



**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 in Franz-Diffusionszellen mit verschiedenen Hautqualitäten		Version 03	Dokumentennr.: SOP_M_FZ_03	
Erstausgabedatum 13.12.2004	gültig ab 13.12.2004	Ersteller Dr. Frank Niedorf / Alexander Vuia		Seite von 1 9
Ausgabe	gültig ab	Beschreibung der Änderung		
01	13.12.2004	Erste Ausgabe		
02	28.02.2005	Optimierte Methode		
03	07.02.2008	Geprüfte Methode (redaktionelle Anpassung)		
Genehmigung: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting				
Erstellt: Dr. Frank Niedorf / Alexander Vuia		Geprüft: Prof. Dr. Manfred Kietzmann		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 Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen in Franz-Diffusionzellen mit verschiedenen Hautqualitäten		Version 03	Dokumentennr.: SOP_M_FZ_03	
Erstausgabedatum 13.12.2004	gültig ab 13.12.2004	Ersteller Frank Niedorf / Alexander Vuia		Seite von 2 9

Inhaltsverzeichnis		Seite
1	Zweck.....	3
2	Einsatzbereich.....	3
3	Methodenprinzip	3
4	Geräte, Geräte-Einstellungen und Material.....	3
4.1	Franz-Diffusionzell-Aufbau.....	3
4.2	Verbrauchsmaterialien.....	4
4.3	Chemikalien und Lösungen.....	4
4.4	Instrumente	5
4.5	Sonstiges.....	5
5	Durchführung des Versuchs.....	5
5.1	Vorbereitung	5
5.2	Besondere Vorkehrungen bei Arbeiten mit radioaktiven Substanzen.....	6
5.3	Aufspannen der Hautstücke.....	6
5.4	Probenentnahme	7
5.5	Versuchsende.....	7
6	Reinigung und Entsorgung.....	8
6.1	Besondere Vorkehrungen zur Reinigung und Entsorgung von radioaktiven Material.....	8
7	Mitgeltende Unterlagen	9

Titel Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen in Franz-Diffusionzellen mit verschiedenen Hautqualitäten		Version 03	Dokumentennr.: SOP_M_FZ_03	
Erstausgabedatum 13.12.2004	gültig ab 13.12.2004	Ersteller Frank Niedorf / Alexander Vuia		Seite von 3 9

1 Zweck

Standardisierte Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen in der Franz-Diffusionszelle.

2 Einsatzbereich

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

3 Methodenprinzip

Bei der Methode wird die Permeation von verschiedenen Substanzen (Stoffen) unter Infinitosedose-Bedingungen untersucht. Die Testsubstanz wird in einer definierten Konzentration in einem Träger (Donor) verabreicht. Aus der Akzeptorkammer werden zu definierten Zeiten Proben entnommen und mittels HPLC oder Szintillationsmessung auf ihren Gehalt untersucht. Isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS) dient als Akzeptormedium.

4 Geräte, Geräte-Einstellungen und Material

4.1 Franz-Diffusionzzell-Aufbau

- Franz-Diffusionzzellen Modell 4G-01-00-15-12 (Perme-Gear, Bethlehem, PA, USA)
- Umwälzthermostat (Haake, DC10-P5/U) oder Trockenschrank ($33,5 \pm 0,5$ °C)
- Magnetrührer IkaMag RO10 power (Ika Werke GmbH u. Co. KG, Staufen), (500 RPM)
- Rührstäbe: $11 \pm 1 \times 2 \pm 1$ mm (z.B.: VWR international, Best.Nr.: 442-9109)
- Verbindungsschläuche
- Ständer, Haltevorrichtungen

Titel Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen in Franz-Diffusionzellen mit verschiedenen Hautqualitäten		Version 03	Dokumentennr.: SOP_M_FZ_03	
Erstausgabedatum 13.12.2004	gültig ab 13.12.2004	Ersteller Frank Niedorf / Alexander Vuia		Seite von 4 9

