



GV-SOLAS

Gesellschaft für Versuchstierkunde
Society for Laboratory Animal Science

Stellungnahme

**aus dem Ausschuss für Tierschutzbeauftragte
(GV-SOLAS)**

Applikationen in den retrobulbären Venensplexus bei Mäusen

Stand November 2023

Verfasst von:

**Rüdiger Hack, Christine Krüger, Kira Scherer,
Katja Siegeler, Heike Weinert**

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	3
Bewertung der Methode	3
Zusammenfassung der Literatur zur Methodik.....	4
Sonstiges zur retrobulbären Applikation	8
Literatur	9

Einleitung

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. Als Referenz dient dabei 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 nicht als Standardmethode 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.

Derzeit 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 höhere Anforderungen an die Fertigkeiten des Durchführenden, insbesondere höhere Anforderungen als die Standardmethode der Applikation in die Schwanzvene. Obwohl die verfügbare Literatur (s. u.) keine eindeutigen 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 und Daten mit negativen Folgen bisher nicht publiziert wurden.

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 nach derzeitigem Kenntnisstand 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 & Metzke 1964). Sie ist auch in einem aktuellen Handbuch zur Versuchstierkunde beschrieben (Pekow & Baumans 2003).

Wenn sie von ausreichend geübten Personen ausgeführt wird, wird die Applikation über den retrobulbären Venenplexus für ausreichend sicher und vergleichbar mit der üblichen Applikation über die laterale Schwanzvene angesehen. Die Datenlage zur Pathohistologie ist nicht einheitlich: es ist zwar das Auftreten von Nekrosen beschrieben worden, aber auch das Ausbleiben von traumatisch bedingten Gewebeschädigungen.

Als mögliche Komplikationen werden in der Literatur 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, werden die Tiere bei Schwanzvenenapplikation während der Zeit der Applikation selbst sowie während der Zeit der Erwärmung der Schwänze über mehrere Minuten fixiert. Außerdem wird angeführt, dass es bei der Schwanzvenenapplikation wiederholt Fehlversuche gäbe, die einen Ersatz von weiteren Tieren erfordern würden.

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.

Literatur in chronologischer Aufstellung

Tilgner & Metzke (1964):

- Ausführliche Beschreibung der anatomischen Verhältnisse bei Kaninchen, Meerschweinchen, Goldhamster, Ratte, Maus, Steppenlemming;
- Allgemeine Beschreibung der Applikation über die Orbitalvenen bei diesen Spezies.

Pinkerton & Webber (1964):

- Applikation von 0,2 ml Kontrastmittel; Narkose nicht generell gefordert;
- Warnung vor zu viel 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;
- vorteilhaft bei Tieren mit schwarz pigmentiertem Schwanz bzw. ohne Schwanz (Hamster, Meerschweinchen).

Voelcker & Fortmeyer (1979):

- 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 (1982):

- 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 et al. (1984):

- 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.

Hall et al. (2007):

- Applikation von humanen hämatopoetischen Stammzellen in subletal bestrahlte Empfängermäuse vergleichend über beide Applikationswege;
- Volumina 0,030 ml;
- die Injektion in den retrobulbären Venenplexus führte gegenüber der intravenösen Injektion in die lateralen Schwanzvenen zu deutlich höheren Transplantationserfolgen, höheren transplantierten Zellzahlen und einer geringeren Streuung der Ergebnisse.

Nervi et al. (2007):

- Applikation von humanen T-Zellen in subletal bestrahlte Empfängermäuse, vergleichend über beide Applikationswege;
- Volumina 0,2 ml;
- die Schwanzvenenapplikation von 10×10^6 Zellen verursachte nur geringe und vorübergehende "Engraftments" der transplantierten humanen T-Zellen und keine letale *Graft-versus-host-disease* im Gegensatz zur retrobulbären Applikation der gleichen Zellzahl. Die Autoren führen den Unterschied darauf zurück, dass nach retrobulbärer Applikation die Zellen im retrobulbären Sinus zurückgehalten werden, sich dort vermehren und dann über die lokalen Lymphgefäße verteilen – im Gegensatz zur intravenösen Applikation, bei der die Zellen direkt zur Lunge transportiert werden.

Steel et al. (2008):

- 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 et al. (2009):

- 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 et al. (2011):

- Genaue 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 nie Veränderungen festgestellt, aber gelegentlich das Austreten von injiziertem Material ins umgebende Gewebe, weshalb von der Applikation von Tumorzellen abgeraten wird.

