

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Etablierung und Validierung eines minimalinvasiven Kaninchenmodells
atherosklerotischer Erkrankungen**

von Max Lukas Anton Ebert
aus Gräfelfing

München 2025

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Tierphysiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

Angefertigt im Labor für experimentelle Radiologie der Klinik und Poliklinik für Radiologie
des LMU Klinikums im Rahmen des DFG-geförderten Projekts

Einfluss der vaskulären Permeabilität auf Atherosklerose und neointimale Formationen

Mentor: Prof. Dr. Moritz Wildgruber

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Tag der Promotion: 26.07.2025

Die vorliegende Arbeit wurde gemäß § 6 Abs. 2 der Promotionsordnung
für die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München in kumulativer Form verfasst.

Folgende wissenschaftliche Arbeit ist in dieser Dissertationsschrift
enthalten:

A Minimally Invasive Model of Atherosclerosis and Neointimal Hyperplasia for Translational Research

Max L. A. Ebert, DVM¹; Vanessa F. Schmidt, MD¹; Osman Öcal, MD^{1,2}; Anne von Thaden, DVM³; Olaf Dietrich, PhD¹; Bastian Popper, DVM⁴; Sandra Elges, MD⁵; Max Seidensticker, MD¹; Jens Ricke, MD¹; Melanie A. Kimm, PhD¹; Astrid Jeibmann, MD⁶; Moritz Wildgruber, MD, PhD¹

- 1) Department of Radiology, University Hospital, LMU Munich, Munich, Germany
- 2) Department of Diagnostic and Interventional Radiology, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany
- 3) Veterinary Practice, Hohenpeißenberg, Germany
- 4) Biomedical Center, Core Facility Animal Models, Faculty of Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Großhaderner Straße 9, 82152, Planegg-Martinsried, Germany.
- 5) Gerhard-Domagk-Institute of Pathology, Münster University Hospital, Münster, Germany
- 6) Institute of Neuropathology, University Hospital Münster, Münster, Germany

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der EU-Richtlinie 2010/63/EU und dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Das Versuchsvorhaben wurde durch die zuständige Behörde der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen ROB-55.1-2532.Vet_02-19-178 genehmigt.

Publishing Journal: European Radiology Experimental

DOI: 10.1186/s41747-025-00558-1

Received: 13.11.2024, Accepted: 20.01.2025, Published: 06.02.2025

MEINER MUTTER
&
IN ERINNERUNG AN MEINE GROSSELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	11
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	13
I. EINLEITUNG.....	15
II. ERWEITERTE LITERATURÜBERSICHT	17
1. PATHOPHYSIOLOGIE ATHEROSKLEROTISCHER ERKRANKUNGEN.....	17
1.1. De-Novo-Atherosklerose	17
1.1.1. Scherstress und endotheliale Dysfunktion	17
1.1.2. Lipidinflux und -oxidation	20
1.1.3. Leukozyten.....	20
1.1.4. VSMCs – Glatte Gefäßmuskelzellen	22
1.2. Restenose und neointimale Hyperplasie.....	22
1.2.1. Early Arterial Recoil	23
1.2.2. Negative Vascular Remodeling.....	23
1.2.3. Neointimale Hyperplasie	24
1.2.4. Neoatherosklerose	26
2. TIERMODELLE – FUNDAMENT DER TRANSLATIONALEN FORSCHUNG	28
2.1. Nagetiere.....	28
2.2. Schweine und Primaten	29
2.3. Induktion atherosklerotischer Prozesse	30
2.3.1. Atherogene Diät	30
2.3.2. Eingriffstechniken.....	30
3. KANINCHEN ALS TIERMODELL FÜR DIE ERFORSCHUNG ATHEROSKLEROTISCHER ERKRANKUNGEN.....	33
3.1. Physiologie	33
3.2. Zuchtlinien und genetische Manipulationen.....	35
3.3. Eingriffstechniken	36
III. PUBLIKATION	38
IV. DISKUSSION.....	59
V. ZUSAMMENFASSUNG	65
VI. SUMMARY	66
VII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	67
VIII. TABELLENVERZEICHNIS.....	68
IX. REFERENZEN	69
ANHANG	77
DANKSAGUNG	80

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Apo	Apolipoprotein
ATP	Adenosintriphosphat
CETP	Cholesterinestertransferprotein
CCL	CC-Chemokin Ligand
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ET	Endothelin
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF	Fibroblast Growth Factor
HDL	High Density Lipoprotein
LDL	Low Density Lipoprotein
NF- κ B	Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' Of Activated B-Cells
NO	Nitric Oxid
NZW	New Zealand White Rabbit
oxLDL	Oxidiertes LDL
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell

I. EINLEITUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen, bereits seit über 100 Jahren vor allem in westlichen Ländern auf dem Vormarsch [1], sind mit über 30 % Anteil und steigender Tendenz heute die häufigste Todesursache weltweit [2, 3]. Unter den Auslösern sticht vor allem die Atherosklerose als wichtigster Pathomechanismus hervor [4]. Hierbei handelt es sich um einen chronisch-progressiven, inflammatorischen Prozess multifaktorieller Einflüsse, welcher hauptsächlich die Koronararterien, die Carotiden und die peripheren Gefäße betrifft und im Laufe der Zeit zu deren gradueller Obstruktion führt [5, 6]. Zur Behandlung atherosklerotischer Plaques dient vor allem die Perkutane Transluminale Angioplastie, welche sich seit Jahren als internationaler Standard etabliert hat. Bei dieser Methode wird mit Hilfe eines Ballonkatheters die Engstelle in dem betroffenen Gefäß aufgedehnt und somit die Durchgängigkeit verbessert, um eine Unterbrechung des Blutflusses kurativ oder präventiv zu behandeln. Jedoch zeigt sich trotz der hohen technischen Erfolgsrate eine ebenfalls hohe Rezidivquote von bis zu 50% innerhalb der ersten 12 Monate [7-9], resultierend in Restenosierung und möglichen erneuten Komplikationen. Zwar gibt es verschiedene Therapie- und Präventionsansätze, wie zum Beispiel die Applikation antineoplastischer Wirkstoffe mittels Ballon oder Stent, um die Rezidivrate zu reduzieren, jedoch bleibt der langfristige Erfolg limitiert. Dies begründet sich vor allem in Prozessen wie neointimaler Hyperplasie, erneuter Plaquebildung und Restenose. Insofern ist die Verbesserung altbewährter sowie die Entwicklung neuer Therapien unabdingbar, um eine möglichst dauerhafte Durchlässigkeit der behandelten arteriellen Blutgefäße zu erreichen. Damit dies gelingen kann, ist ein tiefgreifendes Wissen und Verständnis um die zugrundeliegenden Pathomechanismen unerlässlich.

Zur Erforschung atherosklerotischer Erkrankungen wurden und werden verschiedene Tiermodelle, von Nagern bis hin zu Primaten, entwickelt und eingesetzt. Für die Grundlagenforschung eignen sich besonders Modelle mit Ratten und Mäusen, die einen hohen Durchsatz an Tieren erlauben, jedoch aufgrund ihrer signifikanten metabolischen Unterschiede zum Menschen sowie der geringen Körpergröße an ihre Grenzen stoßen. Besonders unzuträglich ist hierbei, dass, obwohl verschiedene Eingriffsmodelle in Kombination mit speziellen Diäten zu intensiven intravasculären Entzündungen führen können, lumeneinengende Stenosen und rupturierende Plaques nur selten oder unter Verwendung stark genmodifizierter Tiere erzeugbar sind [10]. Modelle mit Großtieren, vor allem mit Schweinen, besitzen zwar ein bedeutendes translationales Potenzial, sind jedoch technisch deutlich anspruchsvoller und kostenintensiver. Infolgedessen haben sich

Kaninchen aufgrund ihrer Größe sowie ihrer kardiovaskulären und metabolischen Ähnlichkeiten mit dem Menschen als geeignet für die Erforschung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen erwiesen [11]. Atherosklerotische Läsionen, die die Erkrankung des Menschen vergleichbar abbilden, werden typischerweise durch eine Kombination aus fettreicher Ernährung und mechanischer Verletzung des Gefäßendothels verursacht, wobei besonders die Endothel-Denudation hervorzuheben ist, ein häufiger, kaum zu vermeidender Nebeneffekt bei Angioplastien und ein wichtiger Faktor bei der Bildung von Restenosen [12, 13]. Bisher etablierte Kaninchenmodelle entwickeln zwar zuverlässig lumenverengende atherosklerotische Plaques und neointimale Hyperplasie, haben aber auch erhebliche Nachteile: Die Überdehnung der Gefäßwand durch den Einsatz zu großer Katheter und Ballons sowie die hohe Invasivität der Eingriffe sind mit Risiken wie Schlaganfällen und Wundinfektion verbunden [14]. Zudem erfordert die Komplexität dieser Eingriffe viel Übung und Erfahrung sowie spezialisiertes, veterinärmedizinisches Personal, was zu einem hohen Verbrauch an Versuchstieren führen kann.

Vor diesem Hintergrund war es Ziel dieser Studie, ein minimalinvasives Kaninchenmodell für die Atheroskleroseforschung zu entwickeln, das reproduzierbar lumeneinengende Plaques ohne eine massive Überdehnung der Gefäßwand erzeugt. Dadurch soll die Translatierbarkeit gesteigert und gleichzeitig die Durchführung vereinfacht werden, eine niedrige Morbidität und Mortalität erreicht sowie Tierschutz und Tierwohl verbessert werden.

II. ERWEITERTE LITERATURÜBERSICHT

1. Pathophysiologie atherosklerotischer Erkrankungen

1.1. De-Novo-Atherosklerose

Atherosklerose ist, nach der Definition der American Heart Association, ein langsamer, lebenslanger Prozess der Veränderung der Arterien, charakterisiert vor allem durch die Bildung lipidreicher Plaques, welche mit der Zeit zu verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen wie Schlaganfall oder Herzinfarkt führen können [15]. Wie oben bereits erwähnt hat die Bildung atherosklerotischer Läsionen viele verschiedene Ursachen, wobei der wichtigste extrinsische Einfluss alimentärer Natur („western diet“) ist und sich intrinsisch vor allem die genetische Prädisposition verantwortlich zeichnet [5]. Eine ebenso große Rolle spielen zudem verschiedene Risikofaktoren und Vorerkrankungen wie Nikotinabusus und Diabetes [16].

1.1.1. Scherstress und endotheliale Dysfunktion

Die der Atherosklerose zugrundeliegenden Mechanismen sind eine komplexe und nach wie vor nicht vollständig erforschte Interaktionskaskade biochemischer und mechanischer Faktoren, angetrieben durch die zumeist jahrelange Degeneration der endothelialen Barriere aufgrund hämodynamischer Turbulenzen und Scherströmungen, wie sie zum Beispiel an arteriellen Bifurkationen unvermeidbar auftreten. Auffällig ist dabei, dass vor allem oszillierender, schwacher Scherstress die Plaquebildung fördert, während eine höhere (physiologisch normale) Krafteinwirkung ihr sogar entgegensteht [17]. Allerdings hat sich bei bereits vorhandenen Läsionen durch neue, computergestützte Modelle gezeigt, dass sich jede Art von Scherstress nachteilhaft auf die Progression auswirkt, jedoch auf unterschiedliche Weise: Ein höherer Scherstress begünstigt nun beispielsweise die Änderung des Phänotyps nicht-obstruktiver Plaques hin zur instabilen, vulnerablen Form sowie deren Ruptur [18-22]. Daraus folgt, dass die spezifische Reaktion der Endothelzellen auf unterschiedliche Formen von Scherstress unterschiedlich ausfällt (vgl. Abb. 1). Im Allgemeinen jedoch bewirkt die Schwächung bzw. Verletzung des Endothels eine Aktivierung der Endothelzellen, welche mit Veränderungen in Morphologie, Proliferationsverhalten und Genexpression antworten und damit einen atherogenen Phänotyp ausprägen [23, 24]. Dies zeigt sich auch in jüngsten Studien, welche herausgefunden haben, dass schwacher Scherstress eine Aktivierung verschiedener embryonaler Wachstumsfaktoren und Gene, wie z. B. BMP-TGF β oder

Gene der HOX-Familie bewirkt [24].

Für das Verständnis ist es an dieser Stelle wichtig zu betonen, dass die genannten Teilaspekte der Entstehung atherosklerotischer Plaques immer noch kontrovers diskutiert werden und nur schwer in einer festen Abfolge zu determinieren sind, da sie größtenteils parallel und über sehr lange Zeiträume hinweg stattfinden und sich dabei zudem gegenseitig beeinflussen bzw. verstärken können.

Die durch Scherstress ausgelösten biochemischen Signale und Prozesse (vgl. Abb. 1) bewirken eine Erhöhung der endothelialen Permeabilität durch Kontraktion und Formveränderung der Endothelzellen sowie Schwächung ihrer interzellulären Bindungen. Dies geschieht auf zwei Arten: Direkt durch Mechanotransduktion und indirekt durch den veränderten Stofftransport im Blutfluss [25]. Die Produktion von protektivem NO, welches die Permeabilität des Endothels senkt, indem es die Ausschüttung von EDHF (Endothelium-Derived Hyperpolarization Factor) und damit eine Hemmung der Translokation von Zelladhäsionsmolekülen bewirkt, gerät durch einen unphysiologisch schwachen Scherstress, welcher die Ausschüttung von eNOS hemmt, ins Stocken [26, 27]. In Kombination mit einer verringerten ATP-Ausschüttung wird die lokale Sauerstoffaufnahme gesenkt und zudem die Abwehr gegenüber atherogenen Faktoren beeinträchtigt [25]. Die Sauerstoffversorgung des Endothels ist ein wichtiger Faktor: Kommt es durch Scherstress und veränderte Strömungen zu einer Unterversorgung mit Sauerstoff und damit zur Hypoxie der Endothelzellen, wird HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor-1 α) aktiviert, was die endotheliale Dysfunktion empfindlich verstärkt [28]. Durch die eingeschränkte Produktion und Verfügbarkeit nicht nur von NO, sondern auch von Hormonen und Faktoren wie Endothelin, Prostacyclin, Antithrombin III, oder t-PA (Tissue-Type Plasminogen Activator) verringert sich zudem nicht nur die Widerstandsfähigkeit gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies wie H₂O₂, was die Zellen weiter unter Stress setzt, sondern es kommt ebenfalls zur Gerinnungsförderung, einschließlich Leukozytenadhäsion [29, 30]. Zusammen mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B, welcher normalerweise durch NO gehemmt wird, kommt es zur Präsentation von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin, ICAM (Intercellular Adhesion Molecule), VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule) und PECAM (Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule), welche Adhäsion der Leukozyten sowie deren Transduktion durch die Endothelschicht verstärken [31]. Zusätzlich wirkt sich Scherstress auf den intrazellulären Calciumspiegel aus: Unphysiologische Krafteinwirkung und das inflammatorische Milieu sorgen für eine Erhöhung der cytosolischen Calciumionen, was wiederum im Zusammenspiel mit ATP die Mobilisierung von Calcium bewirkt [26, 32, 33]. Der erhöhte Calciumspiegel beeinflusst

die Polarisation und fördert in Kombination mit Thrombin und Inositoltriphosphat die Aktivierung des Aktin-Myosin-Motors und damit die Veränderung der Form der Endothelzellen (kubisch statt polygonal) sowie die Öffnung der Zellzwischenräume [34, 35]. Derselbe Effekt wird, vermittelt durch mechanosensitive Integrine, durch die Aktivierung von extrazellulärer Matrix und Glykokalix sowie der mit ihnen verbundenen G-Proteine (z. B. Rac, RhoA) und Aktin-Stressfasern, erzeugt [31, 36, 37]. Hinzu kommt schließlich, dass ATP ein wichtiger Einflussfaktor auf Gefäßweite und -tonus und somit ebenfalls auf das gesamte proatherosklerotische Milieu ist [38].

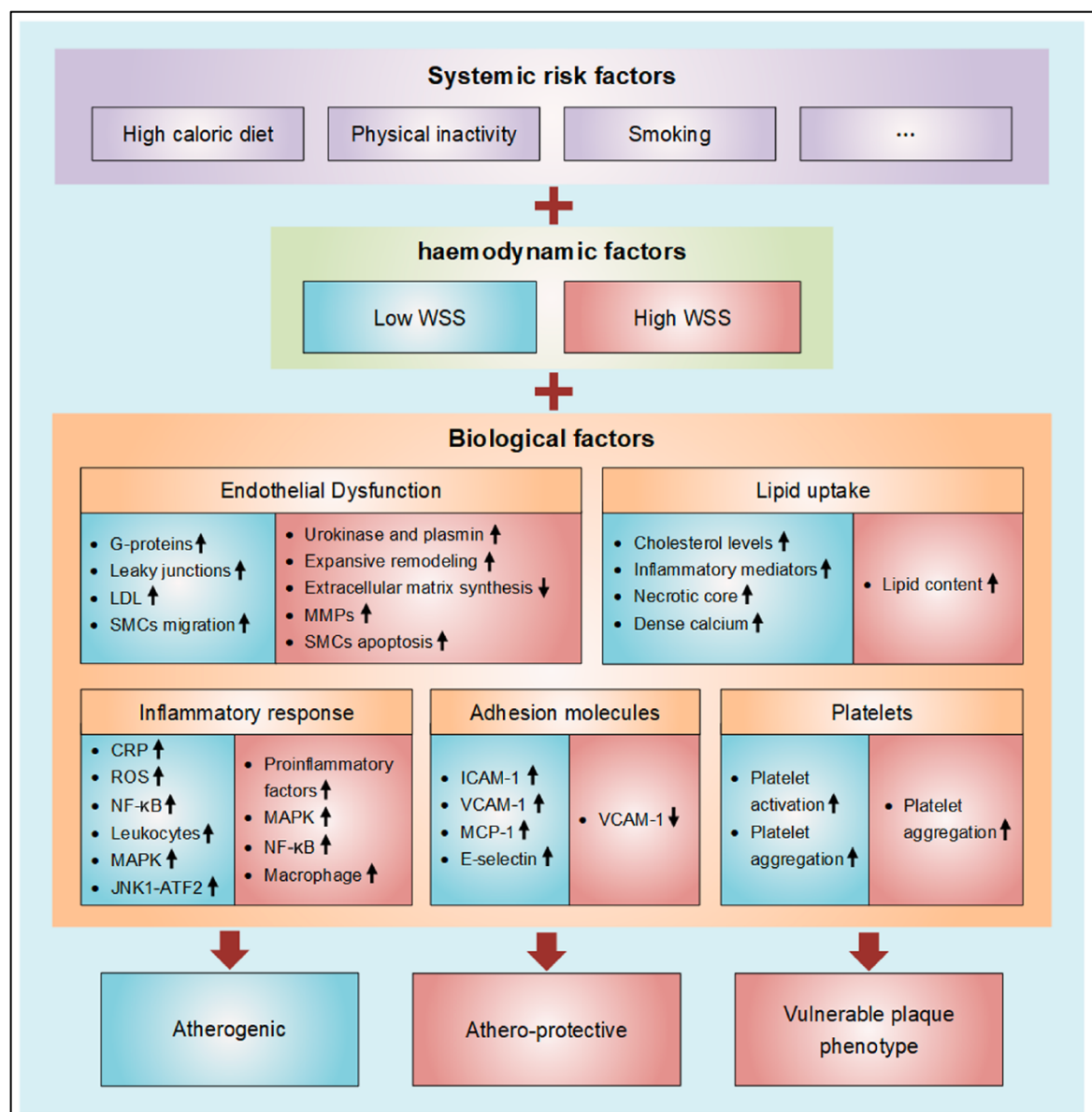


Abb. 1. Auswirkungen von Scherstress (Wall Shear Stress – WSS) auf verschiedene Einflussfaktoren von Atherosklerose. Blau: Schwacher Scherstress, Rot: Starker Scherstress. [22]. (Mit freundlicher Genehmigung des Frontiers Verlages).

1.1.2. Lipidinflux und -oxidation

Ein intaktes Endothel lässt die Transition von Lipiden bis zu einer Größe von etwa 70 nm in beide Richtungen zu. Wichtig hierfür sind Transportmediatoren wie Caveolin-1 und SR-BI (Scavenger Receptor Class B Type I) [39, 40]. Durch das vorherrschende inflammatorische Milieu sowie die endotheliale Dysfunktion und Permeabilität passieren nun jedoch auch vermehrt makromolekulare Lipide die Endothelbarriere [41, 42] (vgl. Abb. 1 & 2). Es handelt sich hierbei vor allem um ApoB-gebundene Lipoproteine verschiedener Dichte, wobei den cholesterinreichen LDL die wichtigste Rolle zukommt. Jene großen Lipoproteine gelangen in die Intima und den subendothelialen Raum, wo sie durch Proteoglykane und Enzyme wie S-SMase (Secretory Sphingomyelinase), Lipoproteinlipase und Phospholipase A2 gebunden werden, was den Efflux zurück in das Lumen verhindert [43, 44]. Ebenfalls Einfluss hierauf nimmt die verminderte Expression von eNOS und SOD (Superoxid-Dismutase), welche, wie oben bereits erwähnt, wichtige Faktoren für die endotheliale Integrität sind [43, 45].

Im Gegensatz zu den bereits erwähnten LDL und VLDL wirkt das ApoA-gebundene, dicht gepackte HDL prinzipiell anti-atherogen, da es für den Transport des Cholesterins zum Abbauort in der Leber sorgt, weshalb ein hoher HDL-Spiegel allgemein als atheroprotektiv gilt [46]. Dieser kann jedoch durch verschiedene Faktoren, wie z.B. die Ernährung, gering sein und seine schützenden Eigenschaften einbüßen.

Infolge der Retention akkumulieren die Lipide in der Gefäßwand, wo sie auf verschiedene Arten modifiziert, vor allem jedoch oxidiert werden (vgl. Abb. 2). Dies verstärkt die endotheliale Dysfunktion sowie die Expression inflammatorischer Zytokine und Chemokine [45]. Oxydierte Phospholipide lösen Entzündungen aus, da sie eine starke Bindungsaffinität zu Toll-like-Rezeptoren haben, welche wiederum NF- κ B aktivieren können. Daher ist oxLDL ein Biomarker für das Vorhandensein entzündlicher Plaques [47].

1.1.3. Leukozyten

Die durch die aktivierten Endothelzellen exprimierten Adhäsionsfaktoren wie Selektine (v.a. P- und E-Selektin) und vaskulären Zelladhäsionsmoleküle (v.a. VCAM-1, ICAM-1) induzieren das Rollen und Anhaften von Leukozyten, insbesondere Monozyten, am Endothel [48]. Die Interaktion mit verschiedenen Zytokinen wie CCL-2 und Interleukin-8 führt zur Transmigration der Monozyten in den subendothelialen Raum [48, 49]. Dort differenzieren sie sich zu Makrophagen, die eine

entzündliche Reaktion und die Freisetzung weiterer inflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ oder Interleukin- 1β initiieren. Dies verstärkt die Schwächung der endothelialen Barriere durch Chemotaxis von Lymphozyten und zusätzlichen mononukleären Phagozyten weiter [50].

