

Stellungnahme

aus dem Ausschuss für Tierschutzbeauftragte

**zur Applikation in den retrobulbären Venenplexus
bei Mäusen**

Stand: Dezember 2012

**Autoren:
Rüdiger Hack, Frankfurt/Main
Christine Krüger, Essen
Kira Scherer, Aachen
Renate Thiel, Berlin
Heike Weinert, Halle**

Der Ausschuss hat sich in seinen Empfehlungen zur Applikation von Substanzen bei Versuchstieren kritisch mit den üblichen Applikationsmethoden auseinandergesetzt.

In letzter Zeit sind bei einigen Genehmigungsbehörden Anträge auf Genehmigung nach § 8 Abs. 1 TierSchG eingereicht worden, in denen Mäusen Zellsuspensionen nicht wie allgemein üblich intravenös über die lateralen Schwanzvenen, sondern über den retrobulbären Venenplexus appliziert werden sollten. Bezogen wird sich dabei auf eine Publikation von Hall et al. (2007), in der die Autoren hämatopoetische Stammzellen vergleichend über beide Applikationswege injiziert hatten und dabei feststellten, dass die Injektion in den retrobulbären Venenplexus gegenüber der intravenösen Injektion in die lateralen Schwanzvenen in deutlich höheren Transplantationserfolgen, höheren transplantierten Zellzahlen und einer geringeren Streuung resultierte.

Bewertung der Methode

Die Injektion in den retrobulbären Venenplexus stellt keine Standardmethode zur parenteralen Applikation dar und wird aus folgenden Gründen von der GV-SOLAS grundsätzlich nicht empfohlen:

- Es ist davon auszugehen, dass bei der Injektion in den retrobulbären Venenplexus mehr und stärkere traumatisch bedingte lokale Veränderungen entstehen als bei der Punktion dieser Stelle zur Blutentnahme: es wird aktiv injiziert und dabei kann sich die scharf angeschliffene Injektionsnadel frei im Gewebe bewegen.
- Die Applikation ist nicht sicher intravenös, da blind in einen Sinus appliziert wird und der korrekte Sitz der Kanüle nicht durch Sichtkontrolle verifiziert werden kann.
- Das Volumen, das tatsächlich intravasal appliziert wird, kann nicht sicher bestimmt werden.
- Der Anteil, der extravasal gelangt, kann bei ungünstigen Eigenschaften der Lösung/Suspension/Emulsion zu lokalen Gewebsreizungen und bei zu großen Volumina zum Exophthalmus führen.

Im Moment ist den Autoren keine wissenschaftliche Fragestellung bekannt, für die die retrobulbäre Applikation unerlässlich ist. Falls es dennoch in Einzelfällen Gründe für die Unerlässlichkeit dieser Methode geben sollte, sind folgende Punkte zu berücksichtigen:

- Die Methode darf nur von nachweislich besonders trainierten Personen durchgeführt werden.
- Sie darf nur in Narkose durchgeführt werden (ggf. kann die Allgemeinanästhesie über Augentropfen oder Augensalbe lokal analgetisch ergänzt werden).
- Die Injektion muss langsam stattfinden.
- Es sollten Kanülen der Stärke 27G oder dünner verwendet werden.
- Es dürfen keine reizenden Substanzen oder Lösungsmittel verwendet werden.
- Es dürfen keine Tumorzellen verwendet werden.
- Es dürfen nur Einzelzellsuspensionen verwendet werden.
- Es dürfen maximal 0,15 ml pro 30 g KGW bei einer adulten Maus appliziert werden.
- Es darf nur eine Applikation pro Tag erfolgen, insgesamt zwei Applikationen pro Auge mit mindestens zwei Wochen Abstand zwischen den Applikationen.

Die Methode stellt höchste Anforderungen an die Fertigkeiten des Durchführenden, insbesondere höhere Anforderungen als die Standardmethode der Applikation in die Schwanzvene. Obwohl die verfügbare Literatur (s. u.) keine übereinstimmenden Hinweise auf traumatisch bedingte Veränderungen am Auge aufzeigt, kann dies zunächst nur als Anhaltspunkt dafür angesehen werden, dass diese veröffentlichten Studien von besonders gut geschultem Personal durchgeführt wurden und Daten mit negativen Folgen bisher nicht publiziert worden sind.

Die Belastung der Tiere durch diesen Eingriff ist schwer abzuschätzen, da sie bei dieser Methode besonders stark von den individuellen Fertigkeiten des jeweiligen Durchführenden abhängt. Bei korrekter Durchführung und unter Einhaltung der genannten Voraussetzungen kann sie zum derzeitigen Zeitpunkt als gering eingeschätzt werden.

