



Standardarbeitsvorschrift im Rahmen des BMBF Verbundvorhabens

Validierungsstudie zur Prüfung auf Hautpenetration mit Hilfe von
 biotechnologisch hergestellten Hautmodellen

Standard Operating Procedure (SOP)

Titel Gewinnung und Vorbereitung von Schweinehaut für den Einsatz in der Franz-Diffusionszelle		Version 04	Dokumentennr. SOP_M_SH_04	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller: Dr. Frank Niedorf / Alexander Vuia	Seite 1	von 6
Ausgabe	gültig ab	Beschreibung der Änderung		
01		Erste Ausgabe		
02	28.02.2005	Schweinerassen ergänzt, Entnahmeregion umformuliert		
03	07.03.2005	Formale Anpassung der Seite 1		
04	08.02.2008	Redaktionelle Anpassung		
Genehmigung: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting				
Erstellt: Dr. Frank Niedorf/ Alexander Vuia		Geprüft: Prof. Dr. Manfred Kiezmann		Genehmigt: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting
Verteiler: BMBF-Partner der Phase 1 und 2				
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 Gewinnung und Vorbereitung von Schweinehaut für den Einsatz in der Franz-Diffusionszelle		Version 04	Dokumentennr.: SOP_M_SH_04	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller: Dr. Frank Niedorf / Alexander Vuia	Seite 2	von 6

Inhaltsverzeichnis		Seite
1	ZWECK	3
2	EINSATZBEREICH	3
3	GRUNDLAGEN	3
4	EINSCHLUSSKRITERIEN	3
5	GERÄTE, GERÄTE-EINSTELLUNGEN UND MATERIAL	3
5.1	Geräte und Materialien zur Hautentnahme	3
5.2	Geräte und Materialien zur Hautpräparation	4
5.3	Spendertiere	4
5.4	Chemikalien	4
6	DURCHFÜHRUNG DES VERFAHRENS	5
6.1	Tötung der Tiere	5
6.2	Hautgewinnung und Transport	5
6.3	Reinigung und Lagerung der Haut	5
6.4	Spalthautgewinnung, Dickenmessung und Integritätsprüfung	6
6.5	Hydratisierung der Haut	6
6.6	Entsorgung von Hautresten	6

Titel Gewinnung und Vorbereitung von Schweinehaut für den Einsatz in der Franz-Diffusionszelle		Version 04	Dokumentennr.: SOP_M_SH_04	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller: Dr. Frank Niedorf / Alexander Vuia	Seite 3	von 6

1 Zweck

Diese Standardarbeitsanweisung beschreibt die Anforderungen an die Spendertiere, den Vorgang der Hautentnahme, des Transports und der Präparation der Haut zur Gewährleistung einer reproduzierbaren, optimalen Organqualität sowie die standardisierte Vorbereitung der Haut für den Einsatz in der Franz-Diffusionzelle.

2 Einsatzbereich

Gewinnung und Vorbereitung von tierischer Haut zum Einsatz in der medizinischen/biotechnologischen Forschung als *in vitro* Testsystem.

3 Grundlagen

Die Entnahme der Haut soll möglichst keimarm und schnell erfolgen.

4 Einschlusskriterien

Vor der Tötung der für die Hautentnahme benutzten Tiere ist bei diesen eine tierärztliche Untersuchung vorzunehmen. Bei dieser sind Störungen des Allgemeinbefindens der Tiere sowie das Vorliegen von übertragbaren Krankheiten auszuschließen. Bei Tieren, die im normalen Schlachtbetrieb getötet werden, kann diese im Rahmen der Schlachttieruntersuchung, geregelt in der Fleischhygieneverordnung (FLHV) Anlage 1, Kapitel I, Absatz 2 erfolgen.

5 Geräte, Geräte-Einstellungen und Material

5.1 Geräte und Materialien zur Hautentnahme

- Instrumente (2 chirurgische Pinzetten, 2 Skalpelle)
- 2 OP-Tücher
- PE-Gefrierbeutel
- Kühlbox mit Eis bzw. Kühlpacks (4 – 8 °C)
- Protokoll, Uhr, Kugelschreiber, wasserfester Stift
- Evtl. Schutzkleidung, Stiefel, Hauben, Handschuhe, Plastikschrürze

Titel Gewinnung und Vorbereitung von Schweinehaut für den Einsatz in der Franz-Diffusionszelle		Version 04	Dokumentennr.: SOP_M_SH_04	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller: Dr. Frank Niedorf / Alexander Vuia	Seite 4	von 6

5.2 Geräte und Materialien zur Hautpräparation

- Instrumente (2 Skalpelle, 2 Chirurgische Pinzetten, 2 Anatomische Pinzetten)
- Vorrichtung zur Fixierung der Haut (beispielsweise Präparierplatte, 4 gerade Arterienklemmen nach Rochester-Ochsner, Gummiringe oder Styroporplatte, 4 Injektionsnadeln (0.6 mm))
- Mullkompressen
- Aluminiumfolie
- PE-Gefrierbeutel
- Mikrometer: Pocket Thickness Gauge (Mitutoyo Messgeräte GmbH, Neuss, Deutschland, Art.Nr.: 7309)
- Hammer und Stanzen
- Becherglas, 250ml

5.3 Spendertiere

Es werden Schweine der Deutschen Landrasse eingesetzt, in einem Alter zwischen 5 bis 8 Monate. Alter, Geschlecht und Gewicht des jeweiligen Spendertieres sind im Versuchsprotokoll zu dokumentieren.