4.2 Verbrauchsmaterialien

- Reaktionsgefäße 1,5 oder 2 ml, PP (abhängig von Probenmaterial und Analytik)
- Einmalspritzen (1ml, Braun Omnifix Tuberkulin)
- Einmalkanülen (0.8 / 80 mm)
- Kleenex Einmal-Tücher
- Parafilm

4.3 Chemikalien und Lösungen

- Aqua demineralisata
- isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS):

Normale Pufferkapazität:

KCl	0,2g	(Merck, Best.Nr.: 1049330500)
NaCl	8,0g	(Merck, Best.Nr.: 1064040500)
KH ₂ PO ₄	0,2g	(Merck, Best.Nr.: 105104.1000)
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,44g	(Merck, Best.Nr.: 1065201000)
oder Na ₂ HPO ₄	1,1486g	
in aqua bidest. ad	1l	

Bei Versuchen mit Benzoesäure ist wiederum isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4 mit vierfach erhöhter Pufferkapazität zu wählen¹.

Erhöhte Pufferkapazität (nur für Benzoesäure):

KCl	0,8 g	(s.o.)
NaCl	5,5g	(s.o.)
KH ₂ PO ₄	0,8g	(s.o.)
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	8,56g	
oder Na ₂ HPO ₄	4,53g	

¹ Verhinderung einer pH-Wert-Änderung während des Versuchs mit der Folge von Fluxänderungen infolge einer Verschiebung des Gleichgewichts.

Titel Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen in Franz-Diffusionzellen mit verschiedenen Hautqualitäten		Version 03	Dokumentennr.: SOP_M_FZ_03	
Erstausgabedatum 13.12.2004	gültig ab 13.12.2004	Ersteller Frank Niedorf / Alexander Vuia		Seite von 5 9

in aqua bidest. ad 1l

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

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

4.4 Instrumente

- 1 Schere
- 2 chirurgische Pinzetten
- 1 Skalpell

4.5 Sonstiges

- Thermometer
- Drehzahlmesser RPM Meter (Conrad Elektronik, Artikel-Nr. 128716- 14)

5 Durchführung des Versuches

5.1 Vorbereitung

Alle Geräte sind mindestens 30 Minuten vor Benutzung einzuschalten und später verwendete Gefäße zu beschriften. Das Akzeptormedium wird vor Versuchsbeginn 15 min. im Ultraschallbad entgast. Die nummerierten Franzzellen, deren Volumen durch Auslitern bestimmt worden ist, werden mit Akzeptormedium befüllt und das Wasserbad/Trockenschrank auf 33,5 ± 0,5°C temperiert. Die Umdrehungszahl des Magnetrührers wird mit dem Drehzahlmesser auf 500 rpm eingestellt.

Titel Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen in Franz-Diffusionzellen mit verschiedenen Hautqualitäten		Version 03	Dokumentennr.: SOP_M_FZ_03	
Erstausgabedatum 13.12.2004	gültig ab 13.12.2004	Ersteller Frank Niedorf / Alexander Vuia		Seite von 6 9

5.2 Besondere Vorkehrungen bei Arbeiten mit radioaktiven Substanzen

Das radioaktive Arbeiten erfolgt gemäß der Vorgaben des § 34 der Strahlenschutzverordnung unter der Verantwortlichkeit des Strahlenschutzbeauftragten.

- Alle radioaktiven Arbeitsschritte sollten vorher inaktiv durchgeführt werden. Unnötige Verzögerungen sind zu vermeiden. Alle für den Arbeitsvorgang benötigten Materialien sollten bereitliegen.
- Radioaktives Arbeiten sollte nur in mit saugfähigem Papier ausgelegten Schalen erfolgen.
- Bei allen Arbeiten mit offenen radioaktiven Stoffen sind stets Schutzhandschuhe und Schutzkleidung, die dauerhaft gekennzeichnet sein muss, zu tragen.
- Beim Arbeiten mit radioaktivem Material ist auf absolute Sauberkeit zu achten. Jedes Verspritzen und Verstreuen radioaktiven Materials ist zu vermeiden. Radioaktive Verunreinigungen sind sofort zu beseitigen.
- Radioaktive Vorratslösungen müssen nach Entnahme der erforderlichen Menge sofort wieder in den Vorratsraum zurückgestellt werden. Die Entnahme und der Verbleib der entnommenen Aktivitäten sind auf den dafür vorgesehenen Formularen zu protokollieren.
- Der radioaktive Arbeitsplatz muss erkennbar als solcher gekennzeichnet und abgrenzbar von nicht-radioaktiven Arbeitsplätzen sein.