Schoch A. et al. (2014):

- Vergleich der Blutspiegel nach Applikation eines monoklonalen Antikörpers (Volumina zwischen 0,160 und 0,280 ml) in Narkose im Vergleich zu Applikation in die laterale Schwanzvene;
- die Messparameter der Pharmakokinetik-Studie ergab keine Unterschiede zwischen den Applikationsarten;
- es wurde keine klinische Symptomatik nach der Applikation beobachtet, die Anzahl der Fehlapplikationen nach Applikation in die Schwanzvene erforderte den Ersatz von weiteren Tieren;
- bei Einhaltung der Empfehlungen der GV-SOLAS von 2012 ist die retrobulbäre Applikation eine valide Alternative zur Schwanzvenenapplikation, obwohl die dort empfohlenen Volumina teilweise deutlich überschritten wurden.

Socher et al. (2014):

- Applikation von 0,02 ml;
- Kontrastmittel in Narkose über beide Applikationswege, nach den Messungen wurden die Tiere noch in Narkose getötet;
- die Darstellung von Herz und Lunge war nach retrobulbärer Applikation möglich, weil keine Verdünnung des Kontrastmittels durch andere Gefäße des Einstrombereichs der *V. cava caudalis* erfolgte.

Leon-Rico D. et al. (2015):

- Applikation von hämatopoetischen Stammzellen vergleichend über beide Applikationswege;
- Volumina 0,2 ml;
- die Injektion in den retrobulbären Venenplexus führte gegenüber der intravenösen Injektion in die lateralen Schwanzvenen zu vergleichbaren Transplantationserfolgen bei geringerer Streuung der Ergebnisse. Die Autoren betonen die Einfachheit und Schnelligkeit der Methode, die den Nachteil des unangenehmen Hantierens am Auge aufwäge.

Bohnert (2019):

- Applikation von Doxorubicin, einer lokal reizenden Substanz, zur Induktion eines Nephrotischen Syndroms;
- vergleichend retrobulbär und in die Schwanzvene, via Katheter 0,2 ml, in Narkose;

- zur histopathologischen Auswertung der Injektionsstelle wurden jeweils 5 Tiere 5 Tage nach retroorbitaler Injektion von Doxorubicin bzw. physiologische Kochsalzlösung und 5 Tiere 25 Tage nach Doxorubicin-Applikation getötet, sowie 10 Tage nach Schwanzveneninjektion 1 Tier, das physiologische Kochsalzlösung bekommen hatte, und 9 Tiere mit Doxorubicin;
- die histopathologischen Veränderungen nach retrobulbärer und Schwanzvenen-Applikation waren vergleichbar.

Sonstiges zur retrobulbären Applikation

Die Institutional Animal Care and Use Committees (IACUCs) einiger amerikanischen Universitäten 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 zwischen den Applikationen.

Die Applikation soll langsam und in Narkose erfolgen.

University of Arizona: <https://researchintegrity.asu.edu/sites/default/files/2018-05/SIG-Retro-Orbital-Injections-in-Mice-2-28-17.pdf>

University of California:

<https://iacuc.ucsf.edu/sites/g/files/tkssra751/f/wysiwyg/STD%20PROCEDURE%20-%20Misc%20Rodent%20Procedures%20-%20Retro%20Orbital%20Injection%20in%20Mice.pdf>

Michigan State University: <https://animalcare.msu.edu/guidelines/IG043.pdf>

Die University of Pennsylvania bietet ein Trainingsvideo dazu an:

<https://www.research.psu.edu/animalresourceprogram/training/videos/retro-orbital-injection-in-the-mouse>