5.4 Chemikalien

- isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS): Normale Pufferkapazität (siehe SOP_M_LÖS_04)

Titel Gewinnung und Vorbereitung von Schweinehaut für den Einsatz in der Franz-Diffusionszelle		Version 04	Dokumentennr.: SOP_M_SH_04	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller: Dr. Frank Niedorf / Alexander Vuia	Seite 5	von 6

6 Durchführung des Verfahrens

6.1 Tötung der Tiere

Die Tötung der Tiere muss gemäß den in der Tierschutz-Schlachtverordnung angegebenen Kriterien vorgenommen werden. Der Zeitpunkt der Tötung ist im Protokoll zu notieren.

6.2 Hautgewinnung und Transport

Hautstücke von ca. 10 cm x 10 cm werden mit Hilfe eines Skalpells aus dem Bereich der seitlichen Bauchwand entnommen. Dabei sind zur Wirbelsäule, zu den Rippen und zur Bauchmitte jeweils mindestens 5 cm Abstand einzuhalten. Die Hautstücke werden in OP-Tücher eingeschlagen um eine Kontamination mit subkutanem Fettgewebe zu vermeiden. Der Transport in das Labor erfolgt in Gefrierbeuteln in einer Kühlbox bei ca. 4-8 °C auf Kühlakkus oder Eis.

6.3 Reinigung und Lagerung der Haut

Zunächst erfolgt die Reinigung der Hautoberfläche mit lauwarmem Wasser. Daraufhin wird die Präparierunterlage mit einer Lage Aluminiumfolie und darüber einer Lage saugfähigen Materials (z.B. Zemuko Universalkompresse) abgedeckt. Auf diese wird ein Hautstück mit der Stratum-corneum-Seite nach unten gelegt. An den vier Hautecken werden die Arterienklemmen befestigt, und mittels der Gummiringe wird die Haut gespannt. Alternativ ist eine Fixierung mittels vier Nadeln, die durch die Hautecken in eine Styroporunterlage gesteckt werden, möglich. Mittels eines Skalpells wird das subkutane Fettgewebe abpräpariert. Hierzu wird das subkutane Fettgewebe mit einer chirurgischen Pinzette gegriffen und direkt unterhalb der Dermis mit dem Skalpell abgetrennt. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Kontamination der Oberfläche durch subkutanes Fett erfolgt. Wegen Kontaminationsgefahr müssen nach Abtrennung des subkutanen Fettgewebes daher die äußersten 5 mm im Randbereich verworfen werden. Die präparierte Haut wird sodann mit anatomischen Pinzetten auf die Aluminiumfolie gelegt, gegebenenfalls glattgestrichen, und in Aluminiumfolie eingeschlagen in den Gefrierbeutel gegeben. Dieser wird möglichst luftdicht verschlossen. Die Haut wird bei -20°C bis -30°C in der Kühltruhe auf einer ebenen Unterlage eingefroren. Vor der

Titel Gewinnung und Vorbereitung von Schweinehaut für den Einsatz in der Franz-Diffusionszelle		Version 04	Dokumentennr.: SOP_M_SH_04	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller: Dr. Frank Niedorf / Alexander Vuia	Seite 6	von 6

Weiterverwendung sind die Proben mindestens 24 Stunden in der Gefriertruhe zu lagern. Die maximale Lagerungszeit beträgt 6 Monate. Eine Dokumentation der Lagerungsdauer muss erfolgen.

6.4 Spalthautgewinnung, Dickenmessung und Integritätsprüfung

Die Haut wird mittels eines Dermatons auf $1000 \mu\text{m} \pm 100 \mu\text{m}$ dicke Spalthaut nach entsprechender SOP präpariert. Die Dicke der Hautstücke wird mit dem Mikrometer nachgemessen und protokolliert.

Die Hautstücke werden visuell auf Integrität inspiziert.

6.5 Hydratisierung der Haut

Ein Becherglas mit Akzeptormedium wird auf $32 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert. Anschließend werden die Hautstücke in das Becherglas gelegt und vollständig vom Akzeptormedium bedeckt. Die Hautstücke werden 30 min. hydratisiert. Das weitere Vorgehen erfolgt gemäß der SOP_M_FZ.

6.6 Entsorgung von Hautresten

Hautreste sind der Tierkörperbeseitigung zuzuführen.