

Aus dem Veterinär-Anatomischen Institut  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig  
und  
aus der Klinik für Neuroradiologie  
des Universitätsklinikums Freiburg

**Großtiermodelle in der neurointerventionellen Forschung:  
systematische Methodenübersicht und Anwendungsbeispiel**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Andrea Maria Herrmann  
aus Freiburg im Breisgau

Leipzig, 2021

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Christoph Mülling  
Prof. Dr. Dr. Johannes Boltze

Gutachter: Prof. Dr. Christoph Mülling, Veterinär-Anatomisches Institut,  
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig  
Prof. Dr. Dr. Johannes Boltze, School of Life Sciences, University of  
Warwick  
Prof. Dr. Eberhard Ludewig, Abteilung für Bildgebende Diagnostik,  
Veterinärmedizinische Universität Wien

Tag der Verteidigung: 27.04.2021

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht.....</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Schlaganfall</i> .....	3
2.1.1    Pathophysiologische Mechanismen.....	4
2.1.1.1    Exzitotoxizität.....	4
2.1.1.2    Peri-Infarkt Depolarisationen.....	6
2.1.1.3    Entzündung.....	7
2.1.1.4    Apoptose.....	8
2.1.2    Therapeutische Angriffspunkte.....	8
2.1.2.1    Rekanalisation.....	8
2.1.2.2    Neuroprotektion.....	10
2.2 <i>Hypothermie</i> .....	11
2.2.1    Anwendung der Hypothermie.....	11
2.2.1.1    Globale Hypothermie.....	12
2.2.1.2    Selektive Hypothermie.....	12
2.2.1.3    Kühlkathetersystem.....	13
2.2.2    Wirkung beim Schlaganfall.....	14
2.3 <i>Tiermodelle</i> .....	15
2.3.1    Schafmodell.....	16
2.3.1.1    Blutversorgung des ovinen Gehirns.....	17
2.4 <i>Fragestellung</i> .....	18
<b>3 Kumulativer Teil der Dissertation.....</b>	<b>20</b>
3.1 <i>Large animals in neurointerventional research: a systematic review on models, techniques and their application in endovascular procedures for stroke, aneurysms and vascular malformations</i> .....	20
3.2 <i>Darstellung der Eigenleistung</i> .....	41
3.3 <i>Development of a routinely applicable imaging protocol for fast and precise middle cerebral artery occlusion assessment and perfusion deficit measure in an ovine stroke model: a case study</i> .....	42
3.4 <i>Darstellung der Eigenleistung</i> .....	54
3.5 <i>Ausblick: Selective intracarotid blood cooling in acute ischemic stroke: a safety and feasibility trial of hypothermia vs. normothermia in an ovine stroke model</i> .....	54
3.5.1    Überblick zur Methodik.....	54
3.5.2    Ausgewählte Ergebnisse.....	55
3.5.3    Darstellung der Eigenleistung.....	58

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>4 Diskussion .....</b>	<b>59</b>
4.1 <i>Hintergrund der Arbeit.....</i>	59
4.2 <i>Übersicht zu existierenden Großtiermodellen des ischämischen Schlaganfalls und deren Anwendung</i>	60
4.3 <i>Etablierung eines Tiermodells zur temporären MCAO mit Akutbildgebung.....</i>	63
4.4 <i>Machbarkeits- und Sicherheitsstudie zum Einsatz des endovaskulären Kühlkathetersystems .....</i>	65
4.5 <i>Fazit.....</i>	68
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>70</b>
<b>6 Summary.....</b>	<b>72</b>
<b>7 References .....</b>	<b>74</b>
<b>8 Anhang .....</b>	<b>97</b>
8.1 <i>Search Strategy in Medline (Wolters Kluwer, Ovid).....</i>	97
8.2 <i>Search Strategy Web of Science Core Collection.....</i>	107
8.3 <i>Supplementary Figure 1: DSA carotid siphon .....</i>	112
8.4 <i>Abbildungsverzeichnis.....</i>	113
<b>9 Danksagung .....</b>	<b>114</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACC	Arteria carotis communis
ACA	Anterior cerebral artery
ACAO	Anterior cerebral artery occlusion
AchAO	Anterior choroidal artery occlusion
ACM	Arteria cerebri media
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
AMPA	$\alpha$ Amino 3 hydroxy 5 methyl 4 isoxazol Propionsäure
APA	Ascending pharyngeal artery
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
AVM	Arteriovenöse Malformation(en)
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumion(en)
CBF	Cerebral blood flow
CBV	Cerebral blood volume
CCA	Common carotid artery
CCAO	Common carotid artery occlusion
CI	Confidence Interval
Cl <sup>-</sup>	Chloridion(en)
COX	Cyclooxygenase
CS	Carotid Siphon
CT	Computertomographie/computed tomography
CTA	CT angiography
CTP	CT perfusion
Cyt C	Cytochrom C
DSA	digitale Subtraktionsangiographie
DWI	diffusion-weighted imaging
ECA	External carotid artery
EJV	External jugular vein
FA	Flip angle
FLAIR	Fluid-attenuated inversion recovery
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
Glu	Glutaminsäure
GM	Grey matter
H <sub>2</sub> O	Wasser
HT	Hypothermie
ICA	Internal carotid artery
ICAO	Internal carotid artery occlusion
Il-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
IPAT	Integrated parallel imaging techniques
IQR	Interquartile range
JV	Jugular vein
K <sup>+</sup>	Kaliumion(en)
LVO	Large vessel occlusion
MAP	Mean arterial blood pressure
MCA	Middle cerebral artery
MCAO	Middle cerebral artery occlusion