5.3 Aufspannen der Hautstücke

Vor dem Aufspannen der Haut/Kunsthäute wird die Umgebungstemperatur sowie die Temperatur des Akzeptormediums in den einzelnen Franzzellen protokolliert, die bei $33,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ liegen sollte. Anschließend werden die Hautstücke mit der Pinzette mittig auf die Franzzellen aufgelegt. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen unter der Membran eingeschlossen werden. Die Hautstücke werden mit den zu den Franzzellen gehörenden Glaszylindern sowie den Klammern fixiert. Das Entnahmerohr der Franzzelle wird mit einem Ep-

Titel Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen in Franz-Diffusionzellen mit verschiedenen Hautqualitäten		Version 03	Dokumentennr.: SOP_M_FZ_03	
Erstausgabedatum 13.12.2004	gültig ab 13.12.2004	Ersteller Frank Niedorf / Alexander Vuia	Seite 7	von 9

pendorf-Tube (1ml) verschlossen. Nach einer Equilibrierungsphase von 30 Minuten werden die Nullproben entnommen. Anschließend wird das Akzeptormedium wieder bis zum Eichstrich aufgefüllt und danach die Hautoberfläche mit 500 µl Donor beschickt und mit Parafilm verschlossen. Zwischen dem Beschicken der einzelnen Zellen muss ein Zeitabstand von ca. 30 Sekunden liegen. Dieses Zeitintervall ist auch bei den späteren Probennahmen einzuhalten.

5.4 Probenentnahme

Die Entnahme geschieht mittels Einmalspritzen und Einmalkanülen aus der Mitte der Akzeptorkammer. Für jede Franzzelle wird dabei im Versuch dieselbe Spritzen-Kanülen-Kombination verwendet, die vor Versuchsbeginn mit dem Akzeptormedium zu entlüften ist. Um auch den Inhalt des Entnahmerohres gleichmäßig zu verteilen, wird vor der endgültigen Entnahme ein Volumen von 400 µl mit Hilfe der Skalierung der Spritze dreimalig aus der Mitte der Akzeptorkammer aufgezogen und wieder in die Akzeptorkammer zurückgegeben. Dabei ist darauf zu achten, dass das Luftpolster aus Spritzenhals und Kanüle entfernt wird. Ist dies im Einzelfall nicht möglich, ist zur anschließenden Entnahme von 400 µl Probe der Spritzenstempel bis zur 500 µl Markierung der Spritze aufzuziehen. Das Totvolumen der Spritzen-Kanülen-Kombination von ca. 100 µl führt zum Aufziehen einer Luftblase, die sich beim Abdrücken der Spritze unter dem Stempel befinden muss. Die Luftblase bewirkt die vollständige Entleerung der aufgezogenen 400 µl. Die Probe wird in ein beschriftetes Reaktionsgefäß überführt und dieses verschlossen. Die Franzzelle wird mit derselben Spritzen-Kanülen Kombination mit Akzeptormedium wieder bis zum Eichstrich aufgefüllt. Dies dient sowohl dem Ersatz des entnommenen Volumens als auch der Reinigung der Spritze vor der nächsten Probenentnahme. Zeitpunkte der Probennahme richten sich nach Hautqualität und Donor. Auch bei der Probenentnahme ist darauf zu achten, dass sich unter der Hautoberfläche keine Luftblasen bilden, wenn doch, müssen diese durch vorsichtiges Schwenken der Franzzelle entfernt werden.