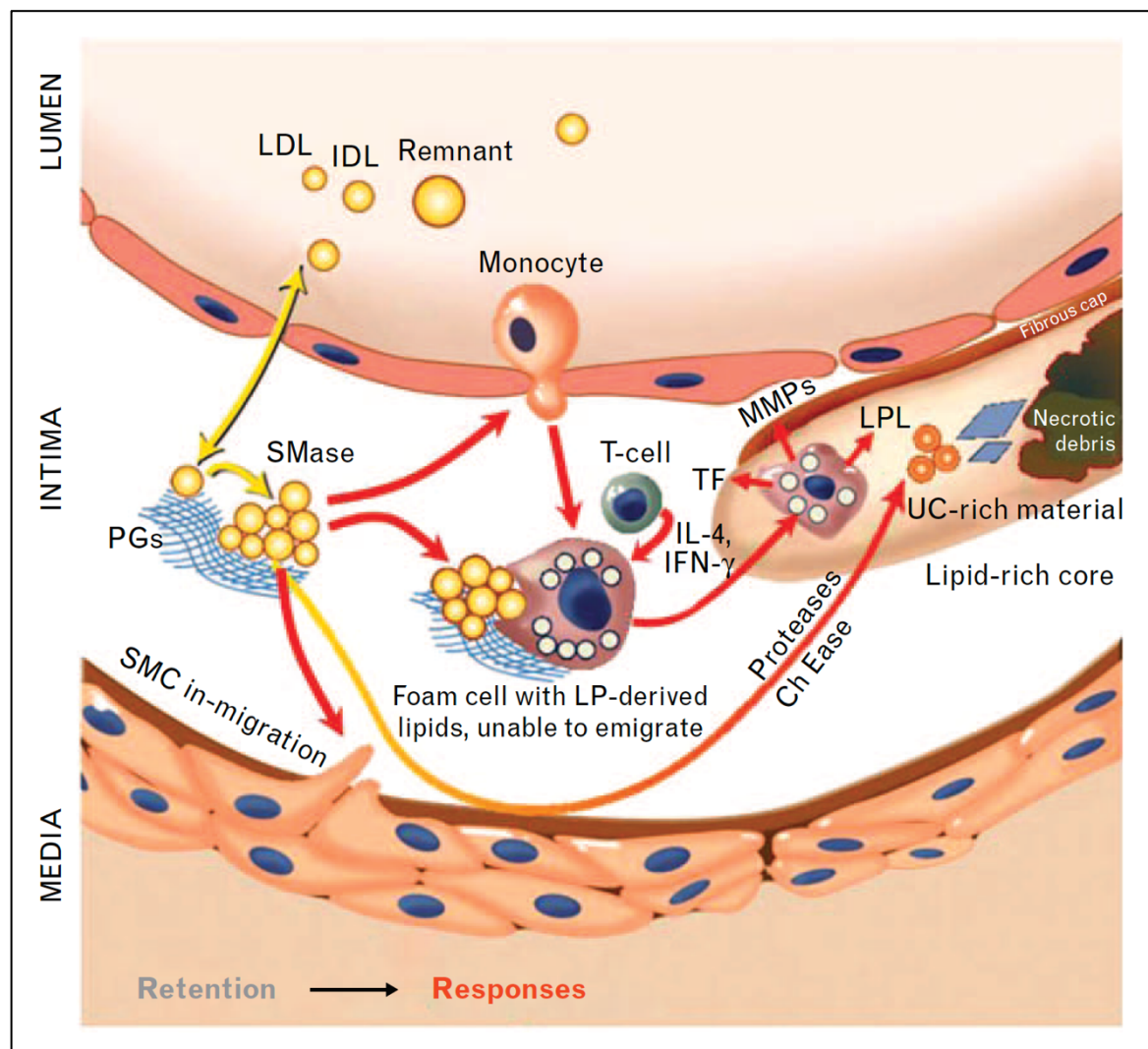


Abb. 2. Response-to-Retention-Modell der Bildung atherosklerotischer Plaques nach Williams 2005. [44]. (Mit freundlicher Genehmigung des Wolters Kluwer Verlages).

Zudem setzen Makrophagen lipoproteinmodifizierende Enzyme wie die bereits erwähnte Lipoproteinlipase sowie weitere oxidative Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS) frei [51]. Die in der Intima akkumulierten ApoB-Lipoproteine werden von den Makrophagen aufgenommen und in Lysosomen verdaut. Die chemische und enzymatische Modifikation der Lipoproteine erhöht dabei stark die Rezeptoraffinität (v.a. SR-A) und beschleunigt damit sowohl ihre Internalisierung als auch die Phagozytose [52, 53]. Bei der Zersetzung wird Cholesterin frei, welches im endoplasmatischen Retikulum mittels ACAT (Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase) verestert wird

und sich als Cholesterinester in zytoplasmatischen Lipidtröpfchen ansammelt. Durch die zunehmende Anhäufung dieser Lipidrückstände verwandeln sich die Makrophagen in Schaumzellen, welche sich in sog. fatty streaks, als gelblich-weiße Linien erkennbare atherosklerotische Frühläsionen, ablagern und damit die Basis atherosklerotischer Plaques bilden [54-56]. Durch Ausschüttung von CCL-4 bewirken die Schaumzellen eine Transition der Endothelzellen zu Mesenchymzellen, was die Dysfunktion endothelialen Barriere bedeutend verstärkt [57].

Im weiteren Verlauf unterliegen die lipidbeladenen Makrophagen einem beschleunigten Zelltod (Ferroptose, Necroptose, Pyroptose), können jedoch durch eine beeinträchtigte Efferozytose nicht richtig abgebaut werden [58, 59]. Dies führt zur sekundären Nekrose und damit zur Freisetzung intrazellulärer Bestandteile, welche das oxidative und inflammatorische Milieu weiter fördern [60]. Es kommt zur Anhäufung toter Zellen und ihrer Bestandteile sowie verschiedener Lipoproteinderivate und infolgedessen zur Ausbildung eines nekrotischen Kerns, welcher das Zentrum der Läsion bildet und als Risikofaktor für Plaqueinstabilität und -ruptur gilt (vgl. Abb. 1 & 2).

1.1.4. VSMCs – Glatte Gefäßmuskelzellen

Auch T- und B-Lymphozyten sowie eosinophile Granulozyten spielen bei der Entwicklung atherosklerotischer Plaques eine wichtige Rolle, da sie Zytokine und Immunglobuline exprimieren und damit das Entzündungsgeschehen vorantreiben [61]. Innerhalb der jungen fatty-streak-Läsionen sezernieren aktivierte T-Zellen TNF- β , Interferon- γ , fibrinogene Mediatoren sowie Wachstumsfaktoren (v.a. FGF, PDGF), welche die Migration und Proliferation von VSMCs anregen [49]. Die aktivierten VSMCs produzieren EZM-Verbindungen wie Kollagen, Proteoglykane und Elastin, welche sich auf der Plaque ablagern und die sog. fibrous cap bilden, eine fibröse Bindegewebsschicht, welche sich von der umliegenden Intima abgrenzen lässt [43, 57, 62]. In diesem Zustand sind die VSMCs zudem äußerst kurzlebig und gehen schnell in Apoptose, was wiederum den nekrotischen Kern vergrößert und ebenso zu einer vermehrten Ausschüttung von Matrix-Metalloproteinasen führt, welche die EZM-Moleküle proteolytisch aktivieren [63]. Die fibröse Hülle wird mit der Zeit durch ein konstantes Entzündungsgeschehen immer dünner, weshalb mit fortschreitender Plaquereifung die Rupturgefahr stetig steigt.

1.2. Restenose und neointimale Hyperplasie

Ein für die translationale Forschung besonders interessanter Teilaspekt atherosklerotischer Erkrankungen ist die Restenose, denn nicht selten kommt es bereits wenige Monate nach einer

endovaskulären Intervention zur Bildung neuer Plaques, welche häufig schnell wachsen und ein hohes Obstruktions- und Komplikationsrisiko darstellen. Der wichtigste Mechanismus dieser Restenosierung ist die neointimale Hyperplasie.

Ebenso wie die Pathogenese der De-Novo-Atherosklerose stellt auch die Entstehung der Restenose einen komplexen Vorgang dar, der durch eine Vielzahl mechanischer und biologischer Mechanismen angetrieben wird. Jedoch wird dieser Prozess durch Revaskularisierungseingriffe an erkrankten Gefäßen und das damit verbundene Trauma initiiert, wobei die Entwicklung von Restenosen nach Angioplastie in Abhängigkeit davon, ob ein Stent verwendet wird oder ob die Prozedur mittels Ballonangioplastie ohne Stent erfolgt, variiert. Bei der reinen Ballonangioplastie spielen die elastische Formtreue der Arterien ("early arterial recoil") und der negative Gefäßumbau ("negative vascular remodeling") eine maßgebliche Rolle [64]. Im Gegensatz dazu wird die In-Stent-Restenose überwiegend durch Neointimale Hyperplasie und Neoatherosklerose bestimmt [65, 66].

1.2.1. Early Arterial Recoil

Das sofortige Rückfedern resultiert aus der natürlichen Elastizität der Gefäßwand, welche primär durch Elastinfasern und VSMCs bedingt ist. Diese physikalische Gegebenheit bewirkt, dass das Gefäß unmittelbar nach der Entleerung des Ballons wieder kontrahiert, was zu einer signifikanten Lumenreduktion von bis zu 50% führen kann [67]. Die Stentimplantation dient unter anderem dazu, diesem Phänomen entgegenzuwirken, jedoch ist es auch so nicht immer möglich, den Druck vollständig zu kompensieren [68].

1.2.2. Negative Vascular Remodeling

Der reaktive Gefäßumbau („vascular remodeling“) stellt einen essenziellen physiologischen Prozess dar, der es den Blutgefäßen ermöglicht, sich an veränderte hämodynamische Bedingungen oder beginnende Obstruktionen anzupassen [69]. Dieser Anpassungsmechanismus kann jedoch pathologisch entarten, insbesondere wenn übermäßiges Gewebswachstum als Reaktion auf vaskuläre Traumata auftritt, weshalb man in diesem Fall von negativem vaskulärem Remodeling spricht [70]. Dieses ist definiert als ein lokal begrenztes Schrumpfen des Gefäßdurchmessers [71].

1.2.3. Neointimale Hyperplasie

Der Terminus „Neointimale Hyperplasie“ beschreibt einen pathologischen Exzess des negativen Gefäßumbaus, welcher durch ein unkontrolliertes Proliferieren von VSMCs sowie die verstärkte Synthese extrazellulärer Matrix infolge angioplastischer Interventionen charakterisiert ist [72]. Während einer Angioplastie wird das Endothel mechanischem Stress ausgesetzt, was zu einer partiellen Denudation führen kann, die sich bis in die *tunica media* erstrecken und die dort lokalisierten VSMCs schädigen kann [73]. Die Bildung der Neointima wird sowohl durch zelluläre als auch humorale Faktoren beeinflusst. Besonders hervorzuheben sind vier zelluläre Akteure und die mit ihnen verbundenen Mechanismen: die Endothelzellen der Intima, die Monozyten und/oder Makrophagen, die aus dem Blut in die Gefäßwand migrieren, die Fibroblasten der Adventitia und die glatten Muskelzellen der Media [74].

Die Schädigung der Gefäßwand induziert die physiologische Gerinnungskaskade durch die Freisetzung von Gewebefaktor, was zur Aktivierung der Thrombozyten und zur Bildung einer lokalen Thrombus-Schicht führt [75, 76]. Parallel dazu resultiert der Bruch des Endothels und des sub-endothelialen Raums in einer schweren endothelialen Dysfunktion, einschließlich erhöhter Permeabilität und Aktivierung [77]. Endothelin-1 bindet an ET_A-Rezeptoren auf den glatten Muskelzellen und induziert deren sofortige Kontraktion, während der endotheliale ET_B-Rezeptor, der normalerweise durch die Freisetzung von NO die Vasodilatation fördert, antagonisiert wird [78]. NO und Prostaglandin I₂ entfalten unter physiologischen Umständen vasodilatatorische, anti-proliferative und antiadhäsive Wirkungen auf das Endothel. Diese Funktionen sind jedoch unter pathologischen Bedingungen wie Diabetes und Hypercholesterinämie beeinträchtigt [8, 70]. Elastase, freigesetzt durch neutrophile Granulozyten, vermindert die Elastizität der Blutzellen und inaktiviert Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen, was die proteolytische Aktivierung von extrazellulären Matrixproteinen begünstigt [79, 80]. Das Glykoprotein Tenascin-C, welches der EZM entstammt, stimuliert die Proliferation glatter Muskelzellen, indem es mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen wie PDGF, FGF und Fibronectin interagiert. Zudem beeinflusst es durch jene Interaktion ebenfalls die Zelladhäsion, sowie die Ausschüttung weiterer Matrix-Metalloproteinasen [81].

Die leukozytären Vorgänge sind hier im Prinzip dieselben wie bei der De-Novo-Atherosklerose, jedoch deutlich beschleunigt durch die wesentlich akutere und tiefgreifendere Inflammation und Verletzung der Gefäßwand. Ein wesentlicher Unterschied hierbei ist die Transmigration der Mo-

nozyten bis in den subintimalen Raum, vermittelt durch ein komplexes System aus Integrinen und Cadherinen [82] (vgl. Abb. 3). Dies verstärkt die endotheliale Permeabilität und begünstigt einen vermehrten Influx von Lipoproteinen (v.a. LDL und VLDL), ähnlich der De-Novo-Atherosklerose.

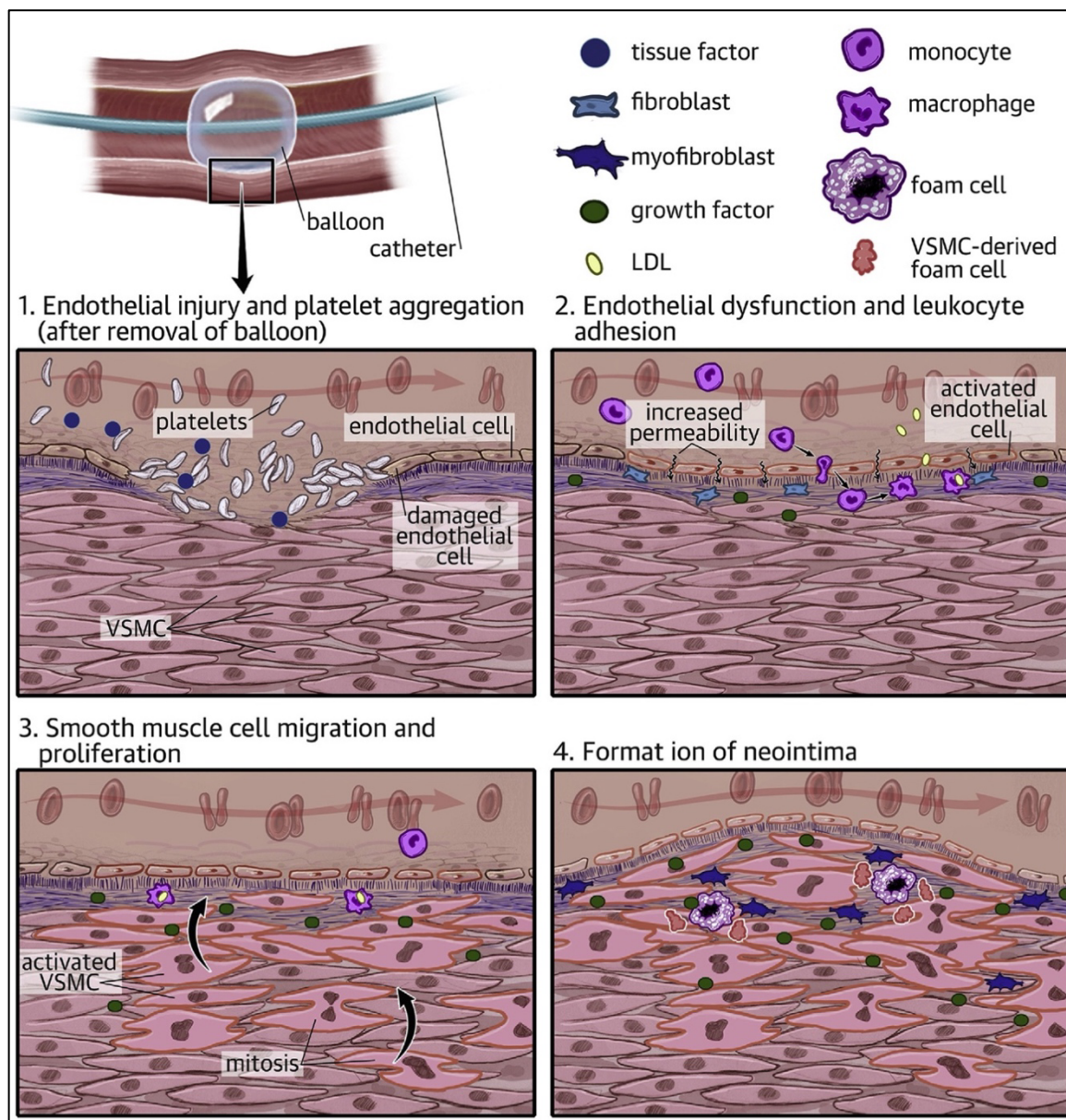


Abb. 3. Neointimale Hyperplasie nach Gefäßtrauma. 1. Endothelverletzung und Plättchenaggregation. 2. Endotheldysfunktion und Leukozytenadhäsion. 3. VSMC-Proliferation. 4. Bildung der Neointima. [86]. (Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlages).

Ebenso entwickeln sich die Makrophagen auch hier durch die Aufnahme ebenjener Lipoproteine zu Schaumzellen, welche akkumulieren, absterben und den nekrotischen Kern einer Plaque bilden, die von einer VSMC-gemachten, fibrösen Hülle umgeben wird.

Die Stimulation der Fibroblastenproliferation erfolgt hauptsächlich durch FGF und Fibronectin.

Durch die Gegenwart von TGF differenzieren sich Fibroblasten zu Myofibroblasten, die in die Media wandern, was zu einem Volumenzuwachs führt und die Ablagerung extrazellulärer Matrixproteine fördert [83]. Aktivierte Fibroblasten steigern zusätzlich die Sekretion diverser Wachstumsfaktoren, darunter PDGF und FGF [84]. Die Fibroblastenwachstumsfaktoren bilden eine Familie von aktuell 22 Proteinen, die über ihre Bindung an vier verschiedene Zellmembranrezeptor-Tyrosinkinasen (FGFR1-FGFR4) ihre biologische Aktivität entfalten. Diese Interaktion initiiert die Bildung eines ternären Adapterprotein-Komplexes (FRS2/Grb2/Sos) und aktiviert die Ras/MAPK-Signaltransduktionskaskade [85]. Die darauf folgende Migration und Proliferation der Fibroblasten, begleitet von Wachstums- und Redoxfaktoren, löst zusätzlich eine ähnlich geartete Reaktion der VSMCs aus [84].

Die Wanderung der glatten Muskelzellen von der Media in die Intima wird maßgeblich durch PDGF-BB und das Matrixglykoprotein Osteopontin gesteuert. Infolge dieser Migration vollziehen die VSMCs einen Wechsel ihres Phänotyps vom vorwiegend kontraktile zu einem abnormen, proliferativen Typ [87-89] (vgl. Abb. 3). Die TGF-Familie, insbesondere TGF- β 1, spielt hierbei eine bedeutende Rolle, indem sie über den PI3K/AKT/ID2/mTOR-Signalweg die Transformation der VSMCs stimuliert [90]. Die wesentlichen Veränderungen in diesem Prozess betreffen morphologische Transformationen der Zellen, die sich von spindelartig elongierten zu hypertrophen Formen entwickeln und dabei sog. "Berg-und-Tal-Wachstum" zeigen [87].

Zusätzlich sind Änderungen in den Niveaus der entsprechenden Protein- und mRNA-Marker zu beobachten. Dies schließt eine Zunahme der Expression von Osteopontin sowie eine Abnahme der Expression kontraktile Markerproteine wie α -Smooth-Muscle-Actin und SM22a (smooth-muscle-22a) ein [90]. Des Weiteren zeigen die veränderten VSMCs gesteigerte Proliferations- und Wanderungsraten. Folglich verhalten sie sich unter pathologischen Bedingungen anders als gewöhnlich, indem sie verstärkt extrazelluläre Matrix synthetisieren und absondern sowie sich zu schaumzellähnlichen Zellen („foam-cell-like-cells“) umwandeln können [83, 87, 91].

1.2.4. Neoatherosklerose

Die Entwicklung von (In-Stent-)Neoatherosklerose basiert vor allem auf postinterventioneller endothelialer Dysfunktion [92]. Aufgrund unzureichender endothelialer Regeneration akkumulieren zirkulierende Lipide zunehmend im subintimalen Raum, was die Bildung neuer atherosklerotischer Plaques innerhalb der sich entwickelnden Neointima beschleunigt. Ablagerungen von Schaumzellen und nekrotischem Gewebe sowie die Bildung dünnkappiger Fibroatherome („thin-

capped fibroatheroma“) begleiten diesen Prozess [93].

Aktuelle Studien haben gezeigt, dass auch das Mikrobiom einen relevanten Einfluss auf die Pathogenese von Atherosklerose und Restenose ausüben könnte. Experimente an keimfrei und konventionell aufgezogenen Mäusen zeigten eine fortgeschrittenere Neointimabildung bei Letzteren, was vermutlich mit Veränderungen in der Kinetik der akuten Entzündung und der Wundheilung korreliert [94]. Zudem scheint eine intestinale Dysbiose durch modulierte Produktion mikrobieller Metaboliten ebenso entzündliche Ereignisse zu fördern und somit zur Atherosklerose beizutragen [95, 96].

Es bleibt umstritten, inwieweit Restenose und auch De-Novo-Atherosklerose beim Menschen mit jenen, welche sich experimentell beobachtet werden lassen, vergleichbar sind. Diverse Zelltypen besitzen beispielsweise das Potenzial zur Differenzierung in einen VSMC-Phänotyp und in einigen Tiermodellen kann jeder Zelltyp zumindest teilweise zur Neointimabildung beitragen. Die neointimale Hyperplasie ist somit ein heterogener Prozess, der je nach Tiermodell variiert, da die verschiedenen Spezies unterschiedliche Biomechanismen aufweisen [97]. Diese Komplexität führt zu divergierenden Ergebnissen in den verschiedenen Tiermodellen und verhindert, dass ein einzelnes Modell die Pathogenese der neointimalen Formation vollständig aufklären kann. Wie gleichfalls bei der De-Novo-Atherosklerose muss auch in Zukunft noch viel Forschungsarbeit geleistet werden, um die detaillierte Abfolge und das Zusammenspiel von veränderter endothelialer Permeabilität, Monozyteninfiltration, VSMC-Proliferation und -Migration sowie die gesteigerte Synthese der extrazellulären Matrix vollständig zu verstehen.