Zusammenfassung der Literatur zur Methodik:

Die Methode der Applikation über den retrobulbären Venenplexus an sich ist nicht neu. Erstmals erwähnt wurde sie von Pettit (1913: zitiert nach Tilgner, S., Metzke, H., 1964). Sie ist auch in einem aktuellen Handbuch zur Versuchstierkunde beschrieben (Pekow C.A., Baumans V., 2003).

In den Händen eines geübten Experimentators halten alle Autoren die Applikation über den retrobulbären Venenplexus für ausreichend sicher und vergleichbar mit der üblichen Applikation über die laterale Schwanzvene. Die Datenlage zur Pathohistologie ist nicht einheitlich: es ist sowohl das Auftreten von Nekrosen als auch die Abwesenheit von traumatisch bedingten Gewebeschädigungen beschrieben worden.

Als mögliche Komplikationen werden von den Autoren die Gefahr des Durchbrechens in die arterielle Blutbahn, wenn (zu) hoher Druck ausgeübt wird, sowie die zu erwartenden Injektion von Teilmengen der Injektionslösung bzw. -suspension in das umliegende Gewebe genannt. Als besonders ernst zu nehmende Gefahr wird die Absiedlung von Tumorzellen bei Tumorzellinjektionen in das umgebende Gewebe angesehen.

Als wesentlicher Vorteil der retrobulbären Applikation wird der geringere Stress für die Tiere genannt. Der Stress hängt allerdings von der Art der Fixierung der Tiere ab: während zur retrobulbären Applikation die Tiere generell in Narkose gelegt werden sollten, wurden die Tiere bei Schwanzvenenapplikation während der Zeit der Applikation selbst sowie während der Zeit der Erwärmung der Schwänze per Wärmelampe mehrere Minuten fixiert.

Eng damit verbunden ist der geringere Zeitaufwand: Narkose plus Injektion dauern bei retrobulbärer Applikation ca. 1 Minute, die Erwärmung der Schwänze zur Applikation in die Schwanzvene dauert hingegen alleine mehrere Minuten.

Als weiterer Vorteil wird angesehen, dass die retrobulbäre Applikation auch bei Tieren mit stark pigmentierten oder vernarbten Schwänzen möglich ist. Ebenso kann sie bei neugeborenen Mäusen, Hamstern und Meerschweinchen angewendet werden, bei denen eine Applikation in die Schwanzvene nicht möglich ist.

Pansky B., Jacobs M., House, E.L., Tassoni J.P. (1961): The orbital region as a source of blood samples in the golden hamster. Anatomical Record 139, 409-412.

Ausführliche Beschreibung der anatomischen Verhältnisse und der Methode beim Goldhamster; mit und ohne Narkose; Kanülen der Stärke G23; Verwendung in der Diabetes-Forschung am Hamster;

Tilgner S., Metzke H. (1964): Die Blutentnahme aus den Venen der Orbita. Zeitschrift für Versuchstierkunde 5, 59-77

Ausführliche Beschreibung der anatomischen Verhältnisse bei Kaninchen, Meerschweinchen, Goldhamster, Ratte, Maus, Steppenlemming.

Allgemeine Beschreibung der Applikation über die Orbitalvenen bei diesen Spezies;

Pinkerton W., Webber M. (1964): A method of injecting small laboratory animals by the ophthalmic plexus route. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 116, 959-961

Applikation von 0,2 ml Kontrastmittel; Narkose nicht generell gefordert; Warnung vor zuviel Druck, dann Injektion in den arteriellen Kreislauf und Knochenbrüche möglich, empfohlen für Mäuse, Hamster, Meerschweinchen und Ratten, technisch schwieriger als retrobulbäre Blutentnahme, da größere Gefäße gefunden werden müssen; Vorteile: kein Aufwärmen der Tiere, schneller, weniger Stress, von Vorteil bei Tieren mit schwarz pigmentiertem Schwanz bzw. ohne Schwanz (Hamster, Meerschweinchen);

Voelcker G., Fortmeyer H.P. (1979): Die intravenöse Injektion über den retrobulbären Plexus bei der Maus. Zeitschrift für Versuchstierkunde 21, 177-181.