5.5 Versuchsende

Nach der letzten Probenentnahme wird der Parafilm abgenommen und der Donor mit einer Pipette entfernt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wird die eingespannte

Titel Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen in Franz-Diffusionzellen mit verschiedenen Hautqualitäten		Version 03	Dokumentennr.: SOP_M_FZ_03	
Erstausgabedatum 13.12.2004	gültig ab 13.12.2004	Ersteller Frank Niedorf / Alexander Vuia		Seite 8
			von 9	

Haut abgenommen (evtl. erfolgt eine Weiterverarbeitung für Histologie oder MTT-Test, siehe Anlage), sodann wird das Akzeptormedium abgesaugt und gemäß Punkt 6 der Entsorgung zugeführt.

6 Reinigung und Entsorgung

Das Akzeptormedium ist im Chemikalienabfall (Lösemittelgemische, keine halogenierten Lösungsmittel enthaltend) zu entsorgen. Die Franzzellen müssen mehrfach mit Wasser gespült werden. Hartnäckige Rückstände können mit Aceton beseitigt werden.

6.1 Besondere Vorkehrungen zur Reinigung und Entsorgung von radioaktivem Material

- Das Akzeptormedium, sowie alle weiteren flüssigen radioaktiven Abfälle werden in den dafür vorgesehenen Behälter für flüssige nicht kompaktierbare radioaktive Stoffe gesammelt. Alle festen kompaktierbaren radioaktiven Abfälle werden in den dafür vorgesehenen Behälter entsorgt.
- Nach jedem Arbeiten mit offenen radioaktiven Stoffen sind die Hände sorgfältig zu reinigen, auch wenn – wie vorgeschrieben – während der Arbeit Schutzhandschuhe getragen werden.
- Mit radioaktivem Material verunreinigte Gegenstände müssen sofort gereinigt werden, der Erfolg der Reinigung wird mit Wischtests kontrolliert.
- Alle radioaktive Materialien enthaltenden Behälter und Gefäße müssen deutlich mit Namen, Datum, Nuklid, Substanz und ungefähre Menge gekennzeichnet sein.
- Nach Abschluss eines Versuchs sind Geräte und Arbeitsplatz durch einen Wischtest auf radioaktive Verunreinigungen zu untersuchen. Etwa 1 cm² große Stücke von saugfähigem Papier werden mit Ethanol getränkt und damit die Arbeitsfläche bzw. das Gerät abgewischt. Die Papierstücke werden in Eppendorf-Gefäße mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Betacounter vermessen.

Titel Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen in Franz-Diffusionzellen mit verschiedenen Hautqualitäten		Version 03	Dokumentennr.: SOP_M_FZ_03	
Erstausgabedatum 13.12.2004	gültig ab 13.12.2004	Ersteller Frank Niedorf / Alexander Vuia		Seite 9
				von 9

- Die Ergebnisse der Wischttests, sowie die Protokolle der entnommenen radioaktiven Substanzen werden gesammelt.
- Abfälle und Reste radioaktiven Materials sowie mit radioaktiven Stoffen stark verunreinigte Gegenstände werden separat in den bereitgestellten Tonnen gelagert. Der Transport aus den Räumen muss in stabilen Beförderungsbehältern erfolgen. Radioaktive Flüssigkeiten in zerbrechlichen Gefäßen müssen in einem unzerbrechlichen und dichten Schutzbehälter, der eine genügende Menge eines saugfähigen Stoffes enthält, befördert werden. Die radioaktiven Abfälle werden gemäß StSchV in getrennten Behältern (fest/flüssig, brennbar/nicht/brennbar) gesammelt.
- Bei Stör- und Unfällen ist unverzüglich der Strahlenschutzbeauftragte zu benachrichtigen.

7 Mitgeltende Unterlagen

Substanzzubereitung/ Qualität Testosteron/Coffein

Analytik/Validierung der Testsubstanzen

- HPLC
- Radioaktiv

Arbeitsanweisung zur Nutzung der versch. Hautqualitäten

- HSE
- SH
- EH
- EpiDerm
- Skinethic
- Episkin

Viabilitäts- und Vitalitätsprüfungen

- HISTO
- MTT