2. Tiermodelle – Fundament der translationalen Forschung

Zur effizienten Beantwortung medizinischer Fragestellungen stehen der Wissenschaft verschiedenste Möglichkeiten zur Verfügung. Die translationale Forschung dient dabei der Überführung von biomedizinischen Erkenntnissen aus dem Labor in die klinische Anwendung sowie der Maximierung der Sicherheit dieses Wissens für den Menschen. Da es oft nicht ausreicht oder schlichtweg noch nicht möglich ist, neue Hypothesen mittels in-vitro-Versuchen zu überprüfen, müssen regelmäßig Tiere als Modelle herangezogen werden, um diese Fragestellungen am lebenden Organismus zu studieren. Dabei bietet jedes Tiermodell unterschiedliche Vor- und Nachteile, die bei der Versuchsplanung bedacht werden müssen.

2.1. Nagetiere

Die Maus ist aufgrund ihrer hohen Reproduktionsrate, leichten Handhabung und genetischen Manipulierbarkeit der bevorzugte Modellorganismus in der Forschung. Ihr Immunsystem ähnelt dem des Menschen, besonders in Bezug auf die inflammatorische Reaktion bei vaskulären Erkrankungen. Jedoch entwickeln Mausmodelle im Gegensatz zum Menschen keine lumenverengenden Stenosen und rupturierenden Plaques, da sie essentielle strukturelle Unterschiede im kardiovaskulären System aufweisen, wie z. B. das Fehlen der *vasa vasorum* [98]. Diese Divergenzen beeinträchtigen die Atheroskleroseforschung, weshalb häufig genetisch modifizierte Tiere oder spezielle Zuchtlinien verwendet werden müssen. Mäuse unterscheiden sich auch durch ihren Lipidmetabolismus, da sie beispielsweise Cholesterin vorwiegend nicht in LDL, sondern in HDL, transportieren und zudem kein CETP besitzen. Zudem verhindert unter anderem eine hohe hepatische LDL-Rezeptor-Aktivität zusätzlich eine diätinduzierte Atherosklerose, wodurch die Notwendigkeit genetischer Modifikationen unterstrichen wird [99] (vgl. Tab. 2).

Die ersten unbeabsichtigten, für die Forschung nutzbaren Inzuchtlinien der Ratte stammen aus dem 19. Jahrhundert. Ihr vollständig entschlüsselt Genom ermöglicht zwar vielerlei genetische Manipulation, jedoch nicht auf dem Niveau von Mäusen. Ratten bieten weitestgehend dieselben Vor- und Nachteile wie Mäuse. Ihr Stoffwechsel ist sehr ähnlich, sie sind jedoch aufgrund Ihrer Größe auch für Eingriffsmodelle geeignet, die bei Mäusen nicht oder nur sehr schwer durchführbar sind [100] (vgl. Tab. 1).

Auch Hamster und Meerschweinchen werden immer wieder als Tiermodelle für die Atheroskleroseforschung hinzugezogen. Ein wesentlicher Vorteil hier ist der Fettstoffwechsel, welcher dem

des Menschen bedeutend ähnlicher ist als bei Ratten und Mäusen [101].

Tab. 1. Eigenschaften, Vor- und Nachteile verschiedener für die Forschung verwendeter Tierarten. [86]. (Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags).

TABLE 1 Overview of Most Common Species Used for Animal Models of Restenosis						
	 Mouse (<i>Mus musculus</i> dom.)	 Rat (<i>Rattus norvegicus</i> dom.)	 Rabbit (<i>Oryctolagus cuniculus</i> dom.)	 Pig (<i>Sus scrofa</i> dom.)	 Dog (<i>Canis lupus familiaris</i>)	 Non-human Primates
Estimated median time since last common ancestor with human (million years)	~89	~89	~89	~94	~94	~30 (Macaque) ~6 (Chimpanzee)
Knockout/-in availability	+++	++	+	± (minipig)	–	± (Cynomolgus, Rhesus)
Target vessels and average diameter in adult animal (mm)	Carotid artery: 0.6 Aorta: 0.8 Iliac artery: 0.3 Femoral artery: 0.2	Carotid artery: 1.0 Aorta: 2.0 Iliac artery: 1.0 Femoral artery: 0.5	Carotid artery: 2.0 Aorta: 2.8 Iliac artery: 2.2 Femoral artery: 1.3	Carotid artery: 5.5 Aorta: 16.5 Iliac artery: 6.0 Femoral artery: 4.0 (minipig)	Carotid artery: 5.0 Aorta: 8.0 Iliac artery: 4.0 Femoral artery: 2.0 (mid-sized race/mongrel)	Carotid artery: 4.5 Aorta: 6.6 Iliac artery: 4.5 Femoral artery: 1.5 (Cynomolgus)
Advantages	Uncomplicated Husbandry; High-throughput possible; High genetic manipulability; Many different strains available; Immuno-inflammatory system similar to humans; Pathologic preconditions available	Uncomplicated Husbandry; High-throughput possible; Large enough for stent and balloon interventions; Pathologic preconditions available	Lipid metabolism similar to human; Plaque formation with luminal stenosis similar to human; Large enough for human instruments and similar types of intervention	Large enough for human instruments and interventions; Metabolism similar to human immunoinflammatory and cardiovascular system similar to human Lesion morphology and distribution similar to humans; Pathologic preconditions available	Large enough for human instruments and interventions; Easy handling	Relationship to human metabolism similar to human Immunoinflammatory and cardiovascular system close to humans; Large enough for human instruments and interventions
Disadvantages	Different lipid metabolism to human; Lumen-narrowing stenoses or high-risk plaques hardly possible to develop; Too small for human-like interventions	Different lipid metabolism to human; Different plaque formation compared to humans	Elevated demands on space and care; Only moderate throughput possible; Lesions primarily consist of foam cells	High demands on space and care; Only low-throughput possible; Atherosclerosis usually stops in stage of foam cell agglomeration	High demands on space and care; Only low-throughput possible; Different metabolism and different immunoinflammatory response compared to humans; No lumen-narrowing plaques	Very high demands on husbandry; Only very low throughput possible; High ethical hurdles

2.2. Schweine und Primaten

Auch Modelle mit größeren Tieren sind aufgrund ihrer leichteren technischen Umsetzbarkeit und klinischen Übertragbarkeit in der Forschung etabliert (vgl. Tab. 1).

Schweine sind in der präklinischen Forschung äußerst effektiv, da sie eine vergleichbare Körpergröße sowie ein ähnliches Lipidprofil wie Menschen besitzen und ihr kardiovaskuläres System große anatomische und physiologische Ähnlichkeiten aufweist. Wichtige Unterschiede sind das Fehlen von Lipoprotein (a) und die variable CETP-Aktivität, was hohe Cholesterinwerte und die Zugabe von Gallensäure zur Ernährung erfordert, um Atherosklerose zu induzieren [102, 103]. Züchtungen wie das Rapacz-Schwein (IHLC-Schwein, inherited hyperlow-density-lipoprotein and hypercholesterolemia), das auf hohe LDL-Werte selektiert wurde, ermöglichen Langzeit-Modelle menschenähnlicher atherosklerotischer Erkrankungen [104]. Minischweine bieten zudem die

wachsende Möglichkeit zur genetischen Manipulation, wenngleich diese zum aktuellen Zeitpunkt noch deutlich limitiert ist.

Affen, als engste Verwandte des Menschen, bieten ein hohes translationales Potenzial, jedoch sind ethische und finanzielle Hürden erheblich. Insbesondere Rhesus- und Javaneraffen werden als Modelltiere genutzt und bieten verschiedene Vorteile und Möglichkeiten für die Forschung (vgl. Tab. 1).

2.3. Induktion atherosklerotischer Prozesse

Damit Atherosklerose am Tiermodell erforscht werden kann, ist ein gewisses Maß an Manipulation unabdingbar, denn was sich beim Menschen über Jahrzehnte entwickelt, muss im Labor zumeist auf einen Zeitraum von wenigen Wochen bis Monaten beschleunigt werden. Wie beim Menschen ist der primäre Treiber auch im Tierversuch die Distribution einer atherogenen Diät. Je nach Bedarf wird diese in den meisten Fällen mit der Durchführung einer Intervention zur Endothelverletzung kombiniert.

2.3.1. Atherogene Diät

Die sog. western diet, welche sich durch eine besonders hohe Energiedichte bei geringem Nährwert auszeichnet, ist der Hauptfaktor bei der Entwicklung atherosklerotischer Erkrankungen beim Menschen [105]. Sie beinhaltet im Schnitt 0,1% Cholesterin sowie hohe Mengen an Fett und Methionin [106]. Dieser unphysiologisch hohe Anteil an atherogenen Substanzen muss im Tiermodell ebenfalls erzeugt werden, um die Plaquebildung zu provozieren. Bewirkt wird dies in der Regel durch die Zugabe von Reinsubstanzen sowie pflanzlichem Fett, zumeist Erdnussöl, zur normalen Diät. Die atherogene Ernährung führt zu erhöhtem LDL-Cholesterin, Blutdruck und Entzündungsmediatoren, fördert Insulin-Resistenz und senkt protektives HDL-Cholesterin.

Abhängig von Tierart, Rasse/Stamm und genetischer Manipulation ist es so möglich auch ohne weitere Manipulation die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen auszulösen. Dies ist vor allem für genmodifizierte Mausmodelle, wie z. B. LDLr^{-/-}-Mäuse, und Langzeitversuche, z. B. bei Schweinen, interessant [107, 108].

2.3.2. Eingriffstechniken

Zur Beschleunigung der Atherosklerosebildung wird, wie bereits erwähnt, in vielen Fällen zusätzlich zur Diät eine induzierende Intervention durchgeführt. Dabei wird auf verschiedene Arten das

Gefäßendothel, zumeist mechanisch, verletzt, um die endotheliale Barriere zu desintegrieren und ein inflammatorisches Milieu zu erzeugen. Je nach Schwere kann die Verletzung hierbei bis in die *tunica media* reichen, was eine rasche Aktivierung der dortigen VSMCs bewirkt [109]. Der verursachte Influx von Leukozyten und Lipoproteinen bewirkt die Entstehung atherosklerotischer Plaques innerhalb weniger Wochen, wobei die ersten Anzeichen je nach Tierart bereits innerhalb von Stunden bis Tagen nachweisbar sind. Die Auswirkungen können je nach verwendeter Eingriffstechnik in Intensität und beteiligten Zellen variieren [66, 86].

Carotid Artery Ligation Model. Durch die Ligatur der *A. carotis communis* nahe der distalen Bifurkation wird der Blutfluss gestoppt, was zu einer VSMC-reichen Neointimabildung und starkem reaktiven Gefäßumbau führt [110]. Die kontralaterale Arterie dient dabei als Kontrolle und zeigt häufig eine kompensatorische Erweiterung. Alternative Ansätze mit unvollständiger Ligatur verhindern Thrombusbildung und Endotheldenudation. Dieses Modell begrenzt mechanisches Trauma und entzündliche Reaktionen [111].

Cuff Injury Model. Eine Polyethylenmanschette simuliert eine mildere mechanische Gefäßverletzung, die eine VSMC-reiche Neointima bewirkt, ohne das Endothel vollständig zu denudieren. Die Methode verursacht geringere Blutungs- und Thromboseraten, wobei das Endothel weitgehend intakt bleibt [112].

Wire Injury Model. Dieses Modell, das ursprünglich an der *A. carotis* durchgeführt wurde, wird heute hauptsächlich an Femoral- und Beckenarterien eingesetzt. Das verursachte Gefäßtrauma ist dem von Stent- oder Ballonangioplastien ähnlich und ermöglicht die Untersuchung der VSMC-Reaktion unter Aufrechterhaltung eines konstanten Blutflusses [113].

Vein Graft Model. Zur Untersuchung von neointimaler Hyperplasie und Restenose in Bypass-Transplantaten wird eine Spendervene in eine Empfängerarterie transplantiert, was Gefäßumbau und Neointimabildung beobachten lässt. Fragen der Genetik können durch die Verwendung von syngeneten Transplantaten und modifizierten Grafts adressiert werden, wenngleich die Übertragbarkeit auf den Menschen begrenzt ist [114].

Balloon Injury Model und In-Stent-Restenosis Model. Diese Methoden ermöglichen die Simulation der Restenose nach Ballon- oder Stentangioplastie. Hierbei wird ebenfalls häufig die Halsschlagader als Zugang zum Gefäßsystem genutzt. Ein Ballon, analog zu humanen Gefäßinterventionen, wird an der ausgewählten Stelle aufgeblasen, um die Gefäßwand zu denudieren. Alternativ wird ein Stent platziert. In der Regel kann bereits nach wenigen Tagen die Ausformung einer VSMC-reichen Neointima beobachtet werden [115].

Andere Modelle. Weitere Modelle umfassen unter anderem photochemische oder elektrische Verletzung und arteriovenöse Fisteln. Diese Modelle variieren in ihrer klinischen Relevanz und Anwendung, bieten jedoch wertvolle Einblicke in spezifische genetische und molekulare Mechanismen der Gefäßneubildung und -remodellierung [86].

Des Weiteren stehen der Wissenschaft verschiedene sog. humanisierte Modelle zur Verfügung, welche entweder genetische Manipulation oder die Verwendung menschlicher Xenografts als Grundlage haben. Zu beachten ist zudem der Einfluss des Geschlechts, sowie spezies-spezifische anatomische und physiologische Eigenheiten [86].

3. Kaninchen als Tiermodell für die Erforschung atherosklerotischer Erkrankungen

Trotz der signifikanten genetischen Ähnlichkeiten zwischen Menschen und Altweltmäusen, weisen deren Stoffwechsel, wie bereits erwähnt, deutliche Unterschiede auf, was das Potenzial für die Erforschung atherosklerotischer Erkrankungen maßgeblich beeinträchtigt. Zudem ist die geringe Körpergröße für die wichtigsten Interventionsmodelle eher ungeeignet, was nicht selten die Verwendung größerer Tiere notwendig macht. Der Einsatz letzterer ist jedoch mit erheblichem Mehraufwand verbunden.

Aus diesem Grund greift man in vielen Fällen auf das Kaninchen als Modelltier zurück, da es wichtige metabolische Übereinstimmungen mit dem Menschen besitzt und zudem durch seine Körpergröße alle Arten von Eingriffen ermöglicht. Es stellt eine wichtige Verbindung zwischen der Grundlagenforschung an kleinen Tiermodellen und der eher Langzeit- und Anwendungsorientierten Forschung in größeren Modellen her.

Laborkaninchen sind im Allgemeinen deutlich größer als ihre wilden Verwandten und benötigen bedeutend mehr Platz als Mäuse oder Ratten. Dies führt zu einer Steigerung von Aufwand und Kosten, während die Durchführung von Hochdurchsatzstudien im Vergleich zu Nagetieren limitiert bleibt. Zudem sind Kaninchen ausgesprochen soziale Wesen, die auf eine gewisse Interaktion mit ihren Artgenossen angewiesen sind und hohe Ansprüche an Haltung und Umweltgestaltung stellen.

3.1. Physiologie

Kaninchen wurden bereits vor über einem Jahrhundert als erstes Modelltier für die kardiovaskuläre Forschung verwendet, denn sie bieten einen entscheidenden Vorteil: Die Ähnlichkeit ihres Lipidstoffwechsels mit dem menschlichen. Im Gegensatz zu Mäuseartigen zeigen Kaninchen, analog zu Menschen, eine erhöhte CETP-Aktivität, wodurch der überwiegende Teil des Cholesterins über Lipoproteine wie LDL und VLDL transportiert wird [116]. Zudem weist das ApoB der Kaninchen eine bemerkenswerte Übereinstimmung mit seiner menschlichen Isoform auf und die Disposition von ApoB-48 und ApoB-100 ist nahezu identisch [117]. Gleiches gilt für die LDL-Rezeptoren in der Leber sowie die VLDL-Rezeptoren an der Oberfläche der Makrophagen, welche eine wichtige Rolle bei der Schaumzelltransformation spielen [118]. Im Vergleich zu Ratten und Mäusen ist die Ausscheidung von Gallensäuren, die aus Cholesterin synthetisiert werden, bei Kanin-

chen und Menschen signifikant reduziert [119] (vgl. Tab. 2).

Diese Ähnlichkeiten machen selbst Wildtyp-Kaninchen anfällig für diätetisch induzierte Hypercholesterinämie. Bereits eine Erhöhung des Cholesteringehalts in der Nahrung um lediglich 2 % kann zu einer signifikanten Steigerung der Plasmacholesterinwerte führen und innerhalb weniger Wochen bis Monate zur Ausbildung atherosklerotischer Läsionen beitragen. Angesichts des extremen Cholesterinspiegels von 1500 - 3000 mg/dl und der damit einhergehenden Bildung von schaumzellenreichen atherosklerotischen Plaques sowie möglicher hypercholesterinämischer Folgeerkrankungen (v.a. Fettleber) wird jedoch empfohlen, die Cholesterinzufuhr auf 0,3 - 0,5 % zu beschränken, um die Entwicklung jener Läsionen zu bewirken, die denen des Menschen ähneln [11, 120, 121].

Tab. 2. Vergleich der wichtigsten lipid-metabolischen Details von Mensch, Kaninchen und Maus. [117]. (Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlanges).

Comparison of lipid and lipoprotein metabolism features			
	Human	Rabbit	Mouse
Major plasma lipoproteins	LDL	LDL	HDL
CETP	Abundant	Abundant	None
Hepatic apoB mRNA editing	No	No	Yes
apoB-48	Chylomicrons	Chylomicrons	VLDLs/LDLs and Chylomicrons
apoB-100	Can be bound to apo(a)	Can be bound to apo(a)	Cannot be bound to apo(a)
HDL	Heterogeneous	Heterogeneous	Homogeneous
apoAII	Dimer	Absent	Monomer
Hepatic LDL receptor activity	Down-regulated	Down-regulated	Usually high
VLDL receptor in macrophages	Yes	Yes	No
Hepatic lipase	High, liver-bound	Low, liver-bound	High, 70% in circulation
Cholesterol pool	Mainly from hepatic synthesis	Mainly from hepatic synthesis	Mainly from dietary origin
Excretion of bile acid	Low	Low	High
Response to a cholesterol diet	Sensitive	Sensitive	Resistant

Zusätzlich ist zu beachten, dass ein Mangel an anderen Lipiden in einer cholesterinreichen Diät die Schwere der atherosklerotischen Läsionen verstärken kann. Dies geschieht durch die Mobilisierung gespeicherter Fette, die eine höhere Sättigung aufweisen als die in der Nahrung enthaltenen Lipide, was Atherosklerose fördert und die Studienergebnisse verzerren kann [122].

Wesentliche Unterschiede zum menschlichen Lipidstoffwechsel bestehen in der äußerst geringen Aktivität der hepatischen Lipase sowie im Fehlen von ApoA-II bei Kaninchen [123, 124]. Des

Weiteren zeichnen sich atherosklerotische Plaques beim Kaninchen, wie oben bereits angedeutet, durch eine hohe Dichte an Schaumzellen aus [125].

Abgesehen vom Lipidstoffwechsel besitzen Kaninchen weitere physiologische Ähnlichkeiten, und Unterschiede, zum Menschen. Wichtig ist hier vor allem der Blutdruck, welcher im Schnitt nur geringfügig niedriger ist als beim Menschen. Auch sind sich die VSMCs beider Spezies in Migrations- und Proliferationsverhalten sehr ähnlich [126]. Zu beachtende Unterschiede zeigen sich vor allem im mikroanatomischen Aufbau der Blutgefäße, da beispielsweise die Coronararterien des Menschen eine nur schwach ausgeprägte und stark fenestrierte *lamina elastica interna* besitzen, welche beim Kaninchen bedeutend stärker ausgebildet und nicht fenestriert ist [127].

Für eine optimale Reproduzierbarkeit der Studienergebnisse verwendet man in der Regel nur männliche Kaninchen ähnlichen Alters, da weibliche Tiere in der Regel einen wesentlich weniger stabilen Cholesterinspiegel aufweisen, was die Dynamik und Zusammensetzung der Plaques signifikant beeinflussen kann.

3.2. Zuchtlinien und genetische Manipulationen

Im Laufe der Zeit haben sich im Bereich der kardiovaskulären Forschung im Wesentlichen drei bedeutende Zuchtlinien etabliert: Das New Zealand White Kaninchen (NZW), das Japanese White (JW) sowie das Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen (WHHL). Während NZW und JW eine cholesterinreiche Diät benötigen, um atherosklerotische Erkrankungen zu entwickeln, zeigen WHHL-Kaninchen auch bei normaler Ernährung eine Prädisposition zur Atherosklerose, was auf einen erblichen Defekt des LDL-Rezeptors zurückzuführen ist. Dies ähnelt der familiären Hypercholesterinämie des Menschen [117]. Ein zentrales Manko bei Kaninchen ist, dass es sich bei den üblichen Rassen nicht um Inzuchtstämme handelt, was zu einer erheblichen interindividuellen Variabilität führt. Obwohl ingezüchtete Stämme existieren, sind diese aufgrund ihrer spezifischen Einschränkungen (Inzuchtdepression, genetischer Flaschenhals, etc.) in der Anwendung problematisch und finden nur begrenzte Verwendung. Zudem ist der Einsatz transgener Kaninchen zwar etabliert, jedoch aufgrund der signifikant höheren Kosten und der Herausforderungen bei der genetischen Manipulation im Vergleich zu Nagetieren weiterhin eher selten. Ein Beispiel hierfür sind ApoE-defiziente Kaninchen, die eine erhöhte Anfälligkeit für Hyperlipidämie aufweisen [128]. Jedoch sind diese Tiere nicht überall gleichermaßen verfügbar. Fehlende Züchter und strenge Regularien bis hin zu Importverboten limitieren die Möglichkeiten in diesem Bereich teilweise stark.

3.3. Eingriffstechniken

Obwohl Kaninchen mit Hilfe einer fett- und cholesterinreichen Diät im Laufe der Zeit auch spontan Atherosklerose entwickeln, wird zumeist eine induktive Intervention durchgeführt, um die Plaquebildung zu beschleunigen. Die chirurgische Ausführung der Gefäßverletzung unterscheidet sich kaum von der bei Ratten und Mäusen angewandten Technik, doch das Hauptaugenmerk liegt auf Angioplastiemethoden, die den beim Menschen durchgeführten Verfahren ähneln. Dies macht die Ballon- und Stent-Modelle bei Kaninchen besonders interessant, da der Fokus auf Translatierbarkeit und damit auf der Simulation realistischer klinischer Szenarien zur Erprobung neuer therapeutischer und diagnostischer Ansätze liegt.

