mit 6 SkinEthic®-Kunsthaut; Fläche je 4 cm²
- Erhaltungsmedium

5.4 zusätzliche Verbrauchsmaterialien / Geräte

- sterile 6-well-Platte

Titel		Version		
Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen mit verschiedenen Kunsthauttypen		05	SOP_M_KH_05	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite von
14.03.2003	27.5.2003	Sylvia Schreiber, Alexander Vuia, Monika Kaca		7 10

5.5 Lagerung/Präinkubation

Das mit der Kunsthaut gelieferte Erhaltungsmedium muss bei 4°C und im Dunkeln gelagert werden. Sofort nach Erhalt des Hautmodells wird die eine 6-well-Platte unter sterilen Bedingungen mit je 4 ml raumtemperiertem SkinEthik Erhaltungsmedium (s.o.) gefüllt. Die aus der Aluminiumtasche entnommene 6-well-Platte mit den Kunsthäuten wird unter sterilen Bedingungen geöffnet und das sterile Filterpapier entfernt. Die Kunsthäute werden einzeln entnommen und noch anhaftende Agarose durch leichtes Klopfen auf das sterile Filterpapier entfernt, anschließend werden sie sofort in jeweils eine Öffnung der mit Erhaltungsmedium gefüllten 6-well-Platte gelegt. Dabei muss ein Austrocknen der Kunsthäute unbedingt verhindert werden. Es muss außerdem darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen unter der Kunsthaut bilden. Die Hautmodelle werden bei 37°C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank **über Nacht, maximal aber für 48 h vor Durchführung eines Experimentes inkubiert**. Soll der Versuch erst ≥ 24 h nach dem Erhalt der Kunsthaut erfolgen, muss nach 24 h ein Mediumwechsel (Erhaltungsmedium der Fa. SkinEthic®) vorgenommen werden. Die Lagerungsdauer ist zu dokumentieren.

5.6 Vorbereitung für den Franzzellversuch

Da ein Ausstanzen der Kunsthaut aus den Inserts zu Schädigungen führt, wird die Kunsthaut mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette vorsichtig vom Rand aus dem Insert herausgeschnitten und mit einer Pinzette entnommen. Die Kunsthaut darf sich nicht von der Stützmembran lösen.

6 EPISKIN-Modell (EPISKIN SNC (L'ORÉAL), Lyon, Frankreich)

6.1 Bezeichnung

- Episkin® SCN , Fläche 1,07 cm²

Titel		Version	SOP_M_KH_05	
Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen mit verschiedenen Kunsthauttypen		05		
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite von
14.03.2003	27.5.2003	Sylvia Schreiber, Alexander Vuia, Monika Kaca		8 10

6.2 Lieferung (ab Frankreich)

- Jeden Montag
- Auslieferung Dienstag oder Mittwoch (je nach Auslieferungsort: in Frankreich innerhalb 24 Stunden und in Europa innerhalb 48 Stunden)

6.3 Kitbestandteile

- versiegelte Zellkulturplatte mit 12 EpiSkin[®]-Hautmodellen; Fläche je 1,07 cm²
- Erhaltungsmedium 80 mL (L'ORÉAL)

6.4 Zusätzliche Verbrauchsmaterialien / Geräte

- sterile 12-well-Platte

6.5 Transport / Haltbarkeit

Der Transport darf 48 h nicht überschreiten.

Vor Öffnen des steril verpackten Hautmodells muss geprüft werden:

- die Farbe des Agartransportmediums muss **orange** sein (akzeptabel)
- die Temperatur-Indikatorfarbe muss **weiß** sein (akzeptabel)

Im Falle einer verspäteten Ankunft (Absendedatum; Transportzeit >48 h) bzw. Hinweisen auf Defekte (Agartransportmedium: gelb oder violett; Temperatur-Indikatorfarbe grau bei der Temperaturüberschreitung von 40 °C) ebenso wie bei Anomalien oder Beschädigungen des Hautmodells ist beim Hersteller zu reklamieren.

