



Universität des Saarlandes
 FR Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie
 Im Stadtwald, Geb. 8.1
 66123 Saarbrücken

Standardarbeitsvorschrift im Rahmen des BMBF Verbundvorhabens

Validierungsstudie zur Prüfung auf Hautpenetration mit Hilfe von
 biotechnologisch hergestellten Hautmodellen

Standard Operating Procedure (SOP)

Titel Präparation von Humanhaut (hitzeseparierte Humanepidermis)		Version 03	Dokumentennr. SOP_M_HSE_03	
Erstausgabedatum 13.03.2003	gültig ab 9.09.2003	Ersteller Frank Netzlaff	Seite 1	von 10
Ausgabe	gültig ab	Beschreibung der Änderung		
01	13.03.2003	Erstausgabe		
02	9.09.2003	Einfügung Zeit zwischen Hautentnahme und Präparation		
03	08.02.2008	Redaktionelle Anpassung		
Genehmigung: Dr. Ulrich Schäfer				
Erstellt: Frank Netzlaff		Geprüft: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting	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 Präparation von Humanhaut (hitzeseparierte Humanepidermis)		Version 03	Dokumentennr. SOP_M_HSE_03	
Erstausgabedatum 13.03.2003	gültig ab 9.09.2003	Ersteller Frank Netzlaff	Seite 2	von 10

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1 ZWECK	3
2 EINSATZBEREICH	3
3 LIMITIERUNGEN	3
4 MATERIALIEN + GERÄTE	4
4.1 Transportgefäße für die Haut.....	4
4.2 Geräte und Materialien zur Hautpräparation.....	4
4.3 Geräte und Materialien zum Einfrieren/Lagerung der Haut.....	4
4.4 Geräte und Materialien zur Herstellung des hitzeseparierten Epidermissheet.....	4
4.5 Geräte zur Überführung der hitzeseparierten Epidermissheets in ein statische Franzdiffusinzelle.....	5
5 DURCHFÜHRUNG	6
5.1 Erfassung von Hautdaten.....	6
5.2 Transport der Haut.....	6
5.3 Präparation der Haut.....	6
5.4 Einfrieren/Lagerung der Haut.....	7
5.5 Herstellung hitzeseparierter Epidermissheets.....	7
5.6 Überführung der hitzeseparierter Epidermissheets in statische Franzzellen.....	8
6 DATEN	9
6.1 Dokumentation und Archivierung der Daten.....	9
7 LITERATUR	10

Titel Präparation von Humanhaut (hitzeseparierte Humanepidermis)		Version 03	Dokumentennr. SOP_M_HSE_03	
Erstausgabedatum 13.03.2003	gültig ab 9.09.2003	Ersteller Frank Netzlaff	Seite 3	von 10

1 ZWECK

Diese Standardanweisung beschreibt die Gewinnung von hitzeseparierten Epidermissheets zum Einsatz bei Permeationsversuchen mit statischen Franzellen.

2 EINSATZBEREICH

Diese Arbeitsanweisung dient zur Gewinnung standardisierter hitzeseparierter Humanepidermissheets für in-vitro Permeationsversuche.

3 LIMITIERUNGEN

Eine Übertragung der hier beschriebenen Methode auf Tierhäute ist nicht möglich. Werden Humanhäute aus anderen Körperregionen als dem Bauchbereich benutzt, muss die Vorschrift ggf. geringfügig variiert werden. Die Haut darf maximal 6 Monate bei einer Temperatur von $-20 / -26^{\circ}\text{C}$ eingefroren bleiben.

Titel Präparation von Humanhaut (hitzeseparierte Humanepidermis)		Version 03	Dokumentennr. SOP_M_HSE_03	
Erstausgabedatum 13.03.2003	gültig ab 9.09.2003	Ersteller Frank Netzlaff	Seite 4	von 10

4 MATERIALIEN + GERÄTE

4.1 Transportgefäße für die Haut

- Kühltasche mit Kühlakkus
- Tuch um einen direkten Kontakt zwischen den Kühlakkus und der Haut zu vermeiden

4.2 Geräte und Materialien zur Hautpräparation

- 2 Skalpelle
- 2 Chirurgische Pinzetten
- 2 Anatomische Pinzetten
- 4 Arterienklemmen nach Rochester-Ochsner, gerade
- 1 Schere
- 1 Präparierplatte (Lochplatte) oder Präpariertisch
- 4 Gummiringe
- Zemuko, Fa. Hartmann
- Aluminiumfolie
- Anatomische Schere