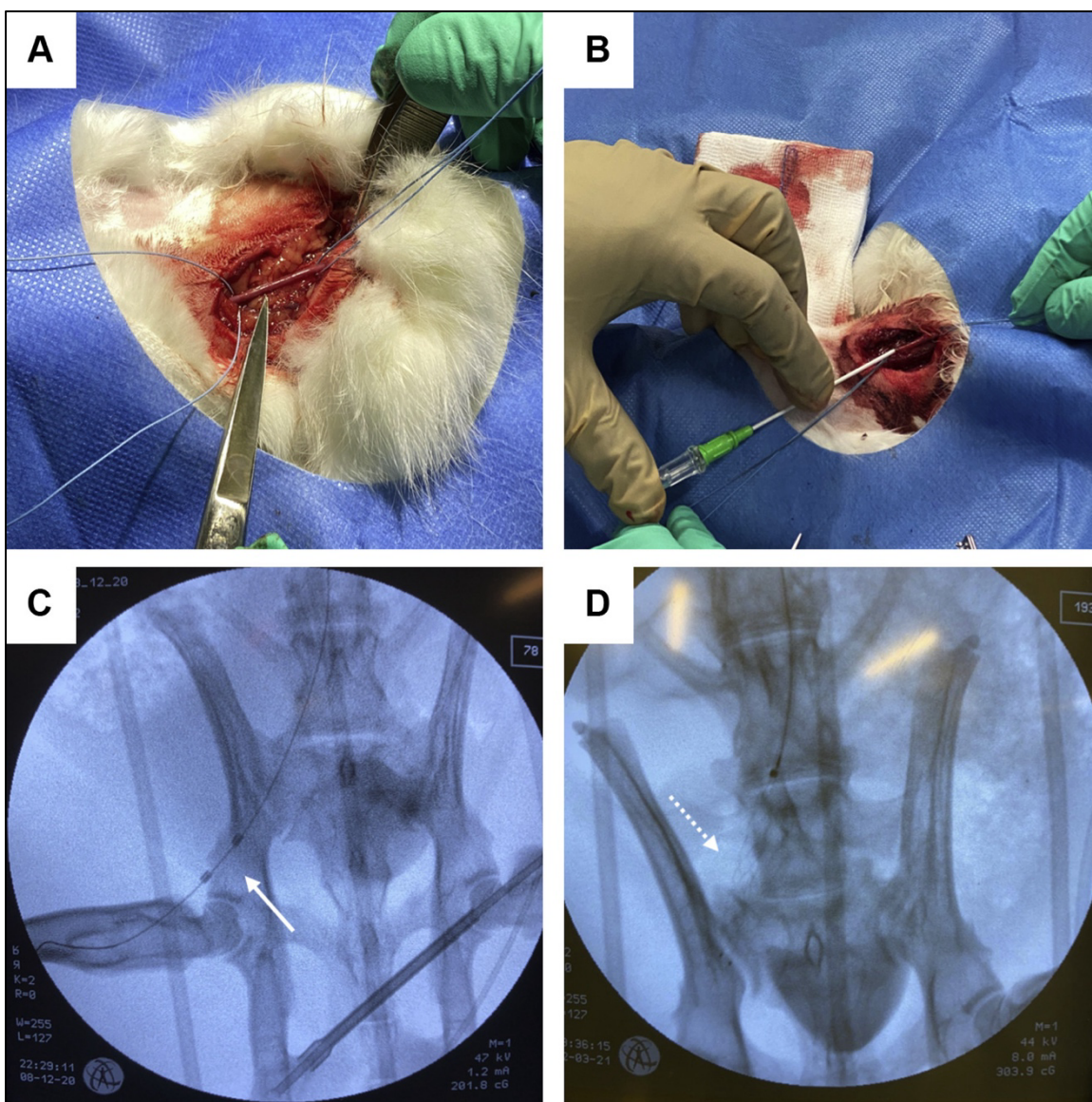


Abb. 4. Denudation via Zugang über die Halsschlagader. A: Chirurgische Freilegung der Carotis. B: Ligatur, Punktur und Einsatz einer 5F- Schleuse. C: Fogarty Katheter. D: Stentretriever. [86]. (Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlages).

Zu diesem Zweck ist es üblich, einen Zugang zum Gefäßsystem durch operative Freilegung der Halsschlagader und Punktion ebenjener mittels Seldinger-Technik zu erlangen und sie im Anschluss zu ligieren (vgl. Abb. 4).

In Modellen, die Ballondenudation mit einer atherogenen Diät kombinieren, kann die Entwicklung atherosklerotischer Plaques bereits nach 7-10 Tagen beobachtet werden, während nach 6-10 Wochen stenotische Läsionen mit Lumeneinengung vorliegen. Die wesentliche Zusammensetzung dieser Plaques ähnelt stark derjenigen des Menschen und die Bildung einer Neointima kann sowohl auf histologischer als auch auf molekularer Ebene nachgewiesen werden [129]. Bei der Verwendung eines Stents anstatt eines Ballons entwickelt sich die In-Stent-Restenose mit neointimaler Hyperplasie innerhalb eines Monats [66].

Einen minimalinvasiven Zugang über die Gefäße des Ohres verwendete man bereits in anderen Modellen in früheren Studien, beispielsweise zur Induktion von progressiver myokardialer Hypertrophie oder zur Erforschung von Restenosen in der Thoraxaorta [130-133]. Die vorliegende Studie macht sich diese Vorarbeit zu Nutze und erweitert sie um die Verwendung eines Stentretreivers, was den notwendigen Durchmesser verringert und somit die katheterbasierte Nutzung des Ohrzuges sowie der Beckenarterien als Locus Operandi ermöglicht.

III. PUBLIKATION

A minimally invasive animal model of atherosclerosis and neointimal hyperplasia for translational research

Original article

Abstract

Background A variety of animal models has been developed for research on atherosclerosis and neointimal hyperplasia. While small animal models contain limits for translational research, we aimed to develop an atherosclerosis model with lumen-narrowing plaques to foster basic research in vascular biology, the development of new angioplasty devices and vessel wall imaging approaches.

Methods Endothelial denudation was performed *via* a minimally invasive approach through the auricular artery, followed by stent-retriever mediated endothelial injury in New Zealand White rabbits ($n = 10$). Along with a high-fat diet, the rabbits developed lumen-narrowing atherosclerosis and neointimal hyperplasia of the iliac arteries within a 6-weeks period after mechanical injury. The stent-retriever method was compared with a conventional rabbit model ($n = 10$) using balloon denudation *via* surgical access and both models analyzed with a particular focus on animal welfare. Fisher's exact, Mann–Whitney U , and unpaired t tests were used.

Results The average time for the entire procedure was 62 min for the balloon group and 31 min for the stent-retriever group ($p < 0.001$). The stent-retriever model resulted in less periprocedural morbidity (including expenditure, intubation time, anesthetics and end-tidal CO_2 level) and mortality (40% mortality in the conventional group compared to 0% in the stent-retriever model, $p = 0.011$), while generating lumen-narrowing atherosclerotic lesions with key features as compared to humans as revealed by time-of-flight magnetic resonance imaging and histology.

Conclusions We developed a minimally invasive model of iliac atherosclerosis with high reproducibility and improved animal welfare for translational research.

Relevance statement This advanced rabbit model could allow for translational research in atherosclerosis, including pharmacological investigations as well as research on interventional angioplasty procedures.

Keywords (MESH terms): Endothelium (vascular), Models (animals), Neointima, Plaque (atherosclerotic), Stents.

Key points

- Rabbit models show similar lipid metabolism as humans.
- Stent-retriever mediated endothelial denudation causes neointimal hyperplasia and lumen narrowing.
- This minimal invasive model allows for clinical translation including pharmacological investigations and vessel wall imaging.

Abbreviations

etCO ₂	End-tidal carbon dioxide
HFD	High-fat diet
IQR	Interquartile range
MRA	Magnetic resonance angiography
MRI	Magnetic resonance imaging

Declarations**Ethics approval**

The ethical approval of the experiment was granted by the Government of Bavaria, Germany (Protocol Number: ROB-55.1-2532.Vet_02-19-178).

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The data that support the findings of this study are available from the M.W. on reasonable request.

Competing interests

The authors of this manuscript declare no relationships with any companies, whose products or services may be related to the subject matter of the article.

Funding

The study received grant support from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (WI3686/7-1) to MW.

Authors' contribution

M.W., M.E., V.F.S., B.P. and M.A.K. participated in conceptional design of the study. M.E., V.F.S, O.Ö., M.S., A.v.T. and M.W. performed the animal experiments. V.F.S, O.Ö., M.S. and M.W. analyzed and interpreted the radiological data. O.D. and V.F.S. set up the MRI protocol. S.E., M.A.K. and A.J. carried out histology and interpreted histological data. M.E., V.F.S, M.A.K and M.W. drafted the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript.

Acknowledgements

We thank Moritz Bäuerle B.A., Munich, for providing graphics of balloon catheter and stent-retriever. We further thank Dana Matzek and Nadine Ntaraklitsas (BMC, Munich) for support regarding animal care and handling. We further appreciate the technical assistance of Andrea Wagner (Neuropathology, Münster) for preparation of histological samples. No large language models (LLMs) were used for writing or editing the manuscript.

Background

Atherosclerosis represents a chronic and progressive inflammatory condition resulting from multifactorial causes, leading to the gradual obstruction of arterial blood vessels over time. This predominantly affects the coronary, carotid, and peripheral arteries, causing either chronic impairment of blood flow or a sudden decrease in organ perfusion in case of acute vessel occlusion. The well-established standard to treat lumen-narrowing atherosclerotic plaques – percutaneous transluminal angioplasty – still shows a relapse rate of up to 50% within the first 12 months due to neointimal hyperplasia and subsequent restenosis [1–3]. Neointimal hyperplasia results from abnormal smooth muscle cells, which migrate from the tunica media towards the intimal layer and continuously proliferate in response to injury [4].

In order to develop targeted approaches minimizing neointimal hyperplasia for example *via* drug-eluting angioplasty devices, a profound understanding of the biological mechanisms of restenosis is required. Various animal models have been developed and are being used, from small rodents up to non-human primates [5]. High-throughput models of rats and mice lack translational potential due to manifold dissimilarities to humans. Most importantly, various injury models in conjunction with special diets result in intense vascular inflammation and some even in lumen narrowing stenosis [6]. Models in larger animals instead are cumbersome and expensive in terms of the technical procedure and animal housing. In this regard, rabbit models have shown to be suitable for studying restenosis because of their size as well as cardiovascular and metabolic similarities to humans [7]. Atherosclerotic lesions are frequently generated by a combination of high-fat diet and mechanical injury of the endothelial cell layer [8, 9].

Previous rabbit models have proven to generate lumen narrowing atherosclerotic lesions and neointimal formation, but also come with several considerable disadvantages. The overstretching of the vessel wall by use of oversized catheters and balloons as well as the substantially high level of procedural invasiveness correlates with a certain risk of stroke and wound inflammation [10–13]. Alternative models in other larger animal models such as dogs or non-human primates have been described for similar purpose; however, the associated benefits have to be weighted critically against the increased maintenance efforts and costs, but even more importantly ethical concerns when using those far developed species [5]. The rabbit thereby is considered a good compromise between high translational potential, reasonable maintenance and being ethically justifiable.

We aimed to establish a minimally invasive rabbit model of atherosclerosis that creates reproducible lumen-narrowing plaques without massive overstretching of the vessel wall, which regularly results in rupture up to the tunica media and increased vessel wall hemorrhage [5, 14, 15]. A model more closely resembling human pathophysiology was thought to enhance translatability especially for endovascular therapy similar to clinical interventions for lumen-narrowing lesions, while simultaneously providing eased feasibility, improved animal welfare as well as a low rate of failure. The stent-retriever model is aimed to be well suited for both interventional research, such as the development of novel drug-eluting devices, antithrombotic therapies as well as gene therapies addressing neointimal hyperplasia, as well as

to foster research on vessel imaging of atherosclerosis, such as imaging endothelial dysfunction, vascular wall inflammation, early plaque formation and response to angioplasty.

Methods

Experimental protocol

The ethical approval of the experiment was granted by the Government of Bavaria, Germany (Protocol Number: ROB-55.1-2532.Vet_02-19-178).

The experimental setting consisted of 20 male New Zealand White rabbits, 18 weeks of age, and 3–4 kg of weight at the beginning of the experiment. The animals were housed separately with about 2 m² of space each and provided with enrichment items as well as hiding options and nesting material [16]. A 12-hour day and night rhythm was maintained including dusk and dawn.

The rabbits were fed an atherogenic high-fat and high-cholesterol diet (Diet-Nr. #290009, Altromin, Lage, Germany) to which they became accustomed within 4 weeks: 1st week 25% high-fat diet (HFD), 2nd week 50% HFD, 3rd week 75% HFD, 4th week 100% HFD. The diet was complemented by the distribution of hay and water ad libitum. Control and care of well-being was provided daily while scoring of vital parameters and general health was executed at least twice a week. Surgical experiments were performed by a team of two interventional radiologists with >10 years of experience in vascular procedures as well as with previous experience in rabbit research models, while the perioperative care as well as anesthesia was conducted by a dedicated veterinarian experienced in animal research models.

The animals were split randomly into two groups of 10 rabbits each. One group to receive the conventional, transcarotid balloon injury model and the other one to receive the new minimally invasive trans-auricular stent-retriever induced arterial denudation model. To ensure optimal comparability, we used isoflurane narcosis sustained through an automatic ventilator system. Upon anesthesia induction (introduced by intravenous propofol), the following medical regimen was applied: for maintenance of analgesia Fentanyl (0.004 mg/kg intravenously every 30 min) and metamizole (60 mg/kg subcutaneously) were firstly injected. enrofloxacin 7.5 mg/kg was injected intravenously before vessel puncture or open surgery in order to prevent infections, while 0.07mg/kg Aspirin and 45 IU/kg heparin were injected immediately before endothelial denudation to prevent acute thrombus formation. The ventilator mode was set on pressure control with 25–30 breaths/min and a basic isoflurane setting of 2.0 vol%, adjusted as needed. Digital pulse oximetry and capnography were used to monitor vital signs.

Following the intervention, rabbits in both groups were maintained for up to 6 weeks on the atherogenic diet until receiving magnetic resonance imaging (MRI) for assessment of lumen-narrowing lesions. Following MRI in deep sedation, animals were euthanized and vessel samples of the aortic and iliac arteries were obtained. An overview of the experimental setup is shown in **Fig. 1**.

Conventional transcarotid balloon injury technique

Following general anesthesia, the rabbit was positioned supinely, the throat area being meticulously shaved and disinfected with povidone [14, 17]. Access to the carotid artery was achieved through a 2–3 cm lateral incision along the trachea. Sutures with a 4-0 vicryl filament are placed upstream and downstream the vascular access-site. The exposed common carotid artery was punctured through Seldinger technique with a micropuncture set using a 21-G needle and a 0.018-inch introducer wire (Micropuncture Pedal Introducer Access Set, Cook Medical, Bloomington, IN, USA), followed by insertion of a 5-F sheath (Radiofocus, Terumo Europe NV, Leuven, Belgium). Thereupon, guided by x-ray fluoroscopy after digital subtraction angiography using Imeron 300M (Bracco, Germany) diluted 1:1 with normal saline, the iliac arteries were fathomed with a 0.018-inch guidewire. Subsequently, a 3-F Fogarty catheter (Edwards Life Sciences, Irvine, CA, USA) was positioned within the external iliac artery at the level of the iliac crest. After inflation, the catheter was drawn past the iliac bifurcation towards the aorta. On average, the overstretching was more than twice: 5-mm inflated balloon diameter with a 3-F Fogarty catheter in comparison to ~2-mm average iliac artery diameter in New Zealand White rabbits [5]. This procedure was repeated three times on each side followed by a control angiogram to screen for possible dissection and acute vessel obstruction. Afterwards, the accessed carotid artery was ligated and the wound was sutured in a two-layered manner and shielded using an antiseptic aluminum spray.

Transauricular stent-retriever injury technique

We modified the previously described approach in order to being able to conduct the model through a minimally-invasive vascular access, obviating open surgery and reducing (balloon-)catheter-induced overstretching of the vessel wall. As the stent-retrievers require only a 0.021-F microcatheter system, access *via* the central auricular artery deemed feasible.

For this approach, the rabbit was positioned in a prone stance. The area of access along the *ramus medius* of the *arteria auricularis caudalis* is shaved and prepared using a local anesthetic Xylocain-Prilocain ointment (EMLA, Aspen Germany, Munich, BY, Germany), promoting vessel dilatation. Subsequently, a modified Seldinger technique was executed: the artery was punctured percutaneously using a 21-G puncture needle and a 0.014-inch guidewire (Fathom, Boston Scientific, Marlborough, MA, USA) was introduced. A 1-mm incision was crafted along the guidewire with precision scissors, enlarging the orifice to accommodate the microcatheter. The 0.014-inch guidewire was subsequently advanced under x-ray guidance towards the iliac arteries, followed by a 1.9-F microcatheter (Echelon 14 or Rebar 14, eV3 Neurovascular, Irvine, CA, USA). Next, the stent-retriever (Solitaire 4 mm x 20 mm, Medtronic, Minneapolis, MN, USA) was positioned, unfolded, and pulled backward past the aortic bifurcation. This procedure was equally repeated three times on each side. Following the final angiogram and subsequent catheter removal, hemostasis at the puncture site was obtained through manual compression for 2 min. Antiseptic aluminum spray was used to protect and cover the wound. Major steps for each technique are shown in

Fig. 2.

Postinterventional animal care

After the intervention, the animals were treated with analgesic (buprenorphin 0.025 mg/kg, metamizole 60 mg/kg) and low-dosed anticoagulant (enoxaparin 60 IU/kg) medication for at least 48 h, supplemented by additional doses if needed and with doses tapered down as clinically possible. The rabbit's general medical condition, weight, and behavior were assessed meticulously for two days post intervention. The healing of wounds and hematomas as well as food and water intake were controlled daily for the following week.

For assessment of periprocedural and postprocedural animal welfare, morbidity and mortality the following parameters were assessed: procedure time of the endothelial injury, time from end of intervention until extubation, minimum and maximum end-tidal carbon dioxide (etCO₂) levels during the procedure, subjective post-procedure wake-up quality, overall procedure associated complications, post-interventional weight loss, food/water consumption, morbidity and mortality (**Table 1**).

Magnetic resonance imaging of rabbit vasculature

MRI was performed on a 3.0-T whole body system (MAGNETOM Skyra, Siemens Healthineers, Erlangen, Germany) with a bore diameter of 70 cm. The gradient system had a maximum gradient strength of 45 mT/m and a slew rate of 200 T/m/s. A circular polarized extremity coil (Siemens Healthineers) with a minimum inner dimension of 154 mm (total dimensions: 265 × 360 × 310 mm) was used as the receiver coil.

After deep anesthesia of the rabbit using 0.25 mg/kg medetomidine and 25 mg/kg ketamine intramuscular injection, the animals were inserted lengthwise as the upper coil part was removable. Thereupon, the rabbits were placed feet-forward-prone in the coil. The rabbits inside the coil were positioned in the isocenter of the *x-z* plane using the light visor. After scout scan the applied MRI protocol was based on a time-of-flight magnetic resonance angiography (MRA) sequence (flip angle 17°; echo time 3.43 ms; repetition time 52 ms; bandwidth 185 Hz/pixel) with a field of view of 181 × 199 mm² and an acquisition time of 348 s. Following the last MRI at 6 weeks after intervention, the animals were euthanized in deep anesthesia (0.25 mg/kg medetomidine and 25 mg/kg ketamine, intramuscular injection) using 400 mg/kg intravenous pentobarbital and the infrarenal aorta as well as both iliac arteries (including the pelvic bifurcation) were harvested.

Lumen diameter assessment of rabbit vasculature

For image analysis of the diameters of aortic and iliac vessels before and after endothelial injury, Visage Imaging software (Visage Imaging GmbH, Berlin, Germany) was used. The vessel diameters were measured using the time-of-flight MRA sequence images at three predefined positions perpendicular to the vessel axis (distal aorta immediately before the aortic bifurcation and the external iliac artery 2 cm distal of the iliac artery bifurcation). All assessments were performed similarly in the first MRI scan series before endothelial injury and in the last MRI scan series (before euthanasia). The assessment was performed by

two independent readers (diagnostic radiologists with > 5 years of experience in vascular MRI each) blinded to the groups and *ex vivo* analysis.

Histology and immunohistochemistry

Tissues were formalin-fixed, paraffin-embedded and stained with MSB-Lendrum staining (#12076.00100) (Morphisto GmbH, Offenbach am Main, Germany) according to standard protocols. For immunohistochemistry, a biotin-streptavidin peroxidase technique (DetectionLine PolyLink-HRP-Kit, DCS, Hamburg, Germany) was used. Sections were pretreated with citrate buffer (pH 6), target retrieval solution (pH 6.1; both Agilent Dako, Santa Clara, USA). The following primary antibodies were used: mouse anti-alpha-smooth muscle actin 1A4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, #MA5-11547, 1:800, no pretreatment), mouse anti-CD31 (Novus Biologicals, Centennial, USA, NBP2-44342, 1:100, pH 6.1) and with mouse anti-MHCII/HLA DR + DP + DQ antibody [CR3/43] (Agilent DAKO, Santa Clara, USA, ab7856; 1:100; pH 6.0). All sections were scanned using NanoZoomer S360 MD (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan) and intimal thickening analyzed using Aperio ImageScope-Pathology Slide Viewing Software (Version 12.3.3, Leica Biosystems, Nußloch, Germany).

Statistical analysis

The Shapiro-Wilk test was used for the assessment of normality. Data are presented as means $\pm$ standard deviation in case of normal distribution or as medians and interquartile range (IQR) for skewed distribution. Descriptive statistics were used to analyze the distribution of rabbits among the different categories. Subanalyses between both rabbit groups were performed using the Fisher's exact test for categorical data and the Mann-Whitney *U* test and unpaired t-test for metric data. Statistical testing was conducted using SPSS (Version 26.0, IBM Corp., Armonk, N, USA) and GraphPad Prism (Version 10.2.0, GraphPad Software, Boston, MA, USA) with $p < 0.05$ considered significant. All p -values were two-tailed.

Results

Interventional procedures

Ten animals underwent the conventional transcarotid balloon denudation and ten underwent the novel transauricular stent-retriever mediated denudation. Three complete endothelial denudation passages were performed on each iliac artery in each rabbit of both groups.

Six rabbits were lost after the intervention: three rabbits had to be euthanized due to hindlimb ischemia (two on the day of surgery and one animal one day post surgery), one rabbit had to be euthanized one day after the procedure due to lethargy and heavy pain despite analgesia, and two rabbits died due to uncharted reasons (sudden death) at day 12 and 13 respectively, after endothelial denudation. All animal losses occurred in the balloon group. In two animals of the stent-retriever group, initial attempts to access the auricular artery failed, requiring a second intervention which was successful. In the stent-retriever

group, all animals ($n = 10$) developed an intimal hyperplasia with a 100% survival rate (**Table 1**). Even though all animals in the balloon group also developed atherosclerotic plaques and a neointimal hyperplasia, the mortality rate in the balloon group was 40%, which was significantly higher compared to the stent-retriever group ($p = 0.011$) (**Table 1**).