Kein Unterschied bei der Ausscheidungskinetik von Inulin nach retrobulbärer oder Applikation über die Schwanzvene; Volumen bis 10 ml/kg KGW. möglich; Verwendung von Kanülen der Größe 27G; keine Angabe zur Narkose; Methode wird als anwendbar angesehen für Maus, Ratte, Hamster, Meerschweinchen;

Weisbrod D. (1982): Erfahrungen bei der intravenösen Substanzapplikation über den retrobulbären Plexus. Zeitschrift für Versuchstierkunde 24, 241-243.

Anwendung bei Mäusen und Ratten in Toxizitätsversuchen; Verwendung von Kanülen der Größe 25G; maximale mögliche Volumina bei der Maus 8 - 10 ml/kg KGW, bei der Ratte 4 - 5 ml/kg KGW.; immer in Narkose;

besonderer Vorteil der Methode für wiederholte Injektionen und bei Schwanzverletzungen männlicher Mäuse in Gruppenhaltung; für Ratten wird kein Vorteil gegenüber der Schwanzveneninjektion gesehen;

Price J.E., Barth R.F., Johnson C.W., Staubus A.E. (1984): Injection of cells and monoclonal antibodies into mice: comparison of tail vein and retroorbital routes. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 177, 347-353

Einmalige Applikation von radioaktiv markierten Reagenzien, Thymozyten und B16-Melanomzellen; Volumina 0,2 ml mit Kanülen der Größe 27G; kein Unterschied in der Ausscheidung und Verteilung zwischen beiden Applikationsmethoden nach 12 h; aber Warnung vor Absiedlung von Melanomzellen in Orbita und Gehirn und Tod der Tiere bei einem Vorversuch;

Vorteile: kein Aufwärmen der Tiere zur Erweiterung der Schwanzvenen notwendig, dadurch schnellere Durchführung, weniger Stress, besonders geeignet für Tiere mit schwarz pigmentiertem Schwanz;

Steel C.D., Stephens A.L., Hahto S.M., Singletary S.J., Ciavarra R.P. (2008) Comparison of the lateral tail vein and the retro-orbital venous sinus as routes of intravenous drug delivery in a transgenic mouse model. Lab Animal (NY) 37, 26-32

Tägliche Applikation einer Prüfsubstanz über fünf Tage: retrobulbär unter Isofluran-Narkose mit täglichem Wechsel des Auges im Vergleich zur Schwanzvene ohne Narkose und mit manueller Fixation des Schwanzes durch den Käfigdeckel, Erwärmen mit 50 Watt Lampe über 2 - 3 min gefolgt von Injektion in die laterale Schwanzvene; Applikation von 0,08 ml, keine Angabe zur Kanülengröße; vergleichende Untersuchung der Stressreaktionen; keine Unterschiede bei der Substanzwirkung feststellbar;

Vorteile: histologisch wurden zwar Anzeichen für eine lokale Entzündung aber keine traumatisch bedingten sonstigen Schäden an der Injektionsstelle nachgewiesen; schnellere Durchführung, kein Unterschied bei Prüfung pharmakologischer Effekte, höhere Aggressivität bei den Tieren, die über die Schwanzvene appliziert wurden;

Schoell A.R., Heyde B.R., Weir D.E., Chiang P.-C, Hu Y., Tung D.K. (2009) Euthanasia method for mice in rapid time-course pulmonary pharmacokinetic studies. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 48, 506-511

Vergleich der Applikation von 1 ml einer 10 : 1 Mischung von Ketamin (100 mg/ml) und Xylazin (100 mg/ml) retrobulbär oder über die Schwanzvene (Kanülengröße 26G). Retrobulbär starben die Tiere 5 Sek., über die Schwanzvene 3 Sek. nach Injektion – unter Berücksichtigung der Vorbereitungszeit waren es 10 Sek. und 60 Sek. (noch ohne Einrechnung der Zeit unter der Wärmelampe);

Geeignet für spezielle Studien, bei denen eine engmaschige Kinetik bestimmt werden muss und mechanische Tötungsverfahren nicht in Frage kommen;

Yardeni T., Eckhaus M., Morris H.D., Huizing M., Hoogstraten-Miller S. (2011) Retro-orbital injections in mice. Lab Animal (NY) 40, 155-160

Genauere Methodenbeschreibung für adulte (Isofluran-Narkose und zusätzliche Lokalanästhesie; Kanülengröße 27G oder kleiner, Volumen maximal 0,15 ml) und neonatale Mäuse (ohne Narkose, Kanülengröße 31G, Volumen maximal 0,01 ml); Training des Operateurs notwendig, nur Einzelzellsuspensionen, am besten körperwarm; Es wurden histologisch keine Veränderungen festgestellt, aber gelegentlich das Austreten von injiziertem Material ins umgebende Gewebe, weshalb von der Applikation von Tumorzellen abgeraten wird.