4.3 Geräte und Materialien zum Einfrieren/Lagerung der Haut

- 2 Anatomische Pinzetten
- Aluminiumfolie
- PE-Gefrierbeutel
- Tesafilm Klebeband z.B. Typ Multi-Film kristall-klar, Fa. Baiersdorf, Hamburg

Titel Präparation von Humanhaut (hitze-separierte Humanepidermis)		Version 03	Dokumentennr. SOP_M_HSE_03	
Erstausgabedatum 13.03.2003	gültig ab 9.09.2003	Ersteller Frank Netzlaff	Seite 5	von 10

4.4 Geräte und Materialien zur Herstellung des hitze-separierten Epidermissheet

- Henkeleisen/Locheisen 20 und 25 mm
- 2 Anatomische Pinzetten
- Becherglas mit Wasser 60°C
- Wasserbad 60°C
- Petrischalen
- Lupe
- Stoppuhr
- Pinzette für Deckgläser, gebogen
- Filterpapier Schleicher und Schüll Typ 595
- Cellulosemembran Dianorm Typ 10.17, Durchmesser 63 mm (Fa. Günther Maierhofer, Stöckelstr. 5a, 81247 München, Tel. 089-8114447
- PBS-Puffer
- Ringerlösung
- Ggf. Akzeptormedium

4.5 Geräte zur Überführung der hitze-separierten Epidermissheets in ein statische Franzdiffusionszelle

- Pinzette für Deckgläser, gebogen

Titel Präparation von Humanhaut (hitze-separierte Humanepidermis)		Version 03	Dokumentennr. SOP_M_HSE_03	
Erstausgabedatum 13.03.2003	gültig ab 9.09.2003	Ersteller Frank Netzlaff	Seite 6	von 10

5 DURCHFÜHRUNG

5.1 Erfassung von Hautdaten

Alter:

Geschlecht:

Hautareal:

Verwendetes Desinfektionsmittel:

Krankheiten, welche die Haut betreffen:

Zeitpunkt der Entnahme:

Zeit zwischen Entnahme und Präparation:

Einfrierzeitpunkt:

5.2 Transport der Haut

Innerhalb von 6 Stunden nach Entnahme unter Kühlung, eingeschlagen in OP-Tüchern, um eine Kontamination mit subcutanem Fettgewebe zu vermeiden. (Durch diese Vorgehensweise bleibt der native Hydratationszustand der Haut erhalten.)

5.3 Präparation der Haut

1. Benötigte Geräte bereitlegen.
2. Präparierplatte oder Präpariertisch mit einer Lage Aluminiumfolie und darüber einer Lage Zemuko abdecken.
3. Reinigung der Hautoberfläche mit lauwarmem Wasser (Zemuko).
4. Aufteilen der Haut in ca. 10 cm x 10 cm große Stücke (Skalpells oder Schere).
5. Hautstück mit der Stratum-corneum-Seite nach unten auf den Präpariertisch legen.
6. An den vier Hautecken die Arterienklemmen befestigt und mittels der Gummiringe die Haut spannen.
7. Mittels eines Skalpells wird das subcutane Fettgewebe abpräpariert. Hierzu wird das subcutane Fettgewebe mit einer chirurgischen Pinzette gegriffen und direkt unterhalb

Titel Präparation von Humanhaut (hitzeseparierte Humanepidermis)		Version 03	Dokumentennr. SOP_M_HSE_03	
Erstausgabedatum 13.03.2003	gültig ab 9.09.2003	Ersteller Frank Netzlaff	Seite 7	von 10

der Dermis mittels Skalpell abgetrennt. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Kontamination der Oberfläche der Haut (Stratum corneum) durch subcutanes Fett erfolgt.

5.4 Einfrieren/Lagerung der Haut

1. Präparierte Hautstücke mittels den anatomischen Pinzetten auf Aluminiumfolie legen und ggf. glattstreichen.
2. In Aluminiumfolie eingeschlagen (Ränder mehrmals umbördeln) und anschließend in den Gefrierbeutel gegeben. Diesen möglichst luftdicht verschließen (Klebeband).
3. Bei -20°C bis -30°C in der Kühltruhe auf einer ebenen Unterlage einfrieren.
4. Vor Weiterverwendung sind die Proben mindestens 24 Stunden in der Gefriertruhe zu lagern.
5. Die maximale Lagerungszeit beträgt 6 Monate.

5.5 Herstellung hitzeseparierter Epidermissheets

Vorbereitung der Cellulosemembran:

Mittels eines Henkeleisens wird eine Stanze von 25 mm Durchmesser genommen und für 24 Stunden in destilliertem Wasser in einer Petrischale gewässert. Danach wird die Membran für 1 Stunde in PBS umhydratisiert. Je nach verwendetem Akzeptormedium ist an Stelle des PBS Puffers ggf. dieses zu verwenden.