The average time needed for the entire procedure was 62 min for the balloon group and 31 min for the stent-retriever group ($p < 0.001$) (**Table 1**). The duration from end of intervention until extubation showed a tendency to be faster in the stent-retriever group ($p = 0.076$). Furthermore, the awakening process demonstrated significantly improved outcomes within the stent-retriever group ($p < 0.001$) (**Table 1**). In addition, the shorter intervention time in the stent-retriever group also correlated with a lower intraoperative fentanyl usage (median 0.03 mg, IQR 0.02 mg) per animal in the balloon group *versus* 0.04 mg (IQR 0.02) per animal in the stent-retriever group ($p = 0.067$). Seven rabbits of the balloon group showed transient reflex bradycardia during critical parts of the surgery suggesting spikes in circulatory stress. The etCO_2 levels differed significantly between the stent-retriever (minimum $28 \text{ mmHg} \pm 2.6 \text{ mmHg}$; maximum 31.5 mmHg , IQR 2.5 mmHg) and the balloon group (minimum $24.1 \text{ mmHg} \pm 2.07 \text{ mmHg}$; maximum 28.5 mmHg , IQR 7.25 mmHg) ($p_{\min} = 0.002$; $p_{\max} = 0.049$) (**Table 1**). This data reflects a more stable expiratory etCO_2 level without major fluctuations. Six animals of the balloon group and one of the stent-retriever group needed an over 30% increase in isoflurane dose during intervention. Subjective wake-up quality was significantly better in the stent-retriever *versus* the balloon group ($p < 0.001$).

None of the 14 rabbits developed wound infections, necrosis or similar complications related to the vascular access site in the observation time and all hematomas and scars healed appropriately. Five animals of the balloon group showed an impaired food and water intake after the intervention, none in the stent-retriever group ($p = 0.033$, **Table 1**). Although overall weight progression displayed no significant disparity between the two groups, a more pronounced post-procedural weight-loss was seen 24 hours post intervention in the balloon group ($p = 0.070$). Postinterventional buprenorphine demand was significantly lower in the stent-retriever group than in the balloon group ($0.19 \pm 0.09 \text{ mg}$ *versus* $0.32 \pm 0.15 \text{ mg}$, $p = 0.036$).

In summary, morbidity and mortality were substantially decreased applying the minimally invasive stent-retriever technique.

Development of lumen-narrowing stenosis

Time-of-flight MRA revealed lumen narrowing stenosis in the iliac arteries in both groups at 6 weeks post endothelial denudation (**Fig. 3**). The mean perfused lumen decreased significantly both at the aortic bifurcation from 3.01 mm to 1.95 mm ($p < 0.001$), as well as from 1.69 mm to 1.33 mm ($p = 0.010$) at the external iliac in the balloon group. The lumen decrease following endothelial injury was similarly significant in the stent-retriever group, at the aortic bifurcation from 2.99 mm to 2.46 mm ($p = 0.009$), and along the external iliac artery from 1.74 mm to 0.96 mm ($p < 0.001$). The luminal decrease was at least 10% of the original diameter in each group.

Atherosclerotic lesion characterization

The development of atherosclerosis and lumen narrowing was finally investigated in a qualitative manner in both models post mortem by assessing the major characteristics of neointimal hyperplasia [3] by histology/immunohistochemistry at 6 weeks post endothelial injury and 10 weeks after initiating the HFD (**Fig. 4**). Intimal thickening was detectable in all animals and the intima-to-media ratio did not significantly differ between the two different models applied (balloon group: 0.89 mm, stent-retriever group: 1.46 mm, $p = 0.122$). Both the *lamina elastica interna* and *externa* were disrupted to some degree in all animals and in addition, the arrangement of the cells in the intima was not as homogeneous as usually seen in the media. A loose extracellular matrix with collagen and fat deposits and proliferation as well as infiltration of smooth muscle cells from the media into the intima was detectable along both groups. Macrophages, visualized by Major Histocompatibility Complex class II staining, accumulated predominantly in the neointima, representative for the chronic inflammatory process. Furthermore, 6 weeks after endothelial injury we detected a predominantly continuous endothelial barrier, shown by positive CD31 staining, in all animals of both groups. In summary, the balloon-mediated and the stent-retriever mediated endothelial injury led to neointimal hyperplasia.

Discussion

We have reported the successful establishment of a new, minimally invasive animal model for translational atherosclerosis research in rabbits.

Rabbit-based models have emerged as a good compromise between small rodents and large animals [5], allowing a reasonable throughput while at the same time providing large enough vascular anatomy allowing the investigation of interventional devices such as drug-coated balloons and stents [18–20]. The New Zealand White rabbit is large enough to permit detection of specific aspects of atherosclerosis and restenosis formation *via* translational molecular imaging approaches [21, 22]. One major advantage of rabbits compared to rodents is their lipid metabolism being similar to humans. With an intrinsically high cholesterol ester transfer protein–CETP activity, like humans, they transport most cholesterol via low-density lipoprotein and very low-density lipoprotein, which rodents do not [23]. Moreover, the rabbit apolipoprotein B as well as the receptor for low- and very low-density lipoprotein, both in the liver and on the surface of macrophages, are similar to the human isoform [24, 25]. HFD combined with subsequent mechanical endothelial injury therefore offers the possibility to investigate pathologic events such as neointimal hyperplasia in a translationally meaningful way. While the cholesterol levels fed to rodents for proper plaque formation exceed by far the physiological cholesterol uptake in humans, 0.3–0.5% cholesterol have shown to generate atheromas similar to human plaque formation in rabbits [14, 26]. As the lipid metabolism needed for sufficient atheroma formation resembles the human situation, one drawback of the most frequently used rabbit model was severity of the vascular injury [14, 18–20]. As rabbit iliac arteries measure 2 mm in maximum diameter the balloon denudation with a 4–5mm Fogarty balloon device results

in overstretching of the vessel wall, not resembling a human angioplasty procedure where overdilatation is being avoided in order to reduce vascular damage.

We therefore aimed to further improve the translatability of the rabbit model and reduce the severity of endothelial injury to the vessel wall. Our hypothesis was that endothelial denudation of the iliac arteries can be performed with a stent-retriever device, usually used for mechanical thrombectomy in stroke treatment [27]. Stent retrievers, especially when being pulled repetitively across the vessel, injure the endothelium, without rupture of the internal elastic lamina. As the shear stress to the vascular wall is much less compared to conventional stents and similarly the radial force exerted onto the vessel wall is reduced compared to inflating a semi-compliant balloon to twice the actual vessel lumen diameter, as being frequently used to cause endothelial denudation [14, 28]. The effect of stent-retrievers, causing a moderate injury to the endothelium while avoiding massive overstretching with rupture of the remaining components of the arterial wall is exactly the degree of injury needed to induce atherosclerosis in a translational manner. We postulated that utilizing a stent-retriever leads to a sufficient endothelial denudation, but at the same time avoids massive overstretching of the vessel compared to the conventional balloon model. The auricular artery access in the rabbit has been described before [29–31] and was recently described to gain access to the cerebral vasculature for stroke research [32], yet it has not yet been investigated for generating peripheral atherosclerosis. However, it comes with a quick learning curve and can be easily performed by a skilled interventionist. Moreover, there is no specific mechanical closure required to deal with the arterial access site, as it is required when accessing the carotid or iliac artery. The newly established technique allows performing sufficient endothelial injury for proper and reproducible plaque formation, at a shorter procedure time and learning curve, while simultaneously being associated with a decreased morbidity, mortality and loss of research animals.

Concerning animal welfare, our approach indicated a significantly increased well-being, providing decreased pain and stress, both during and post intervention. Additionally, the decreased need for analgesics, which are limiting the appetite of the animals and thereby impairing regular food intake was similarly considered beneficial. Gastrointestinal stasis, one of the most common causes of death in model rabbits, is nearly eradicated [33, 34]. To assess lumen-narrowing stenosis in rabbit iliac arteries time-of-flight MRA was considered most appropriate as it allows image reconstruction perpendicular to the vessel wall, at the same time avoiding the need for intravascular contrast agents.

A first limitation of this study is due to the lack of quantitative comparisons of key histopathological features between both groups, although plaque formation appeared similar when comparing the results from both groups qualitatively. This would allow judging potential differences with respect to plaque biology, vessel wall inflammation and the degree and kinetics of neointimal hyperplasia more profoundly. As histology cannot be considered a quantitative approach, key features of plaque formation such as dedicated metabolites in the vessel wall or deposition of certain radiological contrast agents could be compared by means of mass spectrometry imaging in the future [35, 36].

Another limitation is the lack of long-term data on plaque formation in comparison between the two models. While at 6 weeks the lumen narrowing was more pronounced following balloon denudation, it is unclear if this was a result of the more intense injury, and similarly if this difference holds true over a longer observation period. Now, with the new model being established it needs to be further validated with respect to long-term differences in the vascular wall and forming atheromas. Additionally, the model needs to be further evaluated with respect to pharmacological interventions targeting atherogenesis. Various approaches aiming at restoring endothelial function, reducing vascular wall inflammation and stabilizing ulcer-prone atheromas are under investigation [37–40], yet frequently limited to small animal models, which typically lack features like lumen-narrowing lesions as well as ulcerating plaques.

The modified rabbit model is thought to foster both research in interventional as well as diagnostic imaging. It will provide a new platform to study the effect of novel drug-eluting devices on vascular inflammation, neointimal proliferation and hyperplasia and subsequent restenosis formation. Similarly, additive therapies such as the development of novel antithrombotics is expected to pose a continuing challenge in vascular medicine requiring suitable, medium to large-scale animal models [41]. Also, novel approaches of gene therapy targeting central gene hubs regulating pivotal atherogenic as well as atheroprotective signaling need to be studied extensively in animal models before pilot trials can be performed in humans [42].

With respect to diagnostic imaging, vascular radiology has longed moved beyond imaging of the vessel diameter and stenotic lesions. Especially sophisticated MRI techniques are now able to visualize endothelial permeability using macromolecular contrast agents [43], vascular inflammation using superparamagnetic iron-oxide based nanoparticles targeting monocytes/macrophages [44] or to address specific aspects of neointimal hyperplasia using targeted probes and tracers [45]. The development of those novel imaging strategies requires profound validation, especially of the molecular and cellular targets. Similarly, for the translational purpose, those imaging approaches are favorably development in larger animal models that do not require dedicated ultrahigh field MRI scanners.

In summary, we presented a novel approach for minimally invasive endothelial denudation in hypercholesterolemic rabbits, leading to human-like atherosclerotic lesions with lumen-narrowing stenosis. The model is fast, easy to perform, and comes with reduced animal loss. At the same time, this model allows for translational research in atherosclerosis, including pharmacological investigations such as restoring endothelial dysfunction, ameliorating vessel wall inflammation, and reducing formation of rupture prone atheromas, as well as research on drug-eluting devices. Moreover, gene therapies trying to impede both *de novo* atherosclerosis as well as neointimal hyperplasia are on the horizon. They need to be evaluated in translational animal models prior to trials on humans.

References

1. Ahanchi SS, Tsihlis ND, Kibbe MR (2007) The role of nitric oxide in the pathophysiology of intimal hyperplasia. *J Vasc Surg* 45:A64–A73. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2007.02.027>
2. Kaltenbach M, Kober G, Scherer D, Vallbracht C (1985) Recurrence rate after successful coronary angioplasty. *Eur Hear J* 6:276–281. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a061852>
3. Otsuka F, Byrne RA, Yahagi K, Mori H, Ladich E, Fowler DR, Kutys R, Xhepa E, Kastrati A, Virmani R, Joner M (2015) Neoatherosclerosis: overview of histopathologic findings and implications for intravascular imaging assessment. *Eur Hear J* 36:2147–2159. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv205>
4. Brien ERO, Ma X, Simard T, Pourdjabbar A, Hibbert B (2011) Pathogenesis of neointima formation following vascular injury. *Cardiovasc Hematol Disord-Drug Targets* 11:30–39. <https://doi.org/10.2174/187152911795945169>
5. Ebert MLA, Schmidt VF, Pfaff L, Thaden A von, Kimm MA, Wildgruber M (2021) Animal models of neointimal hyperplasia and restenosis species-specific differences and implications for translational research. *JACC: Basic Transl Sci* 6:900–917. <https://doi.org/10.1016/j.jac-bts.2021.06.006>
6. Veseli BE, Perrotta P, Meyer GRAD, Roth L, Donckt CV der, Martinet W, Meyer GRYD (2017) Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol* 816:3–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.010>
7. Bocan TMA, Mueller SB, Mazur MJ, Uhlendorf PD, Brown EQ, Kieft KA (1993) The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. *Atherosclerosis* 102:9–22. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(93\)90080-e](https://doi.org/10.1016/0021-9150(93)90080-e)
8. Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, Moses J, Leon MB, Kutryk M, Serruys P (2004) Role of the endothelium in modulating neointimal formation Vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol* 44:733–739. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.04.048>
9. Park S-J, Kang S-J, Virmani R, Nakano M, Ueda Y (2012) In-stent neoatherosclerosis. A final common pathway of late stent failure. *J Am Coll Cardiol* 59:2051–2057. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.10.909>
10. Welt FGP, Rogers C (2002) Inflammation and restenosis in the stent era. *Arter, Thromb, Vasc Biol* 22:1769–1776. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000037100.44766.5b>
11. Ochijewicz D, Tomaniak M, Opolski G, Kochman J (2021) Inflammation as a determinant of healing response after coronary stent implantation. *Int J Cardiovasc Imaging* 37:791–801. <https://doi.org/10.1007/s10554-020-02073-3>
12. Zaidat OO, Fitzsimmons B-F, Woodward BK, Wang Z, Killer-Oberpfalzer M, Wakhloo A, Gupta R, Kirshner H, Megerian JT, Lesko J, Pitzer P, Ramos J, Castonguay AC, Barnwell S, Smith WS, Gress DR, Investigators VT (2015) Effect of a balloon-expandable intracranial stent vs medical therapy on risk of stroke in patients with symptomatic intracranial stenosis: The

VISSIT randomized clinical trial. JAMA 313:1240–1248. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.1693>

13. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB (1998) In-stent restenosis: Contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol* 31:224–230. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(97\)00450-6](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(97)00450-6)

14. Baumgartner C, Brandl J, Münch G, Ungerer M (2016) Rabbit models to study atherosclerosis and its complications – Transgenic vascular protein expression in vivo. *Prog Biophys Mol Biol* 121:131–141. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2016.05.001>

15. Phinikaridou A, Hallock KJ, Qiao Y, Hamilton JA (2009) A robust rabbit model of human atherosclerosis and atherothrombosis [S]. *J Lipid Res* 50:787–797. <https://doi.org/10.1194/jlr.m800460-jlr200>

16. Matzek D, Baldauf H-M, Schieweck R, Popper B (2021) Evaluation of a configurable, mobile and modular floor-pen system for group-housing of laboratory rabbits. *Animals* 11:977. <https://doi.org/10.3390/ani11040977>

17. Ribichini F, Joner M, Ferrero V, Finn AV, Crimins J, Nakazawa G, Acampado E, Kolodgie FD, Vassanelli C, Virmani R (2007) Effects of oral prednisone after stenting in a rabbit model of established atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 50:176–185. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.03.031>

18. Malle C, Tada T, Steigerwald K, Ughi GJ, Schuster T, Nakano M, Massberg S, Jehle J, Guagliumi G, Kastrati A, Virmani R, Byrne RA, Joner M (2018) Tissue characterization after drug-eluting stent implantation using optical coherence tomography. *Arter, Thromb, Vasc Biol* 33:1376–1383. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.113.301227>

19. Mori H, Cheng Q, Lutter C, Smith S, Guo L, Kutyna M, Torii S, Harari E, Acampado E, Joner M, Kolodgie FD, Virmani R, Finn AV (2017) Endothelial barrier protein expression in biodegradable polymer Sirolimus-eluting versus durable polymer Everolimus-eluting metallic stents. *JACC: Cardiovasc Interv* 10:2375–2387. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2017.06.059>

20. Nicol P, Lutter C, Bulin A, Castellanos MI, Lenz T, Hoppmann P, Lahmann AL, Colleran R, Euller K, Steigerwald K, Neubauer S, Rechenmacher F, Ludwig BS, Weinmüller M, Kerch G, Guo L, Cheng Q, Acampado E, Koppa T, Kessler H, Joner M (2020) Assessment of a pro-healing stent in an animal model of early neoatherosclerosis. *Sci Rep* 10:8227. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64940-2>

21. Hyafil F, Pelisek J, Laitinen I, Schottelius M, Mohring M, Döring Y, Vorst EPC van der, Kallmayer M, Steiger K, Poschenrieder A, Notni J, Fischer J, Baumgartner C, Rischpler C, Nekolla SG, Weber C, Eckstein H-H, Wester H-J, Schwaiger M (2017) Imaging the cytokine receptor CXCR4 in atherosclerotic plaques with the radiotracer ⁶⁸Ga-Pentixafor for PET. *J Nucl Med* 58:499–506. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.179663>

22. Phinikaridou A, Andia ME, Indermuehle A, Onthank DC, Cesati RR, Smith A, Robinson SP, Saha P, Botnar RM (2014) Vascular Remodeling and Plaque Vulnerability in a Rabbit Model of Atherosclerosis: Comparison of delayed-enhancement MR imaging with an Elastin-specific

contrast agent and unenhanced black-blood MR imaging. *Radiology* 271:390–399. <https://doi.org/10.1148/radiol.13130502>

23. Tall AR (1993) Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J lipid Res* 34:1255–74

24. Fan J, Kitajima S, Watanabe T, Xu J, Zhang J, Liu E, Chen YE (2015) Rabbit models for the study of human atherosclerosis: From pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacol Ther* 146:104–119. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.09.009>

25. Takahashi S, Ito T, Zenimaru Y, Suzuki J, Miyamori I, Takahashi M, Takahashi M, Ishida T, Ishida T, Hirata K, Yamamoto TT, Iwasaki T, Hattori H, Shiomi M (2011) Species differences of macrophage very low-density-lipoprotein (VLDL) receptor protein expression. *Biochem Biophys Res Commun* 407:656–662. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.069>

26. Fan J, Watanabe T (2011) Cholesterol-fed and transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 7:26. <https://doi.org/10.5551/jat1994.7.26>

27. Pierre K, Perez-Vega C, Fusco A, Olowofela B, Hatem R, Elyazeed M, Azab M, Lucke-Wold B (2022) Updates in mechanical thrombectomy. *Explor Neurosci* 1:83–99. <https://doi.org/10.37349/en.2022.00007>

28. Koppa T, Cheng Q, Yahagi K, Mori H, Sanchez OD, Feygin J, Wittchow E, Kolodgie FD, Virmani R, Joner M (2018) Thrombogenicity and early vascular healing response in metallic biodegradable polymer-based and fully bioabsorbable drug-eluting stents. *Circ: Cardiovasc Interv* 8:NA; <https://doi.org/10.1161/circinterventions.115.002427>

29. Karnabatidis D, Katsanos K, Diamantopoulos A, Kagadis GC, Siablis D (2006) Transauricular arterial or venous access for cardiovascular experimental protocols in animals. *J Vasc Interv Radiol* 17:1803–1811. <https://doi.org/10.1097/01.rvi.0000244836.16098.b1>

30. Tsigkas G, Katsanos K, Apostolakis E, Papadimitriou E, Koutsoumpa M, Kagadis GC, Koumoundourou D, Hahalis G, Alexopoulos D (2016) A minimally invasive endovascular rabbit model for experimental induction of progressive myocardial hypertrophy. *Hypertens Res* 39:840–847. <https://doi.org/10.1038/hr.2016.66>

31. Koniari I, Apostolakis E, Diamantopoulos A, Papadaki H, Papadimitriou E, Poimenidi E, Karnabatidis D, Karahaliou A, Costaridou L, Papalois A, Siablis D, Dougenis D, Alexopoulos D (2014) Transauricular balloon angioplasty in rabbit thoracic aorta: a novel model of experimental restenosis. *Lipids Heal Dis* 13:33. <https://doi.org/10.1186/1476-511x-13-33>

32. Gökten M, Öcal O, Sezer C, Zırh S, Muftuoğlu S, Öcal E, Bilginer B, Arat A (2023) In vivo study of the utility of selective intra-arterial injection of thiopental for neuroprotection in reversible cerebral ischemia. *Acta Radiol* 65:115–122. <https://doi.org/10.1177/02841851231206503>

33. Mapara M, Thomas BS, Bhat KM (2012) Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent Res J* 9:111–118. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.92960>

34. Reusch B (2005) Rabbit Gastroenterology. *Vet Clin North Am: Exot Anim Pr* 8:351–375. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2005.01.007>

35. Aichler M, Huber K, Schilling F, Lohöfer F, Kosanke K, Meier R, Rummeny EJ, Walch A, Wildgruber M (2015) Spatially resolved quantification of Gadolinium(III)-based magnetic resonance agents in tissue by MALDI imaging mass spectrometry after in vivo MRI. *Angew Chem Int Ed* 54:4279–4283. <https://doi.org/10.1002/anie.201410555>
36. Lohöfer F, Buchholz R, Glinzer A, Huber K, Haas H, Kaissis G, Feuchtinger A, Aichler M, Sporns PB, Hölte C, Stölting M, Schilling F, Botnar RM, Kimm MA, Faber C, Walch AK, Zerneck A, Karst U, Wildgruber M (2020) Mass spectrometry imaging of atherosclerosis-affine gadofluorine following magnetic resonance imaging. *Sci Rep* 10:79. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57075-6>
37. Tissier F, Mallem Y, Goanvec C, Didier R, Aubry T, Bourgeois N, Desfontis J-C, Dubreuil M, Grand YL, Mansourati J, Pichavant-Rafini K, Plee-Gautier E, Roquefort P, Theron M, Gilard M (2016) A non-hypocholesterolemic atorvastatin treatment improves vessel elasticity by acting on elastin composition in WHHL rabbits. *Atherosclerosis* 251:70–77. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.039>
38. Taylor EN, Huang N, Lin S, Mortazavi F, Wedeen VJ, Siamwala JH, Gilbert RJ, Hamilton JA (2022) Lipid and smooth muscle architectural pathology in the rabbit atherosclerotic vessel wall using Q-space cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson* 24:74. <https://doi.org/10.1186/s12968-022-00897-7>
39. Zhang X, Chen X, Liang Z, Nie M, Yan Y, Zhao Q (2022) Pioglitazone combined with atorvastatin promotes plaque stabilization in a rabbit model. *Vascular* 30:1205–1212. <https://doi.org/10.1177/17085381211040992>
40. Jiao J, Hu B, Mou T, Li Q, Tian Y, Zhang N, Zhang Y, Yun M, Nan N, Tian J, Yu W, Mi H, Dong W, Song X (2024) Translocator protein 18 kDa tracer 18F-FDPA PET/CTA imaging for the evaluation of inflammation in vulnerable plaques. *Mol Pharm* 21:3623–3633. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.4c00344>
41. Nakamura N, Torii S, Aihara K, Noda S, Kato T, Nakazawa K, Ikari Y, Nakazawa G (2023) Poor below knee runoff impacts femoropopliteal stent failure and fluoropolymer antithrombotic effect in healthy swine model. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 66:722–729. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2023.07.038>
42. Brennan PG, Mota L, Aridi T, Patel N, Liang P, Ferran C (2024) Advancements in omics and breakthrough gene therapies: a glimpse into the future of peripheral artery disease. *Ann Vasc Surg* 107:229–246. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2024.01.031>
43. Baker JHE, McPhee KC, Moosvi F, Saatchi K, Häfeli UO, Minchinton AI, Reinsberg SA (2016) Multi-modal magnetic resonance imaging and histology of vascular function in xenografts using macromolecular contrast agent hyperbranched polyglycerol (HPG-GdF). *Contrast Media Mol Imaging* 11:77–88. <https://doi.org/10.1002/cmmi.1661>
44. Evans RJ, Lavin B, Phinikaridou A, Chooi KY, Mohri Z, Wong E, Boyle JJ, Krams R, Botnar R, Long NJ (2020) Targeted molecular iron oxide contrast agents for imaging atherosclerotic plaque. *Nanotheranostics* 4:184–194. <https://doi.org/10.7150/ntno.44712>

45. Xia M, Wu F, Yang Y, Lu W, Song M, Ma Z (2023) The possibility of visualizing TGF- β 1 expression in ApoE $^{-/-}$ mice atherosclerosis using MR targeted imaging. *Acta Radiol* 65:99–105. <https://doi.org/10.1177/02841851231153989>

Tables

Table 1 Procedural details including procedure-related morbidity and mortality data

Perioperative characteristics	Stent-retriever (<i>n</i> = 10)	Balloon (<i>n</i> = 10)	<i>p</i> -value
Procedure time (min)	30.50 ± 8.6*	62.00 ± 13.8*	< 0.001 ¹
Time from end of intervention until extubation (min)	2.60 (0) [#]	6.10 (8) [#]	0.076 ²
etCO ₂ level			
Minimum (mm Hg)	28.0 ± 2.6*	24.1 ± 2.2*	0.002 ¹
Maximum (mm Hg)	31.5 (2.5) [#]	28.5 (7.25) [#]	0.049 ²
Wake-up quality			< 0.001 ³
Good	10/10 (100%)	1/10 (10%)	
Moderate	0/10 (0%)	8/10 (80%)	
Impaired	0/10 (0%)	1/10 (10%)	
Overall complications	0/10 (0%)	7/10 (70%)	0.011 ³
Hindlimb ischemia	0/10 (0%)	3/10 (30%)	0.210 ³
Sudden death	0/10 (0%)	2/10 (20%)	0.473 ³
Termination criteria fulfilled	0/10 (0%)	2/10 (20%)	0.473 ³
Postinterventional weight loss			
1 day after intervention (kg)	0.02 ± 0.06 [#]	0.10 ± 0.07*	0.070 ¹
2 day after intervention (kg)	0.04 ± 0.11*	0.01 ± 0.06*	0.195 ¹
Postinterventional food/ water consumption			
Good	10/10 (100%)	5/10 (50%)	0.033 ³
Impaired	0/10 (0%)	5/10 (50%)	
Mortality			
Lumen narrowing plaques	0/10 (0%) 10/10 (100%)	6/10 (60%) 4/4 (100%)	0.011 ³ > 0.999 ³

*Mean ± standard deviation; [#] Median (interquartile range); ¹Unpaired *t*-test;

²Mann-Whitney *U* test; ³Fisher exact test.