Kränzlin B., Schock-Kusch D., Skude V., Gretz N. (2012): GFR Messung in der Maus nach retrobulbärer Injektion der Markersubstanz. 50. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS und 14. Fortbildungsveranstaltung der IGTP, Aachen (Posterpräsentation)

Vergleich zwischen retrobulbärer und intravenöser Applikation von Markersubstanzen zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate unter Inhalationsnarkose. Detaillierte Beschreibung der Methoden und Analyse der Pathohistologie.

Verfügbarkeit der Markersubstanz nach beiden Applikationsmethoden vergleichbar, 48 h nach der Applikation wurden im Bereich der Injektionsstellen Entzündungsreaktionen und Nekrosen beobachtet; die Methode wird nur für die Injektion kleiner Mengen wasserlöslicher und gut verträglicher Substanzen, aber nicht für Mehrfach-Injektionen empfohlen und als weniger belastend eingeschätzt als die Applikation über die lateralen Schwanzvenen.

Sonstiges zur retrobulbären Applikation

Die Institutional Animal Care and Use Committees (IACUCs) einiger amerikanischen Universitäten (z. B. University of California, Oregon University, New York University) sehen die Methode für gewebeverträgliche Substanzen als akzeptable Alternative zur Schwanzvenenapplikation an. Sie limitieren das zu applizierende Volumen auf 0,1 - 0,2 ml pro Auge und adulter Maus, auf eine Applikation pro Tag und auf insgesamt zwei Applikationen pro Auge mit 1 - 2 Tagen Abstand (California, New York) bzw. 2 Wochen (Oregon) zwischen den Applikationen. Die Applikation soll langsam und in Narkose erfolgen, in New York wird für den Eingriff nur eine Lokalanästhesie empfohlen.

Literatur:

Hall S.L., Lau K.-H.W., Chen S.T., Felt J.C., Gridley D.S., Yee J.K., Baylink D.J. (2007): An improved mouse Sca-1+ cell-based bone marrow transplantation model for use in gene- and cell-based therapeutic studies. *Acta Haematologica* 117, 24-33.

Kränzlin B., Schock-Kusch D., Skude V., Gretz N. (2012): GFR Messung in der Maus nach retrobulbärer Injektion der Markersubstanz. 50. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS und 14. Fortbildungsveranstaltung der IGTP, Aachen (Posterpräsentation).

Pansky B., Jacobs M., House E.L., Tassoni J.P. (1961): The orbital region as a source of blood samples in the golden hamster. *Anatomical Record* 139, 409-412.

Pekow C.A., Baumans V. (2003): Common nonsurgical techniques and procedures. In: *Handbook of laboratory animal science, Volume I* (Hrsg. Hau J., Van Housier G.L.) 2. Auflage, CRC Press, p. 351-387.

Pinkerton W., Webber M. (1964): A method of injecting small laboratory animals by the ophthalmic plexus route. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 116, 959-961.

Price J.E., Barth R.F., Johnson C.W., Staubus A.E. (1984): Injection of cells and monoclonal antibodies into mice: comparison of tail vein and retroorbital routes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 177, 347-353.

Schoell A.R., Heyde B.R., Weir D.E., Chiang P.-C, Hu Y., Tung D.K. (2009): Euthanasia method for mice in rapid time-course pulmonary pharmacokinetic studies. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 48, 506-511.

Steel C.D., Stephens A.L., Hahto S.M., Singletary S.J., Ciavarra R.P. (2008): Comparison of the lateral tail vein and the retro-orbital venous sinus as routes of intravenous drug delivery in a transgenic mouse model. *Lab Animal (NY)* 37, 26-32.

Tilgner S., Metzke H. (1964): Die Blutentnahme aus den Venen der Orbita. *Zeitschrift für Versuchstierkunde* 5, 59-77.

Voelcker G., Fortmeyer H.P. (1979): Die intravenöse Injektion über den retrobulbären Plexus bei der Maus. *Zeitschrift für Versuchstierkunde* 21, 177-181.

Weisbrod D. (1982): Erfahrungen bei der intravenösen Substanzapplikation über den retrobulbären Plexus. *Zeitschrift für Versuchstierkunde* 24, 241-243.

Yardeni T., Eckhaus M., Morris H.D., Huizing M., Hoogstraten-Miller S. (2011): Retro-orbital injections in mice. *Lab Animal (NY)* 40, 155-160.