Entnahme der Hautprobe:

Mittels einer Stanze (Henkeleisen, Locheisen) wird aus dem gefrorenen Hautstück eine Hautprobe mit einem Durchmesser von 20 mm entnommen. Der Stanzabstand zum Rande des Hautstückes muss mindestens 5 mm betragen. Dabei ist auf jeden Fall zu vermeiden, dass das Resthautstück antaut. Ggf. eine Cold-plate verwenden. Angetaute Resthautstücke dürfen nicht wieder eingefroren und weiterverwendet werden!

Das ausgestanzte Hautstück wird zum Auftauen auf ein Filterpapier gelegt (Auftauzeit ca. 5 Minuten).

Titel Präparation von Humanhaut (hitzeseparierte Humanepidermis)		Version 03	Dokumentennr. SOP_M_HSE_03	
Erstausgabedatum 13.03.2003	gültig ab 9.09.2003	Ersteller Frank Netzlaff	Seite 8	von 10

Nach dem Auftauen oberflächlich mit Ringerlösung auf einem Wattebausch reinigen. Hautprobe makroskopisch auf Unversehrtheit inspizieren. Ggf. Lupe verwenden.

Hitzeseparation der Haut:

Um Dermis und Epidermis (Stratum corneum und ‚lebende‘ Epidermis) zu trennen wird wie folgt vorgegangen:

1. Einbringen der Hautprobe in Wasser von 60°C für 90 Sekunden (anatomische Pinzette).
2. Aufbringen der Hautprobe auf Filterpapier (Stratum corneum oben, Dermis unten) und trocken tupfen der Oberfläche mit Filterpapier.
3. Abpräparieren der Epidermis mittels einer stumpfen Pinzette (anatomische Pinzette) durch vorsichtiges Rubbeln vom Rand des Hautstückes her.
4. Überführen der abpräparierten Epidermis in eine Petrischale mit PBS, Stratum-corneum-Seite nach oben.
5. Hydratisierung für mindestens 30 min in PBS. Dabei entfaltet sich die abpräparierte Epidermis vollständig.
6. Zur Verbesserung der Handhabung des sehr dünnen Epidermispräparates wird dieses auf eine Cellulosemembran aufgezo-gen, die mindestens 1 Stunde lang in PBS gequollen wurde (siehe oben). Hierzu gequollene Cellulosemembran mittels einer Pinzette für Deckgläser unter die Epidermis schieben und anschließend Epidermis und Cellulosemembran entnehmen.

5.6 Überführung der hitzeseparierten Epidermissheets in statische Franzellen

1. Die auf die Cellulosemembran aufgezo-gene Epidermisprobe wird in statische Franzellen überführt. Dabei ist zu gewährleisten, dass die Epidermis mindestens 2 mm auf dem Glasrand der Zelle aufliegt.
2. Vor dem Versuch wird 30 Minuten äquili-briert.
3. Das weitere Vorgehen erfolgt nach der bei den Kunsthäuten beschriebenen SOP.

Titel Präparation von Humanhaut (hitzeseparierte Humanepidermis)		Version 03	Dokumentennr. SOP_M_HSE_03	
Erstausgabedatum 13.03.2003	gültig ab 9.09.2003	Ersteller Frank Netzlaff	Seite 9	von 10

6 DATEN

6.1 Dokumentation und Archivierung der Daten

Die Daten der Haut sind auf einer Karteikarte zu erfassen und unter Verschluss aufzubewahren.

7 LITERATUR

Wagner H, Kostka KH, Lehr CM, Schäfer U, Human skin penetration of flufenamic acid: In vivo/in-vitro correlation (deeper skin layers) for skin samples from the same subject, J. Invest. Dermatol., Vol. 118 (3) 540-544 (2002)

Wagner H, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF, Correlation between Stratum Corneum/Water-Partition Coefficient and Amounts of Flufenamic Acid Penetrated into the Stratum Corneum, J. Pharm. Sciences, Vol 91 (2002) 1915-1921

Wagner H, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF, Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in-vitro experiments with human skin and skin equivalents, J. Contr. Rel., 75 (2001) 283-295

Wagner H, Kostka Karl-Heinz, Lehr CM, Schäfer UF, Drug distribution in Human Skin Using Two Different In Vitro Test Systems: Comparison with In Vivo Data, Pharm. Res. 17 (2000) 1475-1481