Figures

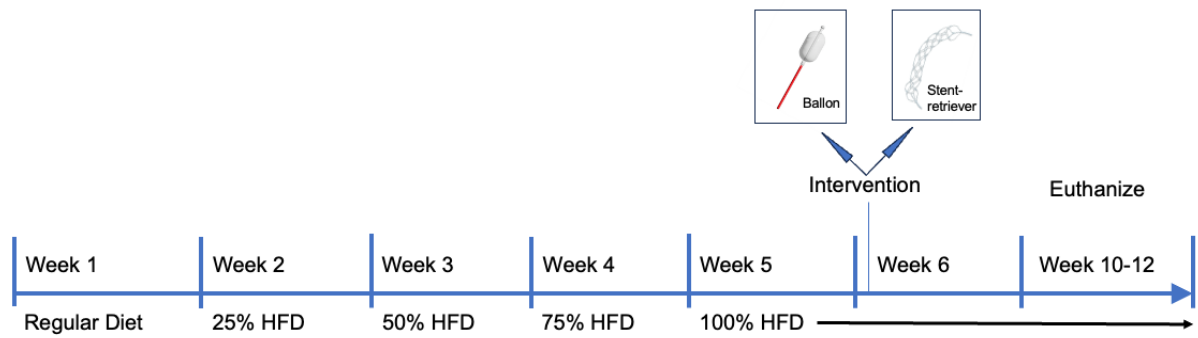


Fig. 1 Experimental workflow. All animals were acclimatized to the HFD over a period of 4 weeks. Balloon-assisted intervention or stent-retriever-mediated endothelial denudation was performed at week 6. Animals were sacrificed at week 10–12 and arteries histologically analyzed. HFD: High-fat diet.

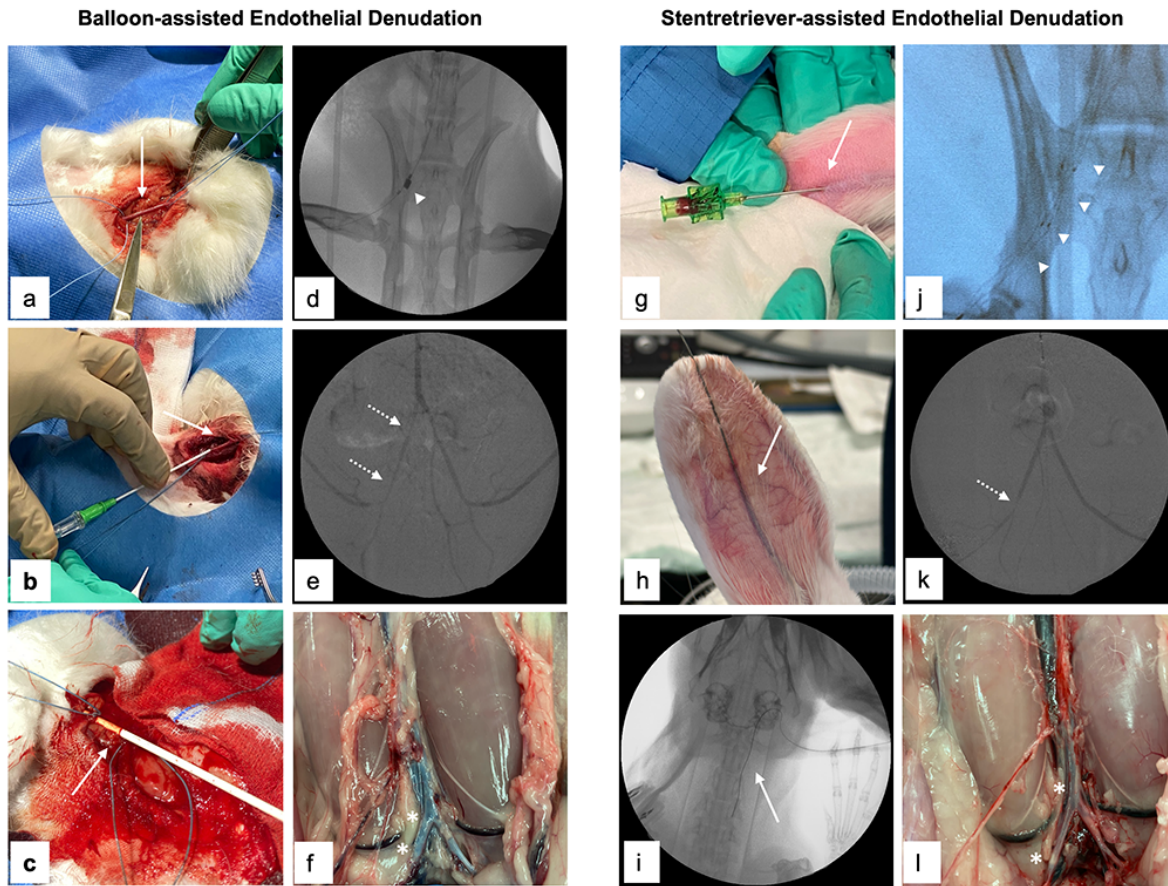


Fig. 2 Comparison of balloon-assisted endothelial denudation *versus* stent-retriever-mediated endothelial denudation. For the conventional balloon-assisted endothelial denudation, the carotid artery is operatively exposed (**a**, arrow) and punctured with a 21-G needle (**b**, arrow), followed by insertion of 5-F sheath in Seldinger technique (**c**, arrow). After catheterization of the iliac artery the Fogarty balloon catheter device is placed within the external iliac artery, inflated (**d**, arrowhead) and pulled back into the distal aorta three times, followed by the same procedure on the contralateral side leading to local endothelial denudation and acute vasospasm (**e**, dotted arrows). Six weeks after the procedure the animals are euthanized and macroscopic plaque formation is visible (**f**, asterisk). For the stent-retriever technique the *arteria auricularis caudalis* is punctured (**g**, arrow) with a 21-G needle and a 0.014 inch guidewire inserted into the artery (**h**, arrow) towards the common carotid artery (**i**, arrow) followed by the microcatheter. The stent-retriever is unfolded within the external iliac artery (**j**, arrowheads) and pulled backwards to the infrarenal aorta, leading to acute vasospasm as a result from the endothelial injury (**k**, dotted arrow). Six weeks later, macroscopically visible plaques are present along the aortic bifurcation and iliac arteries (**l**, asterisk).

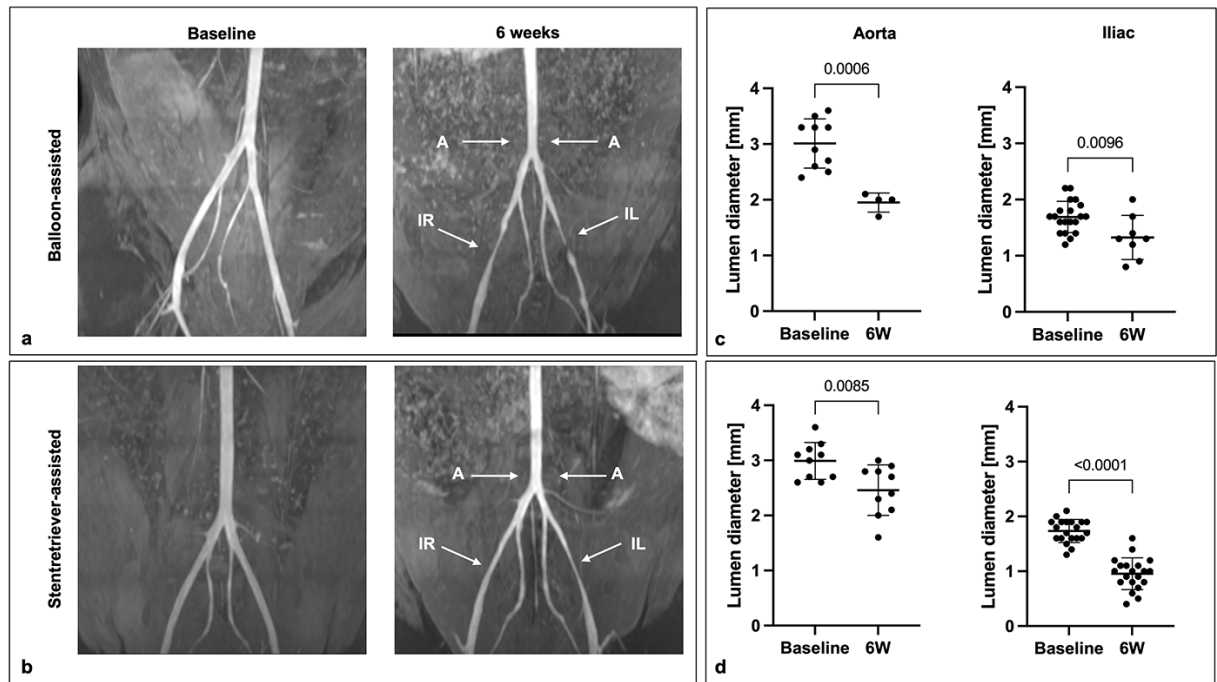


Fig. 3 Assessment of lumen-narrowing atherosclerosis. (a, b) Time-of-flight magnetic resonance angiography was performed 6 weeks after mechanical injury in both groups revealing lumen-narrowing lesions along the aortic bifurcation and iliac arteries. Vessel segments used for subsequent diameter assessment are marked with arrows. (c, d) Lumen diameter assessment revealed a significant reduction at 4–6 weeks compared to baseline both at the aortic bifurcation as well as the iliac artery.

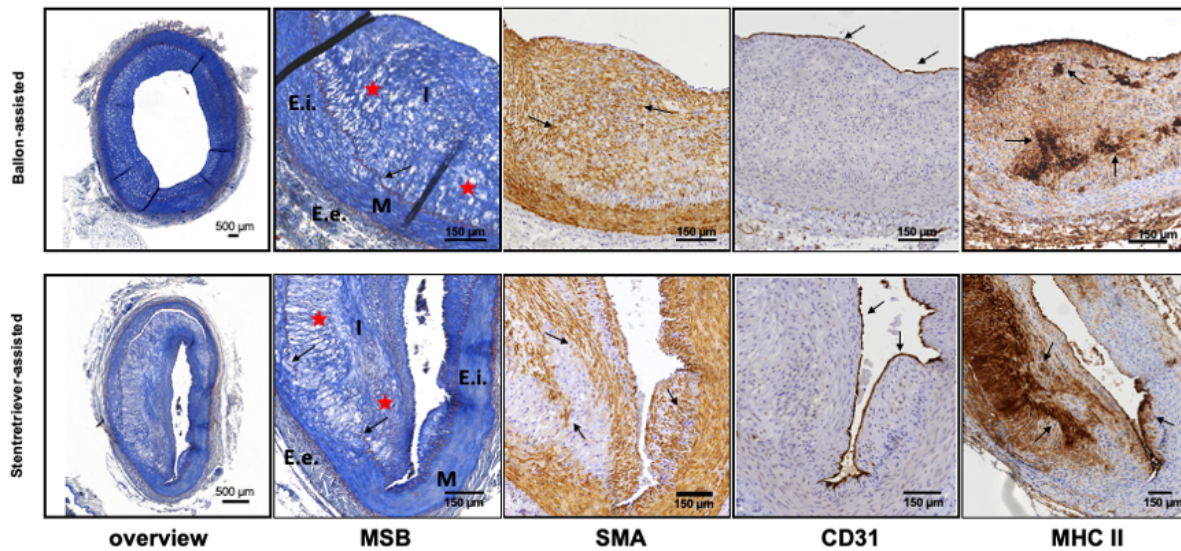


Fig. 4. Histological assessment of atherosclerotic lesions. Staining of iliac vessel segments by MSB, SMA, CD31 and MHC II revealed characteristic features of inflammatory atherosclerotic lesions with the presence of macrophages, smooth muscle cell proliferation and migration towards the intima, disruption of the regular arterial wall architecture and an endothelium-covered hypertrophic intima. MSB: Martius scarlet blue, SMA: Smooth muscle actin, CD31: Cluster of Differentiation 31, MHC II: Major histocompatibility complex class II.

IV. DISKUSSION

Tiermodelle spielen eine entscheidende Rolle bei der Erforschung atherosklerotischer Erkrankungen [86]. Die vorliegende Studie stellt ein innovatives, minimalinvasives Kaninchenmodell vor, welches die mit traditionellen Modellen verbundenen Einschränkungen zu überwinden und signifikante Verbesserungen im Hinblick auf das translationale Potenzial und das Tierwohl zu erreichen sucht.

Zwischen Hochdurchsatzmodellen an Nagern und der Praktikabilität größerer Tiere haben sich Kaninchen als außerordentlich guter Kompromiss erwiesen. Sie ermöglichen gleichzeitig eine adäquate Durchsatzmenge und eine ausreichend große Gefäßanatomie für die Verwendung interventioneller Gerätschaften, die auch in der Humanmedizin zum Einsatz kommen, wie z.B. Ballonkatheter und Stents [86, 134]. NZW ist eine Kaninchenrasse, welche groß genug ist, um in Kombination mit modernen, molekularen Bildgebungsverfahren spezifische Aspekte atherosklerotischer Erkrankungen zu untersuchen [135, 136]. Im Vergleich zu Altweltmäusen bieten Kaninchen einen entscheidenden Vorteil: Ihr Lipidstoffwechsel ist dem des Menschen bedeutend ähnlicher als bei jenen. Vermittelt durch ihre hohe CETP-Aktivität, transportieren sie den Großteil des Cholesterins als LDL und VLDL, wohingegen bei Mäusen und Ratten primär HDL zum Einsatz kommt, welches in der Leber abgebaut wird [46, 116, 117]. Des Weiteren bestehen wichtige Ähnlichkeiten unter anderem in der Rezeptoraffinität und -aktivierung der Lipoproteine sowie deren Struktur, der Cholesterinsynthese und der hepatischen Lipase [117]. Eine fettreiche Diät in Kombination mit mechanischer Endothelschädigung bietet daher die Möglichkeit, pathologische Ereignisse wie Restenose und neointimale Hyperplasie in einer translational sinnvollen Weise zu untersuchen. Während die Cholesterinmengen, die Altweltmäusen verabreicht werden müssen, um eine adäquate Plaquebildung zu verursachen, die physiologische Cholesterinaufnahme des Menschen bei weitem übersteigen, hat sich gezeigt, dass ein Anteil von 0,3–0,5 % Cholesterin in der Diät bei Kaninchen effektiv menschenähnliche Atherome erzeugt [120, 121]. Abseits der vorteilhaften Stoffwechselsituation besteht der Nachteil des am häufigsten verwendeten Kaninchenmodells in der Schwere der Gefäßverletzung [120, 137, 138]. Da die *A. iliaca* des Kaninchens einen maximalen Durchmesser von 2 mm aufweist, führt die Denudation mit einem 4-5 mm großen Fogarty-Ballon zu einer Überdehnung der Gefäßwand, was der Vorgehensweise eines angioplastischen Eingriffs beim Menschen widerspricht, da dies hier vermieden wird, um Gefäßschäden zu begrenzen [139].

Die umfangreichen chirurgischen Eingriffe bei herkömmlichen Interventionsmethoden verlangen erfahrenes Personal und sind mit einer steilen Lernkurve verbunden. Die hohe Invasivität und massive Gefäßüberdehnung führen zu einem nicht zu unterschätzenden Maß an Morbidität und Mortalität. Deshalb war das Ziel dieser Studie, ein weniger invasives, leicht reproduzierbareres Kaninchenmodell mit gleichzeitig hohem translationalem Potenzial zu etablieren, das die Anwendung vereinfacht und gleichzeitig das Tierwohl priorisiert.

Die Übertragbarkeit des Modells sollte weiter verbessert und die Schwere der Endothelschädigung der Gefäßwand verringert werden. Unsere Hypothese war, dass die Denudation des Endothels der *A. iliaca* mit einem Stentretreiver durchgeführt werden kann und damit einen weniger invasiven Eingriff und gleichzeitig eine realistischere Plaquebildung ermöglicht. Stentretreiver werden üblicherweise für die mechanische Thrombektomie bei der Behandlung von Schlaganfällen verwendet [140]. Sie verletzen das Endothel insbesondere dann, wenn sie wiederholt durch das Gefäß bewegt werden, wobei die *lamina elastica interna* unangetastet bleibt. Im Vergleich zu konventionellen Stents ist der Scherstress auf die Gefäßwand dabei deutlich geringer und auch die radialen Kräfte, welche durch das Aufblasen eines Semi-Compliant-Ballonkatheters bis auf das Doppelte des Lumendurchmessers verursacht werden, bleiben gering [120, 141]. Die Wirkung eines Stentretreivers, der eine moderate Schädigung des Endothels verursacht und gleichzeitig eine massive Überdehnung mit Ruptur der verbleibenden Komponenten der Arterienwand vermeidet, entspricht genau dem Grad der Verletzung, der notwendig ist, um die Bildung atherosklerotischer Plaques auf eine translational sachdienliche Weise zu induzieren.

Die Methode der Endotheldenudation via Stentretreiver reduziert den nötigen Durchmesser der verwendeten Katheter und ermöglicht so den minimalinvasiven Zugang über die *A. auricularis caudalis* mittels modifizierter Seldinger-Technik. Zwar wurde die Ohrarterie bereits in der Vergangenheit als Pforte zum Gefäßsystem punktiert, jedoch bisher nie zur Induktion peripherer Atherosklerose [130-133]. Diese Modifikationen minimieren dabei das chirurgische Trauma und verringern die mit dem Eingriff verbundenen möglichen Komplikationen, z. B. Nahtdehiszenz, signifikant, während sich die Prozedur durch eine kurze Lernkurve auszeichnet und von erfahrenem Personal leicht durchgeführt werden kann.

Die Technik bewirkt konsistente und reproduzierbare atherosklerotische Läsionen und verringert dabei Morbidität und Mortalität auf ein verschwindend geringes Minimum. Alle Tierverluste traten in der Ballongruppe auf. Dies unterstreicht die erhöhte Sicherheit und Machbarkeit des Stentretreiveransatzes. Die Stentretreivergruppe kam mit deutlich verkürzten Eingriffszeiten aus und

bot einen reibungsloseren Erholungsprozess, angezeigt durch eine bessere Aufwachqualität nach dem Eingriff und einen geringeren intraoperativen Fentanylgebrauch (-36%). Eine weitere Verbesserung für das Tierwohl zeigte sich durch bessere postinterventionelle Nahrungs- und Wasseraufnahme. Dies ist ein besonders hervorzuhebender Benefit, da es für das Wohlbefinden und die Gesundheit von Kaninchen essenziell ist, dass die Tiere keine längeren Hungerperioden erdulden müssen, weil sie aufgrund ihres Stopfmagens auf einen konstanten Futternachschub angewiesen sind. Die gastrointestinale Stase, welche eine der häufigsten Todesursachen bei Versuchskaninchen ist, ist damit als Komplikation nahezu ausgeschlossen [142, 143]. Auf die postinterventionelle Gabe von anorexigenem Buprenorphin oder anderen appetitstillenden Betäubungsmitteln kann durch diese Methode gegebenenfalls vollständig verzichtet werden [144]. Infolgedessen war auch der Gewichtsverlust, welcher bei den maximalinvasiv behandelten Tieren auffällig war, bei der Stentretreivergruppe geringer, wenngleich statistisch nicht signifikant. Die Tiere zeigten selten bis nie Anzeichen von Schmerz oder anderen postinterventionellen Komplikationen. Als OP-Wunde bleibt lediglich die Punktionsstelle zurück, welche innerhalb weniger Tage verheilt. Es ist kein spezieller, mechanischer Wundverschluss erforderlich, wie es bei Verwendung des Carotis-Zuganges der Fall ist. Sofern die Kaninchen ausreichend an den Menschen und die Handhabung gewöhnt sind, zeigen sie ebenfalls nahezu keine Anzeichen von Stress. Den minimalinvasiven Eingriff mit nur kurzen Narkosezeiten nehmen die Tiere kaum wahr.