Literatur

- Bohnert BN, Dörffel T, Daiminger S, Calaminus C, Aldone S, Falkenau A, Semrau A, Le MJ, Iglauer F, Artunc F. 2019. Retrobulbar sinus injection of doxorubicin is more efficient than lateral tail vein injection at inducing experimental nephrotic syndrome in mice: a pilot study. *Lab Anim* 53:564-576.
- Hall SL, Lau K-HW, Chen ST, Felt JC, Gridley DS, Yee JK, Baylink DJ. 2007. An improved mouse Sca-1+ cell-based bone marrow transplantation model for use in gene- and cell-based therapeutic studies. *Acta Haematol* 117:24-33.
- Leon-Rico D, Fernandez-Garcia M, Aldea M, Sanchez R, Sanchez R, Peces-Barba M, Martinez-Palacio J, Yanez RM, Almarza E. 2015. Comparison of haematopoietic stem cell engraftment through the retro-orbital venous sinus and the lateral vein: alternative routes for bone marrow transplantation in mice. *Lab Anim* 49:132-141.
- Nervi P, Rettig MP, Ritchey JK, Wang HL, Bauer G, Walker J, Bonyhadi ML, Bereson RJ, Prior JL, Piwnica-Worms D, Nolta JA, DiPersio JF. 2007. Factors affecting human T cell engraftment, trafficking and associated xenogeneic graft-versus-host disease in NOD/SCID beta2mnull mice. *Exp Hematol* 35:1823-1838.
- Pekow CA, Baumans V. 2003. Common nonsurgical techniques and procedures. In: Hau J, Van Hoosier GL, Hrsg. *Handbook of laboratory animal science*, Volume I, 2. Auflage, Boca Raton: CRC, 351-387.
- Pinkerton W, Webber M. 1964. A method of injecting small laboratory animals by the ophthalmic plexus route. *Proc Soc Exp Biol Med* 116:959-961.
- Price JE, Barth RF, Johnson CW, Staubus AE. 1984. Injection of cells and monoclonal antibodies into mice: comparison of tail vein and retroorbital routes. *Proc Soc Exp Biol Med* 177:347-353.
- Schoch A, Thorey IS, Engert J, Winter G, Emrich T. 2014. Comparison of the lateral tail vein and the retro-orbital venous sinus routes of antibody administration in pharmacokinetic studies. *Lab Animal (NY)* 43:95-99.
- Schoell AR, Heyde BR, Weir DE, Chiang P-C, Hu Y, Tung DK. 2009. Euthanasia method for mice in rapid time-course pulmonary pharmacokinetic studies. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 48:506-511.
- Socher M., Kuntz J., Sawall S., Bartling S., Kachelrieß M. 2014. The retrobulbar sinus is superior to the lateral tail vein for the injection of contrast media in small animal cardiac imaging. *Lab Anim* 48:105-113.
- Steel CD, Stephens AL, Hahto SM, Singletary SJ, Ciavarra RP. 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 Anim* 37:26-32.
- Tilgner S, Metzke H. 1964. Die Blutentnahme aus den Venen der Orbita. *Zeitschr Versuchstierk* 5:59-77.
- Voelcker G, Fortmeyer HP. 1979. Die intravenöse Injektion über den retrobulbären Plexus bei der Maus. *Zeitschr Versuchstierk* 21:177-181.
- Weisbrod D. 1982 Erfahrungen bei der intravenösen Substanzapplikation über den retrobulbären Plexus. *Zeitschri Versuchstierk* 24:241-243.
- Yardeni T, Eckhaus M, Morris HD, Huizing M, Hoogstraten-Miller S. 2011. Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim* 40:155-160.

Haftungsausschluss

Die Nutzung und Verwendung der Veröffentlichungen (Fachinformationen, Stellungnahmen, Hefte, Empfehlungen, u. ä.) der Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS und die Umsetzung der darin enthaltenen Informationen und Inhalte erfolgt ausdrücklich auf eigenes Risiko der jeweiligen Nutzer*innen oder Verwender*innen.

Die GV-SOLAS und auch die Autor*innen können für etwaige Unfälle und Schäden jeder Art, die sich durch die Nutzung der Veröffentlichung ergeben, keine Haftung übernehmen.

Die GV-SOLAS übernimmt keine Haftung für Schäden jeglicher Art, die durch die Nutzung der Webseite und das Herunterladen der Vorlagen entstehen. Ebenfalls haftet die GV-SOLAS nicht für unmittelbare oder mittelbare Folgeschäden, Datenverlust, entgangenen Gewinn, System- oder Produktionsausfälle.

Haftungsansprüche gegen die GV-SOLAS und die Autor*innen für Schäden materieller oder ideeller Art, die durch die Nutzung oder Nichtnutzung der Informationen bzw. durch die Nutzung fehlerhafter und/oder unvollständiger Informationen verursacht wurden, sind grundsätzlich ausgeschlossen.

Schadenersatzansprüche sind daher sowohl gegen die Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS wie auch gegen die Autor*innen ausgeschlossen.

Die Werke inklusive aller Inhalte wurden unter größter wissenschaftlicher Sorgfalt erarbeitet. Gleichwohl übernehmen die GV-SOLAS und die Autor*innen keinerlei Gewähr und keine Haftung für die Aktualität, Korrektheit, Vollständigkeit und Qualität der bereitgestellten Informationen, ebenso nicht für Druckfehler.

Es kann keine juristische Verantwortung sowie Haftung in irgendeiner Form für fehlerhafte Angaben und daraus entstandene Folgen von der GV-SOLAS und den Autor*innen übernommen werden.

Für die Inhalte von den in diesen Veröffentlichungen abgedruckten Internetseiten sind überdies ausschließlich die Betreiber der jeweiligen Internetseiten verantwortlich.

Die GV-SOLAS und die Autor*innen haben keinen Einfluss auf Gestaltung und Inhalte fremder Internetseiten und distanzieren sich daher von allen fremden Inhalten.