6.6 Lagerung

Das mit der Kunsthaut gelieferte Erhaltungsmedium muss bei 2-8 °C gelagert werden. Das Hautmodell wird aus der Verpackung entnommen. Die Vertiefungen der 12-well-Platte werden unter sterilen Bedingungen mit je 2 ml des auf Raumtemperatur erwärmten Erhaltungsmediums (L'ORÉAL) gefüllt (Das Erhaltungsmedium soll optimal in dem Wasserbad mit der

Titel		Version		
Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen mit verschiedenen Kunsthauttypen		05	SOP_M_KH_05	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite von
14.03.2003	27.5.2003	Sylvia Schreiber, Alexander Vuia, Monika Kaca		9 10

Temperatur von 37 °C erwärmt werden). Das Hautmodell mit samt der stützenden Kollagenschicht wird nun vom Agarosegel abgelöst, Agarosereste dürfen nicht mehr am Hautmodell anhaften. Die Kunsthäute werden unter sterilen Bedingungen in die 12-well-Platte überführt, ohne dass sich Luftblasen unter der Kunsthaut befinden. Die Kollagenschicht darf sich nicht von dem Hautmodell lösen.

Die Kunsthäute werden im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) **mindestens 1 h, maximal aber 48 h aufbewahrt**. Übersteigt die Lagerdauer 24 h, erfolgt nach 24 h ein Mediumwechsel. Die Lagerungsdauer ist zu dokumentieren.

Die sofortige Verwendung der Kunsthaut ist ebenfalls möglich. In diesem Fall soll die 12-well-Platte statt mit dem Erhaltungsmedium sofort mit dem auf Raumtemperatur erwärmten PBS gefüllt werden. Dann für 30 Minuten inkubieren lassen.

6.7 Vorbereitung des EpiSkin[®]-Hautmodells

Nach der Präinkubationszeit wird die Kunsthaut vorsichtig mit Hilfe der L'ORÉAL-Stanze herausgeschnitten und mit einer Pinzette entnommen. Das Hautmodell darf sich nicht von der Kollagenschicht lösen. Aufgrund des kleinen Durchmessers des EpiSkin[®]-Modells (12 mm) müssen die Untersuchungen in den PermeGear Franzellen mit den für das EpiSkin[®]-Modell angepassten Einsätzen durchgeführt werden.

7 Einbringen des Hautmodells in die Franzelle (EpiDerm-Modell und SkinEthic-Modell)

Die fest mit der Stützmembran verbundene Kunsthaut wird mit dem Stratum corneum nach außen gerichtet auf die Öffnung der Franzelle aufgelegt und zentriert. Das Gewebe wird mit dem zylindrischen Glasaufsatz fixiert. Evtl. auf der Epidermisoberfläche vorhandenes Medium wird mit einem Q-Tip vorsichtig entfernt. Das weitere Vorgehen erfolgt gemäß der SOP „Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen in Franzdiffusionszellen mit verschiedenen Hautqualitäten“.

Titel		Version		
Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen mit verschiedenen Kunsthauttypen		05	SOP_M_KH_05	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite von
14.03.2003	27.5.2003	Sylvia Schreiber, Alexander Vuia, Monika Kaca		10 10

7.1 Einbringen des Hautmodells in die Franzzelle (EpiSkin® -Modell)

Die Kunsthaut wird mit dem Stratum corneum nach außen gerichtet und in die Vertiefung des FZ-Einsatzes aufgelegt und zentriert. Durch die Anwendung des FZ-Einsatzes ändert sich die Diffusionsfläche von 1,767 cm² auf 0,385 cm² (Innendurchmesser des Einsatzes beträgt 7 mm). Hierauf wurde das Donorvolumen von 500 µL zu 110 µL angepasst. Das weitere Vorgehen erfolgt gemäß der SOP „Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen in Franzdiffusionszellen mit verschiedenen Hautqualitäten“.

8 Vitalitätstests

Sind nicht generell, sondern nur bei einer speziellen Fragestellung vorzunehmen.

8.1 Histologie / MTT-Test

Erfolgt gemäß SOP LMU „Gewinnung, Versand und Bearbeitung von Hautstanzen für histologische Untersuchungen“ sowie „Anleitung zur Untersuchung der Viabilität von Hautproben“.

9 Mitgeltende Unterlagen

- SOP FUB: „Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen in Franz-Diffusionszellen mit verschiedenen Hautqualitäten“
- SOP LMU: „Gewinnung, Versand und Bearbeitung von Hautstanzen für histologische Untersuchungen“
- SOP LMU: „Anleitung zur Untersuchung der Viabilität von Hautproben“