Beide Modelle induzierten erfolgreich atherosklerotische Plaques mit identischen histologischen Merkmalen, was ein wichtiger Pluspunkt bei der Wertermittlung der neuen Methode ist. Die Effektivität des neuen Ansatzes zur Simulation menschlicher Atherosklerose wird zusätzlich durch die MR-Bildgebung, welche signifikante Lumeneinengungen in beiden Gruppen bestätigte, validiert. Zur Beurteilung der Stenosen in den *Aa. iliacae* der Kaninchen wurde die Time-of-Flight-Magnetresonanzangiographie (ToF-MRA) als am besten geeignet angesehen, da sie die Bildrekonstruktion senkrecht zur Gefäßwand ermöglicht und gleichzeitig die Notwendigkeit intravasculärer Kontrastmittel vermeidet.

Das neue Kaninchenmodell bietet erhebliches Potenzial für die reguläre Etablierung als realistisches, menschenähnliches Modell für die Atheroskleroseforschung. Durch Vermeidung übermäßiger Gefäßüberdehnungen repliziert die Methode menschliche Atherosklerose und Restenosen besser als bisherige Ansätze, was den prädiktiven Wert präklinischer Erkenntnisse erhöht. Die Reduzierung von Morbidität und Mortalität der Tiere steht im Einklang mit den Prinzipien der 3R (Replacement, Reduction, Refinement) und fördert ethischere Forschungspraktiken. Das

vereinfachte Verfahren reduziert prinzipiell technische Anforderungen und Ressourcenverbrauch, erhöht damit die Machbarkeit und erleichtert eine breitere Anwendung in Forschungseinrichtungen.

Trotz der deutlichen Vorteile der neuen Methode bleiben einige potenzielle Limitationen bestehen, die eine weitere Validierung und Optimierung erfordern. Eine zentrale Einschränkung dieser Studie besteht im Mangel an quantitativen Vergleichen der wichtigsten histopathologischen Merkmale zwischen beiden Gruppen, wenngleich die Plaquebildung bei qualitativer Betrachtung der Ergebnisse in beiden Gruppen sehr ähnlich erschien. Dies würde es ermöglichen, potenzielle Unterschiede in Bezug auf die Plaquebiologie, die Entzündung der Gefäßwand sowie den Grad und die Kinetik der neointimalen Hyperplasie fundierter zu beurteilen. Da die Histologie nicht als präzise quantitative Analyse angesehen werden kann, könnten wichtige Merkmale der Plaquebildung, wie spezifische Metaboliten in der Gefäßwand oder die Ablagerung bestimmter radiologischer Kontrastmittel, künftig mittels Massenspektrometrie-Bildgebung verglichen werden [145, 146]. Ein weiterer wichtiger Aspekt betrifft die Langzeitfolgen der Endotheldenudation, auch im Vergleich zwischen den beiden Modellen. Während sich die Lumenverengung nach Ballon-Denuation nach sechs Wochen ausgeprägter darstellte, bleibt vorerst unklar, ob dies das Ergebnis der intensiveren Verletzung war, oder ob dieser Unterschied auch über einen längeren Beobachtungszeitraum hinweg bestehen bleiben würde. Während zudem die neue Methode kurzfristig konsistente Läsionen erzeugt, könnten langfristige Effekte, wie unerwünschtes Remodeling oder die Entwicklung von Anomalien, die Übertragbarkeit auf chronische Krankheitsverläufe einschränken. Die Auswirkungen der Intervention auf vaskuläre Nebenstrukturen, wie die Adventitia und den Vasa-Vasorum-Bereich, sollten in Zukunft noch eingehend untersucht werden. Nun, da das neue Modell etabliert ist, muss es weiter in Bezug auf langfristige Unterschiede in der Gefäßwand und der Bildung von Atheromen validiert werden. Ferner sind weitere Vergleichsstudien mit anderen Ansätzen und alternativen Tiermodellen erforderlich, um die relative Effektivität und Translationstauglichkeit der Methode weiter zu untermauern. Praktische und ökonomische Aspekte, wie die Kosten und Verfügbarkeit der erforderlichen Geräte, insbesondere in kleineren Forschungseinrichtungen, könnten zudem die universelle Durchsetzung der Methode behindern. Eine adressierte Validierung in größeren Tierkohorten, ergänzt durch Langzeitstudien und eine detaillierte Analyse möglicher Komplikationen, wird die Anwendbarkeit und den translationalen Nutzen dieses vielversprechenden Ansatzes weiter stärken.

Die Etablierung dieses minimalinvasiven Modells ebnet den Weg für weitere Verfeinerungen und Anwendungen in verschiedenen Forschungskontexten: Die Methode eignet sich für jegliches Feld, welches auch die Ballonmethode bedient. Sie kann sowohl für die Grundlagen- also auch für die präklinische Forschung verwendet werden. Das Modell bietet eine geeignete Plattform zur Evaluierung interventioneller Geräte wie medikamentenfreisetzender Ballons und Stents. Zur Prüfung neuer pharmakologischer Therapieansätze, die darauf abzielen neointimale Hyperplasie und Restenosen zu reduzieren oder die Atherogenese zu bekämpfen, eignet sich die Methode ebenso. Verschiedene Ideen zur Wiederherstellung der Endothelfunktion, Reduktion der Gefäßwandentzündung und Stabilisierung ulzerationsgefährdeter Atherome werden aktuell untersucht, sind jedoch häufig auf Mäuse und Ratten beschränkt, denen typischerweise Merkmale wie lumenverengende Läsionen oder ulzerierende Plaques fehlen [147-150]. Ebenso wird beispielsweise die Entwicklung neuer Antithrombotika voraussichtlich eine kontinuierliche Herausforderung in der Gefäßmedizin darstellen, die geeignete Tiermodelle, abseits der Altmäuse, erfordert [151]. Auch neue Ansätze der Gentherapie, die zentrale Gen-Hubs ansteuern, welche entscheidende atherogene sowie atheroprotektive Signalwege regulieren, müssen umfassend in Tiermodellen untersucht werden, bevor Pilotstudien am Menschen durchgeführt werden können [152]. Des Weiteren besteht eine Eignung des neuen Modells für fortschrittliche, diagnostische Bildgebungstechniken und es ermöglicht eine detaillierte Untersuchung der Entwicklung atherosklerotischer Plaques und ihrer Reaktion auf Therapien. Moderne MRT-Techniken sind mittlerweile in der Lage, die Endothelpermeabilität mit makromolekularen Kontrastmitteln zu visualisieren, Gefäßentzündungen mit Hilfe superparamagnetischer eisenoxid-basierter Nanopartikel, welche speziell auf Monozyten oder Makrophagen abzielen, zu analysieren, oder spezifische Aspekte der neointimalen Hyperplasie mit zielgerichteten Sonden und Tracern anzugehen [153-155]. Die Entwicklung dieser neuartigen Bildgebungsstrategien erfordert eine gründliche Validierung, insbesondere auf molekularer und zellulärer Ebene. Ebenso sollten solche Bildgebungsansätze für translationale Zwecke vorzugsweise in größeren Tiermodellen entwickelt werden, die keine speziellen Ultrahochfeld-MRT-Scanner erfordern. Auch die Entwicklung und Evaluierung neuer Kontrastmittel und ihr Nutzen für die Diagnostik können von der neuen Methode profitieren. Durch weitere Verfeinerungen und Modifikationen, wie z. B. die Verwendung von WHHL oder genmodifizierten Kaninchen, eröffnet die minimalinvasive Technik zusätzliches Potenzial für zukünftige Forschungsmodelle und -themen.

Die Studie stellt erfolgreich ein neues, minimalinvasives Kaninchenmodell für die Atheroskleroseforschung vor, welches signifikante Reduktionen bei Morbidität und Mortalität erreicht und gleichzeitig die translationale Relevanz bewahrt, beziehungsweise verbessert. Die Intervention ist schnell, einfach durchzuführen und verursacht im selben Maße Endothelverletzungen, kommt jedoch ohne die massive Überdehnung aus, die bei Ballonkathetermodellen unvermeidbar ist. Dies erhöht die Vergleichbarkeit mit atherosklerotischen Veränderungen beim Menschen, da Überdehnungen bei der kurativen Behandlung zu vermeiden sind. Daraus folgend bietet dieser Ansatz ein erhebliches Potenzial zur Beschleunigung der Entwicklung wirksamer Therapien für Atherosklerose und verwandte Erkrankungen und verkörpert sowohl wissenschaftlichen als auch ethischen Fortschritt in der präklinischen Forschung.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Etablierung und Validierung eines minimalinvasiven Kaninchenmodells atherosklerotischer Erkrankungen

Für die kardiovaskuläre Forschung sind tierexperimentelle Modelle erforderlich, welche die menschliche Pathophysiologie realistisch abbilden und gleichzeitig eine hohe Reproduzierbarkeit sowie Tierwohl gewährleisten. In dieser Studie wurde ein minimalinvasives Kaninchenmodell entwickelt, bei dem die Endotheldenudation mithilfe eines Stentretreivers über die *A. auricularis caudalis* erfolgt. Dieses Verfahren wurde mit dem Standardmodell der transcarotidalen Ballondenudation an New Zealand White Kaninchen (zwei Gruppen mit je $n=10$) verglichen, wobei beide Gruppen zusätzlich unter eine Hochfettdiät gesetzt wurden, um innerhalb von sechs Wochen lumenverengende atherosklerotische Plaques zu induzieren.

Das Stentretreiver-Modell reduzierte die Eingriffszeit signifikant (31 vs. 62 min, $p < 0,001$) und senkte die perioperative Mortalität (0 % vs. 40 %, $p = 0,011$) im Vergleich zum Ballonmodell. Darüber hinaus verbesserten sich Parameter des Tierwohls, darunter ein geringerer Anästhetikaverbrauch, eine schnellere Erholung und ein besseres postoperatives Fressverhalten. Die Time-of-Flight-Magnetresonanztomographie und histologische Analysen bestätigten eine vergleichbare Lumenverengung und Plaquemorphologie in beiden Gruppen, wodurch die translationale Relevanz der Stentretreiver-Technik unterstrichen wird, während die übermäßige Gefäßüberdehnung, wie sie beim Einsatz eines Ballonkatheters auftritt, vermieden wird.

Dieses minimalinvasive Modell bietet eine robuste Plattform zur Erforschung von Gefäßbiologie, pharmakologischen Interventionen und zur Entwicklung neuer angioplastischer Geräte. Durch die hohe Reproduzierbarkeit in Kombination mit verbessertem Tierwohl stellt es ein ethisches und effektives Instrument zur Weiterentwicklung der Atheroskleroseforschung dar.

VI. SUMMARY

Establishment and validation of a minimally invasive rabbit model for atherosclerotic diseases

Cardiovascular research requires translational animal models that mimic human pathophysiology while maintaining high reproducibility and animal welfare standards. In this study, we developed a minimally invasive rabbit model using stent-retriever-mediated endothelial denudation via the auricular artery. This approach was compared to the conventional transcarotid balloon injury model in New Zealand White rabbits (two groups with $n=10$ each), combined with a high-fat diet to induce neointimal hyperplasia and lumen-narrowing atherosclerosis within six weeks.

The stent-retriever model significantly reduced procedural time (31 vs. 62 min, $p < 0.001$) and perioperative mortality (0 % vs. 40 %, $p = 0.011$) compared to the balloon model. Moreover, it improved animal welfare metrics, including reduced anesthetic use, faster recovery, and better post-procedural feeding behavior. Time-of-flight magnetic resonance imaging and histological analysis confirmed comparable lumen-narrowing and plaque morphology between both models, highlighting the translational relevance of the stent-retriever technique without the excessive vascular overstretching associated with the balloon intervention.

This minimally invasive model offers a solid platform for investigating vascular biology, pharmacological interventions, and the development of novel angioplasty devices. Its reproducibility combined with improved animal welfare positions it as an ethical and effective tool for advancing atherosclerosis research.

VII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. Auswirkungen von Scherstress

Zhou, M., et al., *Wall shear stress and its role in atherosclerosis*. Front Cardiovasc Med, 2023. **10**: p. 1083547.

Abbildung 2. Entwicklung atherosklerotischer Plaques

Borén, J. and K.J. Williams, *The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity*. Curr Opin Lipidol, 2016. **27**(5): p. 473-83.

Abbildung 3. Ablauf der Neointimabildung

Ebert, M.L.A., et al., *Animal Models of Neointimal Hyperplasia and Restenosis: Species-Specific Differences and Implications for Translational Research*. JACC Basic Transl Sci, 2021. **6**(11): p. 900-917.

Abbildung 4. Endotheldenudation beim Kaninchen

Ebert, M.L.A., et al., *Animal Models of Neointimal Hyperplasia and Restenosis: Species-Specific Differences and Implications for Translational Research*. JACC Basic Transl Sci, 2021. **6**(11): p. 900-917.

VIII. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1. Gegenüberstellung verschiedener Tierarten

Ebert, M.L.A., et al., *Animal Models of Neointimal Hyperplasia and Restenosis: Species-Specific Differences and Implications for Translational Research*. JACC Basic Transl Sci, 2021. **6**(11): p. 900-917.

Tabelle 2. Lipid-metabolischer Vergleich Kaninchen, Mensch, Maus

Fan, J., et al., *Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine*. Pharmacology & therapeutics, 2015. **146**: p. 104-119.

IX. REFERENZEN

1. *Decline in deaths from heart disease and stroke--United States, 1900-1999*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1999. **48**(30): p. 649-56.
2. *WHO - Cardiovascular Diseases*. 2021 05/2024]; Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
3. Vaduganathan, M., et al., *The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk*. Journal of the American College of Cardiology, 2022. **80**(25): p. 2361-2371.
4. Rafieian-Kopaei, M., et al., *Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes*. Int J Prev Med, 2014. **5**(8): p. 927-46.
5. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
6. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. Circulation, 2002. **105**(9): p. 1135-43.
7. Otsuka, F., et al., *Neoatherosclerosis: overview of histopathologic findings and implications for intravascular imaging assessment*. European heart journal, 2015. **36**(32): p. 2147-2159.
8. Ahanchi, S.S., N.D. Tsihlis, and M.R. Kibbe, *The role of nitric oxide in the pathophysiology of intimal hyperplasia*. Journal of vascular surgery, 2007. **45**(6): p. A64-A73.
9. Kaltenbach, M., et al., *Recurrence rate after successful coronary angioplasty*. Eur Heart J, 1985. **6**(3): p. 276-81.
10. von Scheidt, M., et al., *Applications and Limitations of Mouse Models for Understanding Human Atherosclerosis*. Cell Metab, 2017. **25**(2): p. 248-261.
11. Bocan, T.M., et al., *The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation*. Atherosclerosis, 1993. **102**(1): p. 9-22.
12. Kipshidze, N., et al., *Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(4): p. 733-9.
13. Park, S.J., et al., *In-stent neoatherosclerosis: a final common pathway of late stent failure*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(23): p. 2051-7.
14. Aikawa, M., et al., *Rabbit Models of Atherosclerosis*, in *Vascular Disease and Injury: Preclinical Research*, D.I. Simon and C. Rogers, Editors. 2001, Humana Press: Totowa, NJ. p. 175-191.
15. *American Heart Association - What is Atherosclerosis?* 2024 06/2024]; Available from: <https://www.heart.org/en/health-topics/cholesterol/about-cholesterol/atherosclerosis>.
16. Hajar, R., *Risk Factors for Coronary Artery Disease: Historical Perspectives*. Heart Views, 2017. **18**(3): p. 109-114.
17. Malek, A.M., S.L. Alper, and S. Izumo, *Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis*. Jama, 1999. **282**(21): p. 2035-42.
18. Timmins, L.H., et al., *Oscillatory wall shear stress is a dominant flow characteristic affecting lesion progression patterns and plaque vulnerability in patients with coronary artery disease*. J R Soc Interface, 2017. **14**(127).
19. Peiffer, V., S.J. Sherwin, and P.D. Weinberg, *Does low and oscillatory wall shear stress correlate spatially with early atherosclerosis? A systematic review*. Cardiovasc Res, 2013. **99**(2): p. 242-50.
20. Stefanadis, C., et al., *Coronary Atherosclerotic Vulnerable Plaque: Current Perspectives*. J Am Heart Assoc, 2017. **6**(3).

21. de Weert, T.T., et al., *Atherosclerotic plaque surface morphology in the carotid bifurcation assessed with multidetector computed tomography angiography*. Stroke, 2009. **40**(4): p. 1334-40.
22. Zhou, M., et al., *Wall shear stress and its role in atherosclerosis*. Front Cardiovasc Med, 2023. **10**: p. 1083547.
23. Peng, Z., et al., *Endothelial Response to Pathophysiological Stress*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019. **39**(11): p. e233-e243.
24. Souilhol, C., et al., *Endothelial responses to shear stress in atherosclerosis: a novel role for developmental genes*. Nat Rev Cardiol, 2020. **17**(1): p. 52-63.
25. Mahmoudi, M., et al., *The Story of Wall Shear Stress in Coronary Artery Atherosclerosis: Biochemical Transport and Mechanotransduction*. J Biomech Eng, 2021. **143**(4).
26. Baratchi, S., et al., *Molecular Sensors of Blood Flow in Endothelial Cells*. Trends Mol Med, 2017. **23**(9): p. 850-868.
27. Rath, G., C. Dessy, and O. Feron, *Caveolae, caveolin and control of vascular tone: nitric oxide (NO) and endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF) regulation*. J Physiol Pharmacol, 2009. **60 Suppl 4**: p. 105-9.
28. Tarbell, J., et al., *The role of oxygen transport in atherosclerosis and vascular disease*. J R Soc Interface, 2020. **17**(165): p. 20190732.
29. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance*. Circulation, 2007. **115**(10): p. 1285-95.
30. Mussbacher, M., et al., *More than Just a Monolayer: the Multifaceted Role of Endothelial Cells in the Pathophysiology of Atherosclerosis*. Curr Atheroscler Rep, 2022. **24**(6): p. 483-492.
31. Michiels, C., *Endothelial cell functions*. J Cell Physiol, 2003. **196**(3): p. 430-43.
32. Singh, I., et al., *Galphag-TRPC6-mediated Ca²⁺ entry induces RhoA activation and resultant endothelial cell shape change in response to thrombin*. J Biol Chem, 2007. **282**(11): p. 7833-43.
33. Mehta, D., et al., *RhoA interaction with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and transient receptor potential channel-1 regulates Ca²⁺ entry. Role in signaling increased endothelial permeability*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 33492-500.
34. Sundivakkam, P.C., et al., *Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) induced by protease-activated receptor-1 mediates STIM1 protein phosphorylation to inhibit SOCE in endothelial cells through AMP-activated protein kinase and p38 β mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2013. **288**(23): p. 17030-17041.
35. Mehta, D. and A.B. Malik, *Signaling mechanisms regulating endothelial permeability*. Physiol Rev, 2006. **86**(1): p. 279-367.
36. Zhang, X., et al., *Endothelial cell dysfunction and glycocalyx - A vicious circle*. Matrix Biol, 2018. **71-72**: p. 421-431.
37. Colombelli, J., et al., *Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 10): p. 1665-79.
38. Wang, S., et al., *Endothelial cation channel PIEZO1 controls blood pressure by mediating flow-induced ATP release*. J Clin Invest, 2016. **126**(12): p. 4527-4536.
39. Fernández-Hernando, C., et al., *Genetic evidence supporting a critical role of endothelial caveolin-1 during the progression of atherosclerosis*. Cell Metab, 2009. **10**(1): p. 48-54.
40. Armstrong, S.M., et al., *A novel assay uncovers an unexpected role for SR-BI in LDL transcytosis*. Cardiovasc Res, 2015. **108**(2): p. 268-77.
41. Wakasugi, R., K. Suzuki, and T. Kaneko-Kawano, *Molecular Mechanisms Regulating Vascular Endothelial Permeability*. International Journal of Molecular Sciences, 2024. **25**(12): p. 6415.

42. Claesson-Welsh, L., E. Dejana, and D.M. McDonald, *Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies*. Trends Mol Med, 2021. **27**(4): p. 314-331.
43. Linton, M.F., et al., *The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000, MDText.com, Inc. Copyright © 2000-2024, MDText.com, Inc.: South Dartmouth (MA).
44. Borén, J. and K.J. Williams, *The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity*. Curr Opin Lipidol, 2016. **27**(5): p. 473-83.
45. Gaggini, M., F. Gorini, and C. Vassalle, *Lipids in Atherosclerosis: Pathophysiology and the Role of Calculated Lipid Indices in Assessing Cardiovascular Risk in Patients with Hyperlipidemia*. Int J Mol Sci, 2022. **24**(1).
46. Okajima, F., K. Sato, and T. Kimura, *Anti-atherogenic actions of high-density lipoprotein through sphingosine 1-phosphate receptors and scavenger receptor class B type I*. Endocr J, 2009. **56**(3): p. 317-34.
47. Xia, Z., et al., *Integrated DNA methylation and gene expression analysis identifies SLAMF7 as a key regulator of atherosclerosis*. Aging (Albany NY), 2018. **10**(6): p. 1324-1337.
48. Galkina, E. and K. Ley, *Vascular adhesion molecules in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2292-301.
49. Kaperonis, E.A., et al., *Inflammation and atherosclerosis*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2006. **31**(4): p. 386-93.
50. Zhou, X. and G. Hansson, *Detection of B cells and proinflammatory cytokines in atherosclerotic plaques of hypercholesterolaemic apolipoprotein E knockout mice*. Scandinavian journal of immunology, 1999. **50**(1): p. 25-30.
51. Fræk, W., et al., *Pathophysiology of Cardiovascular Diseases: New Insights into Molecular Mechanisms of Atherosclerosis, Arterial Hypertension, and Coronary Artery Disease*. Biomedicines, 2022. **10**(8).
52. Torzewski, M. and K.J. Lackner, *Initiation and progression of atherosclerosis--enzymatic or oxidative modification of low-density lipoprotein?* Clin Chem Lab Med, 2006. **44**(12): p. 1389-94.
53. Moore, K.J. and M.W. Freeman, *Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(8): p. 1702-11.
54. Brown, M.S., et al., *Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins*. J Cell Biol, 1979. **82**(3): p. 597-613.
55. Malekmohammad, K., E.E. Bezsonov, and M. Rafieian-Kopaei, *Role of Lipid Accumulation and Inflammation in Atherosclerosis: Focus on Molecular and Cellular Mechanisms*. Front Cardiovasc Med, 2021. **8**: p. 707529.
56. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis*. Annu Rev Biochem, 1983. **52**: p. 223-61.
57. Yang, Y., et al., *Macrophage-derived foam cells impair endothelial barrier function by inducing endothelial-mesenchymal transition via CCL-4*. International journal of molecular medicine, 2017. **40**(2): p. 558-568.
58. Gonzalez, L. and B.L. Trigatti, *Macrophage Apoptosis and Necrotic Core Development in Atherosclerosis: A Rapidly Advancing Field with Clinical Relevance to Imaging and Therapy*. Can J Cardiol, 2017. **33**(3): p. 303-312.
59. Puylaert, P., et al., *Regulated Necrosis in Atherosclerosis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2022. **42**(11): p. 1283-1306.
60. Thorp, E. and I. Tabas, *Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(5): p. 1089-95.

61. Abdolmaleki, F., et al., *Atherosclerosis and immunity: A perspective*. Trends Cardiovasc Med, 2019. **29**(6): p. 363-371.
62. Millette, E., et al., *Platelet-derived growth factor-BB transactivates the fibroblast growth factor receptor to induce proliferation in human smooth muscle cells*. Trends Cardiovasc Med, 2006. **16**(1): p. 25-8.
63. Maiolino, G., et al., *The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: the myths and the facts*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 714653.
64. Gray, W.A. and J.F. Granada, *Drug-coated balloons for the prevention of vascular restenosis*. Circulation, 2010. **121**(24): p. 2672-2680.
65. van Beusekom, H.M., et al., *Long-term endothelial dysfunction is more pronounced after stenting than after balloon angioplasty in porcine coronary arteries*. Journal of the American College of Cardiology, 1998. **32**(4): p. 1109-1117.
66. Wang, G., et al., *A Novel Rabbit Model for In-Stent Neoatherosclerosis Insights from Optical Coherence Tomography*. International heart journal, 2019. **60**(5): p. 1154-1160.
67. Rozenman, Y., et al., *Clinical and angiographic predictors of immediate recoil after successful coronary angioplasty and relation to late restenosis*. The American journal of cardiology, 1993. **72**(14): p. 1020-1025.
68. Bermejo, J., et al., *Mechanisms of residual lumen stenosis after high-pressure stent implantation: a quantitative coronary angiography and intravascular ultrasound study*. Circulation, 1998. **98**(2): p. 112-118.
69. Losordo, D.W., et al., *Focal compensatory enlargement of human arteries in response to progressive atherosclerosis. In vivo documentation using intravascular ultrasound*. Circulation, 1994. **89**(6): p. 2570-7.
70. Melo, L.G., et al., *Vascular remodeling in health and disease*, in *Cardiovascular Medicine*. 2007, Springer. p. 1541-1565.
71. Pasterkamp, G., et al., *Paradoxical arterial wall shrinkage may contribute to luminal narrowing of human atherosclerotic femoral arteries*. Circulation, 1995. **91**(5): p. 1444-9.
72. Bonatti, J., et al. *Neointimal Hyperplasia in Coronary Vein Grafts: Pathophysiology and Prevention of a Significant Clinical Problem*. in *The heart surgery forum*. 2004.
73. Shoji, M., S. Koba, and Y. Kobayashi, *Roles of bone-marrow-derived cells and inflammatory cytokines in neointimal hyperplasia after vascular injury*. BioMed research international, 2014. **2014**.
74. Chen, N.X., et al., *Decreased microRNA is involved in the vascular remodeling abnormalities in chronic kidney disease (CKD)*. PloS one, 2013. **8**(5): p. e64558.
75. Le Menn, R., L. Bara, and M. Samama, *Ultrastructure of a model of thrombogenesis induced by mechanical injury*. Journal of submicroscopic cytology, 1981. **13**(4): p. 537-549.
76. Gitel, S.N. and S. Wessler, *Dose-dependent antithrombotic effect of warfarin in rabbits*. 1983.
77. Blann, A.D., *Assessment of endothelial dysfunction: focus on atherothrombotic disease*. Pathophysiology of haemostasis and thrombosis, 2003. **33**(5-6): p. 256-261.
78. Davenport, A.P., et al., *Endothelin*. Pharmacological reviews, 2016. **68**(2): p. 357-418.
79. Wang, X. and R.A. Khalil, *Matrix metalloproteinases, vascular remodeling, and vascular disease*. Advances in pharmacology, 2018. **81**: p. 241-330.
80. Kim, H.R., et al., *Cytoskeletal remodeling in differentiated vascular smooth muscle is actin isoform dependent and stimulus dependent*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2008. **295**(3): p. C768-C778.
81. Giblin, S.P. and K.S. Midwood, *Tenascin-C: form versus function*. Cell adhesion & migration, 2015. **9**(1-2): p. 48-82.

82. Gerhardt, T. and K. Ley, *Monocyte trafficking across the vessel wall*. Cardiovascular research, 2015. **107**(3): p. 321-330.
83. Sales, V.L., et al., *Transforming growth factor- β 1 modulates extracellular matrix production, proliferation, and apoptosis of endothelial progenitor cells in tissue-engineering scaffolds*. Circulation, 2006. **114**(1_supplement): p. I-193-I-199.
84. Li, D.-J., et al., *Cholinergic anti-inflammatory pathway inhibits neointimal hyperplasia by suppressing inflammation and oxidative stress*. Redox biology, 2018. **15**: p. 22-33.
85. Chen, P.-Y., et al., *Fibroblast growth factor (FGF) signaling regulates transforming growth factor beta (TGF β)-dependent smooth muscle cell phenotype modulation*. Scientific reports, 2016. **6**(1): p. 1-11.
86. Ebert, M.L.A., et al., *Animal Models of Neointimal Hyperplasia and Restenosis: Species-Specific Differences and Implications for Translational Research*. JACC Basic Transl Sci, 2021. **6**(11): p. 900-917.
87. Gomez, D. and G.K. Owens, *Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis*. Cardiovascular research, 2012. **95**(2): p. 156-164.
88. Gerthoffer, W.T., *Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration*. Circulation research, 2007. **100**(5): p. 607-621.
89. Durham, A.L., et al., *Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness*. Cardiovascular research, 2018. **114**(4): p. 590-600.
90. Zhu, S.-B., et al., *TGF- β 1 induces human aortic vascular smooth muscle cell phenotype switch through PI3K/AKT/ID2 signaling*. American journal of translational research, 2015. **7**(12): p. 2764.
91. Bennett, M.R., S. Sinha, and G.K. Owens, *Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis*. Circulation research, 2016. **118**(4): p. 692-702.
92. Komiyama, H., et al., *Neoatherosclerosis: Coronary stents seal atherosclerotic lesions but result in making a new problem of atherosclerosis*. World journal of cardiology, 2015. **7**(11): p. 776.
93. Kufner, S., et al., *In-Stent-Neoatherosklerose nach perkutaner Koronarintervention*. CardioVasc, 2014. **14**(2): p. 46-50.
94. Wun, K., et al., *Microbiota control acute arterial inflammation and neointimal hyperplasia development after arterial injury*. PloS one, 2018. **13**(12): p. e0208426.
95. Ma, J. and H. Li, *The role of gut microbiota in atherosclerosis and hypertension*. Frontiers in pharmacology, 2018. **9**: p. 1082.
96. Chen, E.B., et al., *Microbial Colonization of Germ-Free Mice Restores Neointimal Hyperplasia Development After Arterial Injury*. Journal of the American Heart Association, 2020. **9**(5): p. e013496.
97. Pourjabbar, A., et al., *Pathogenesis of neointima formation following vascular injury*. Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders), 2011. **11**(1): p. 30-39.
98. Moulton, K.S., et al., *Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(8): p. 4736-4741.
99. Gordon, S.M., et al., *A comparison of the mouse and human lipoproteome: suitability of the mouse model for studies of human lipoproteins*. Journal of proteome research, 2015. **14**(6): p. 2686-2695.
100. Russell, J.C. and S.D. Proctor, *Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis*. Cardiovascular pathology, 2006. **15**(6): p. 318-330.
101. Zhao, Y., et al., *Small rodent models of atherosclerosis*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020. **129**: p. 110426.

102. Ding, Y., et al., *Functional and association studies of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene in a Wannan Black pig model*. Animal genetics, 2015. **46**(6): p. 702-706.
103. Al-Mashhadi, R.H., et al., *Familial hypercholesterolemia and atherosclerosis in cloned minipigs created by DNA transposition of a human PCSK9 gain-of-function mutant*. Science translational medicine, 2013. **5**(166): p. 166ra1-166ra1.
104. Prescott, M.F., et al., *Development of complex atherosclerotic lesions in pigs with inherited hyper-LDL cholesterol bearing mutant alleles for apolipoprotein B*. The American journal of pathology, 1991. **139**(1): p. 139.
105. Kopp, W., *How Western Diet And Lifestyle Drive The Pandemic Of Obesity And Civilization Diseases*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2019. **12**: p. 2221-2236.
106. Rai, S., D.L. Hare, and A. Zulli, *A physiologically relevant atherogenic diet causes severe endothelial dysfunction within 4 weeks in rabbit*. Int J Exp Pathol, 2009. **90**(6): p. 598-604.
107. Hobbs, H.H., et al., *The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein*. Annual review of genetics, 1990. **24**(1): p. 133-170.
108. Ratcliffe, H. and H. Luginbühl, *The domestic pig: a model for experimental atherosclerosis*. Atherosclerosis, 1971. **13**(1): p. 133-136.
109. Fingerle, J., et al., *Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989. **86**(21): p. 8412-8416.
110. Kumar, A. and V. Lindner, *Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1997. **17**(10): p. 2238-2244.
111. Peterson, S.M., L. Liaw, and V. Lindner, *Ligation of the mouse common carotid artery*, in *Mouse models of vascular diseases*. 2016, Springer. p. 43-68.
112. Kubota, T. and N. Kubota, *Cuff-Induced Neointimal Formation in Mouse Models*. Mouse Models of Vascular Diseases, 2016: p. 21-41.
113. Curaj, A., et al., *Induction of Accelerated Atherosclerosis in Mice: The "Wire-Injury" Model*. J Vis Exp, 2020(162).
114. Cooley, B.C., *Murine Models of Vein Grafting*, in *Mouse Models of Vascular Diseases*. 2016, Springer. p. 143-155.
115. Indolfi, C., et al., *Smooth muscle cell proliferation is proportional to the degree of balloon injury in a rat model of angioplasty*. Circulation, 1995. **92**(5): p. 1230-1235.
116. Tall, A.R., *Plasma cholesteryl ester transfer protein*. Journal of lipid research, 1993. **34**(8): p. 1255-1274.
117. Fan, J., et al., *Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine*. Pharmacology & therapeutics, 2015. **146**: p. 104-119.
118. Takahashi, S., et al., *Species differences of macrophage very low-density-lipoprotein (VLDL) receptor protein expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **407**(4): p. 656-62.
119. Yamamoto, A., *Three obstacles which confronted the development of compactin*. Atherosclerosis, 2004. **5**(3): p. 21.
120. Baumgartner, C., et al., *Rabbit models to study atherosclerosis and its complications—transgenic vascular protein expression in vivo*. Progress in biophysics and molecular biology, 2016. **121**(2): p. 131-141.
121. Fan, J. and T. Watanabe, *Cholesterol-fed and transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis*. Journal of atherosclerosis and thrombosis, 2000. **7**(1): p. 26-32.
122. Fan, J., et al., *Transgenic rabbits expressing human apolipoprotein(a) develop more extensive atherosclerotic lesions in response to a cholesterol-rich diet*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(1): p. 88-94.

123. Warren, R.J., et al., *Rabbit hepatic lipase cDNA sequence: low activity is associated with low messenger RNA levels*. Journal of lipid research, 1991. **32**(8): p. 1333-1339.
124. Wang, Y., et al., *Human apolipoprotein A-II protects against diet-induced atherosclerosis in transgenic rabbits*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2013. **33**(2): p. 224-231.
125. Watanabe, T., et al., *Role of macrophages in atherosclerosis. Sequential observations of cholesterol-induced rabbit aortic lesion by the immunoperoxidase technique using monoclonal antimacrophage antibody*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1985. **53**(1): p. 80-90.
126. Hila, E., et al., *Predicting in vivo efficacy of potential restenosis therapies by cell culture studies: Species-dependent susceptibility of vascular smooth muscle cells*. The open cardiovascular medicine journal, 2008. **2**: p. 60.
127. Sims, F.H., *A comparison of structural features of the walls of coronary arteries from 10 different species*. Pathology, 1989. **21**(2): p. 115-124.
128. Niimi, M., et al., *ApoE knockout rabbits: a novel model for the study of human hyperlipidemia*. Atherosclerosis, 2016. **245**: p. 187-193.
129. Jain, M., et al., *The rabbit model of accelerated atherosclerosis: A methodological perspective of the iliac artery balloon injury*. Journal of visualized experiments: JoVE, 2017(128).
130. Karnabatidis, D., et al., *Transauricular arterial or venous access for cardiovascular experimental protocols in animals*. Journal of vascular and interventional radiology, 2006. **17**(11): p. 1803-1811.
131. Tsigkas, G., et al., *A minimally invasive endovascular rabbit model for experimental induction of progressive myocardial hypertrophy*. Hypertens Res, 2016. **39**(12): p. 840-847.
132. Koninari, I., et al., *Transauricular balloon angioplasty in rabbit thoracic aorta: a novel model of experimental restenosis*. Lipids Health Dis, 2014. **13**: p. 33.
133. Gökten, M., et al., *In vivo study of the utility of selective intra-arterial injection of thiopental for neuroprotection in reversible cerebral ischemia*. Acta Radiol, 2024. **65**(1): p. 115-122.
134. Mori, H., et al., *Endothelial Barrier Protein Expression in Biodegradable Polymer Sirolimus-Eluting Versus Durable Polymer Everolimus-Eluting Metallic Stents*. JACC Cardiovasc Interv, 2017. **10**(23): p. 2375-2387.
135. Hyafil, F., et al., *Imaging the Cytokine Receptor CXCR4 in Atherosclerotic Plaques with the Radiotracer (68)Ga-Pentixafor for PET*. J Nucl Med, 2017. **58**(3): p. 499-506.
136. Phinikaridou, A., et al., *Vascular remodeling and plaque vulnerability in a rabbit model of atherosclerosis: comparison of delayed-enhancement MR imaging with an elastin-specific contrast agent and unenhanced black-blood MR imaging*. Radiology, 2014. **271**(2): p. 390-9.
137. Malle, C., et al., *Tissue Characterization After Drug-Eluting Stent Implantation Using Optical Coherence Tomography*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2013. **33**(6): p. 1376-1383.
138. Nicol, P., et al., *Assessment of a pro-healing stent in an animal model of early neoatherosclerosis*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 8227.
139. Gasser, T.C. and G.A. Holzapfel, *Finite Element Modeling of Balloon Angioplasty by Considering Overstretch of Remnant Non-diseased Tissues in Lesions*. Computational Mechanics, 2007. **40**(1): p. 47-60.
140. Pierre, K., et al., *Updates in mechanical thrombectomy*. Exploration of Neuroscience, 2022. **1**(2): p. 83-99.

141. Koppa, T., et al., *Thrombogenicity and Early Vascular Healing Response in Metallic Biodegradable Polymer-Based and Fully Bioabsorbable Drug-Eluting Stents*. Circulation: Cardiovascular Interventions, 2015. **8**(6): p. e002427.
142. Mapara, M., B.S. Thomas, and K.M. Bhat, *Rabbit as an animal model for experimental research*. Dent Res J (Isfahan), 2012. **9**(1): p. 111-8.
143. Reusch, B., *Rabbit gastroenterology*. Vet Clin North Am Exot Anim Pract, 2005. **8**(2): p. 351-75.
144. Hsi, Z.Y., et al., *Effects of Buprenorphine and Carprofen on Appetite in New Zealand White Rabbits (Oryctolagus cuniculus)*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2022. **61**(6): p. 672-677.
145. Aichler, M., et al., *Spatially Resolved Quantification of Gadolinium(III)-Based Magnetic Resonance Agents in Tissue by MALDI Imaging Mass Spectrometry after In Vivo MRI*. Angewandte Chemie International Edition, 2015. **54**(14): p. 4279-4283.
146. Lohöfer, F., et al., *Mass Spectrometry Imaging of atherosclerosis-affine Gadofluorine following Magnetic Resonance Imaging*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 79.
147. Zhang, X., et al., *Pioglitazone combined with atorvastatin promotes plaque stabilization in a rabbit model*. Vascular, 2022. **30**(6): p. 1205-1212.
148. Taylor, E.N., et al., *Lipid and smooth muscle architectural pathology in the rabbit atherosclerotic vessel wall using Q-space cardiovascular magnetic resonance*. Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance, 2022. **24**(1): p. 74.
149. Tissier, F., et al., *A non-hypocholesterolemic atorvastatin treatment improves vessel elasticity by acting on elastin composition in WHHL rabbits*. Atherosclerosis, 2016. **251**: p. 70-77.
150. Jiao, J., et al., *Translocator Protein 18 kDa Tracer 18F-FDPA PET/CTA Imaging for the Evaluation of Inflammation in Vulnerable Plaques*. Molecular Pharmaceutics, 2024. **21**(7): p. 3623-3633.
151. Nakamura, N., et al., *Poor Below Knee Runoff Impacts Femoropopliteal Stent Failure and Fluoropolymer Antithrombotic Effect in Healthy Swine Model*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2023. **66**(5): p. 722-729.
152. Brennan, P.G., et al., *Advancements in Omics and Breakthrough Gene Therapies: A Glimpse into the Future of Peripheral Artery Disease*. Annals of Vascular Surgery, 2024. **107**: p. 229-246.
153. Baker, J.H.E., et al., *Multi-modal magnetic resonance imaging and histology of vascular function in xenografts using macromolecular contrast agent hyperbranched polyglycerol (HPG-GdF)*. Contrast Media & Molecular Imaging, 2016. **11**(1): p. 77-88.
154. Evans, R.J., et al., *Targeted Molecular Iron Oxide Contrast Agents for Imaging Atherosclerotic Plaque*. Nanotheranostics, 2020. **4**(4): p. 184-194.
155. Xia, M., et al., *The possibility of visualizing TGF- β 1 expression in ApoE $^{-/-}$ mice atherosclerosis using MR targeted imaging*. Acta Radiologica, 2024. **65**(1): p. 99-105.
156. Erhardt W, H.J., Haberstroh J, Baumgartner C, Tacke S, *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier*. 2011: Schattauer GmbH.

Blutentnahmen ohne Narkose:

Datum	Anlass (z.B. Kontrolle)	Ergebnis/Bemerkung	Kürzel

Euthanasie:

Datum:

Gewicht:

Dauer der Anästhesie:

von:

bis:

Bemerkungen:

Probennahme:

Datum der Probennahme:

Verwendung (z.B. Histologie):

Tage nach Fütterungsbeginn:

Tage nach OP1:

Tage nach OP2:

Bemerkungen:

Bildgebung:

Narkoseprotokoll (modifiziert nach Dr. Schwarz, Hollabrunn [A] 2011)

aus Erhardt et al., Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier, 2. Auflage, 2011. [156].

(Mit freundlicher Genehmigung des Thieme Verlages und des Urhebers)

Anästhesieprotokoll	Patientenname:									Anästhesiebeginn:								
Zeit (min)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150		
Ort																		
OP Beginn:																		
OP Ende:																		
Atmung (S,M,V)																		
Tidalvolumen																		
Atemfrequenz																		
Isofluran																		
Sauerstoffsättigung																		
CO ₂																		
SH-Farbe																		
Herzfrequenz																		
Pulsqualität																		
Blutdruck																		
Körpertemperatur																		
Infusion 1 (Art, Menge)																		
Infusion 2 (Art, Menge)																		
Infusion 3 (Art, Menge)																		
Medikamente																		
Besonderheiten																		

Anästhesieprotokoll	
ID:	Diagnose
Halter:	Operation
Tier:	Anästhesist
Gewicht	ASA-Einteilung
Präanästhetische Untersuchung	
Besonderheiten/Medikamente präop.:	
Prämedikation (Medikament, Dosis, Zeit):	
Spezielle Maßnahmen (z. B. Labor, MHS, Krallen):	
Einleitung (Medikamente, Dosis, Zeit):	
Geplante Erhaltung: Isofluran: Propofol: Infusion: _____ ml/h Fentanyl: _____ ml/h NSAID: _____ ml Antibiotikum: _____ ml Sonstiges: _____ ml	
Venöser Zugang:	
Wärme (Art, Menge):	
Aufwachphase Narkoseende um: _____ Extubiert um: _____ Sternallage um: _____ Kommentar/Medikamente:	
Geplante Analgesie postop.:	

DANKSAGUNG

An erster Stelle gilt meine Dankbarkeit meinem ehemaligen Chef und Mentor Herrn Prof. Dr. Moritz Wildgruber, welcher mich für dieses Projekt ausgewählt hat und mir vom ersten Tag an in jeglichen Belangen seine uneingeschränkte Unterstützung zukommen ließ. Vielen Dank für den Respekt und die Offenheit gegenüber Anregungen, Kritik und neuen Ideen, die produktiven Brainstormings und rundum großartige Zusammenarbeit, welche stets auf Augenhöhe stattfand und zu jederzeit motivierend und positiv war.

Herzlichsten Dank auch an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Göbel, welcher mich ohne Zögern als externen Doktoranden akzeptiert hat und zu jeder Zeit für sämtliche Fragen und Hilfesuche ein offenes Ohr hatte.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Anne von Thaden bedanken, welche eine großartige Lehrerin war, mit mir ihre Erfahrung und ihr Wissen teilte und mich dabei mit größter Freundlichkeit und Professionalität anleitete. Außerdem stand sie mir und dem gesamten Team stets mit Rat und Tat zur Seite und war uns sowohl persönlich als auch fachlich eine enorme Bereicherung.

Des Weiteren gilt mein ausdrücklicher Dank Frau Dr. Melanie Kimm, welche unermüdlich in sämtlichen fachlichen und organisatorischen Belangen ihre große Kompetenz zur Verfügung stellte.

Herrn Dr. Osman Öcal möchte ich ebenfalls dankbar als unersetzlichen Ideengeber und höchst fähigen Kollegen hervorheben, dessen Kreativität, Erfahrung und Fertigkeiten uns eine unbeschreibliche Hilfe waren.

Mein besonderer Dank gebührt zudem den Kollegen aus Münster, Frau Prof. Dr. Astrid Jeibmann und ihrem Team sowie Herrn Peter Niehaus und Herrn Prof. Dr. Uwe Karst, welche uns sowohl beratend als auch tatkräftigst unterstützt haben und ohne die dieses Projekt wohl deutlich komplizierter geworden wäre.

Außerdem ein großes Dankeschön dem fleißigen Team der CAM, welche sich mit größter Sorgfalt um unsere Kaninchen gekümmert, uns mit Rat und Tat unterstützt und uns fast jeden Sonderwunsch ermöglicht haben.

Vielen Dank an meine lieben Kolleginnen aus dem Labor, die mich so freundlich aufgenommen, immer mit einem Lächeln begrüßt und nie eine Hilfestellung verweigert haben.

Zuletzt gilt meine tiefste Dankbarkeit meiner Mutter, welche es nach wie vor nicht immer einfach mit mir hat, aber dennoch nie müde wird an mich zu glauben und mich zu unterstützen.