## Abkürzungsverzeichnis

---

MPRAGE	Magnetization Prepared Rapid Acquisition GRE (gradient echo)
MRA	Magnetresonanzangiographie
MRT/MRI	Magnetresonanztomographie/magnetic resonance imaging
MTT	Mean transit time
NA	Number of averages
NA	Not available
Na+	Natriumion(en)
NGF	nerve growth factor
NHP	Non human primate
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMR	Nuclear magnetic resonance
NT	Normothermie
NV	Not visible
OCT	Optical coherence tomography
PCAO	Posterior cerebral artery occlusion
PET	Positron emission tomography
PID	Peri-Infarkt Depolarisation
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses
RM	Rete mirabile
rtPA	Recombinant tissue plasminogen activator
SD	Standard Deviation
SMAC	second mitochondria-derived activator of caspase
SPECT	Single photon emission computed tomography
TE	Echo time
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TOF-MRA	Time-of-Flight-MRA
TR	Repetition time
TSE	Turbo spin echo
T2w	T2-weighted imaging
WM	White matter
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

Der Schlaganfall ist eine akute Schädigung des Gehirns durch eine vorübergehende oder anhaltende fokale zerebrale Durchblutungsstörung (DIRNAGL et al. 1999). Ein Drittel der Betroffenen stirbt an den Folgen, was den Schlaganfall zur zweithäufigsten Todesursache weltweit macht (FEIGIN et al. 2017). Ein weiteres Drittel bleibt dauerhaft behindert, weswegen der Schlaganfall meist mit erheblichen Einschränkungen für die Betroffenen verbunden ist und eine große sozioökonomische Herausforderung darstellt (MOZAFFARIAN et al. 2016). Es werden zwei Arten von Schlaganfällen unterschieden: der hämorrhagische Schlaganfall und der ischämische Schlaganfall. Der hämorrhagische Schlaganfall entsteht durch das Bersten eines zerebralen Blutgefäßes (QURESHI et al. 2009) und liegt in der westlichen Welt etwa 15 % der Fälle zugrunde. Der ischämische Schlaganfall ist deutlich häufiger, er repräsentiert 85 % aller Schlaganfälle (KADIR und BAYRAKTUTAN 2019) und ist Gegenstand der vorliegenden Dissertation. Der ischämische Schlaganfall entsteht durch einen embolischen oder thrombotischen Verschluss einer hirnersorgenden Arterie, was zu einem Zusammenbruch der Sauerstoff- und Glukoseversorgung im betroffenen Hirnareal führt (RINGELSTEIN und NABAVI 2007). Für die Therapie des ischämischen Schlaganfalls stand bis vor kurzem nur eine einzige zugelassene Methode zur Verfügung: die Fibrinolyse mittels intravenöser Gabe von Alteplase (engl. recombinant tissue plasminogen activator, rtPA). Allerdings hat die Applikation von rtPA nur dann Aussicht auf Erfolg, wenn sie innerhalb von 4,5 Stunden nach Einsetzen der Schlaganfallssymptome erfolgt. Dieses enge therapeutische Zeitfenster und zahlreiche Kontraindikationen, wie eine kürzlich vorausgegangene Operation oder Koagulationsstörungen (BERKHEMER et al. 2015) führen dazu, dass weniger als 12 % der Patienten diese Therapie erhalten (GUMBINGER et al. 2014). Noch weniger Patienten profitieren merklich von der Behandlung. Aus diesem Grund sind alternative Behandlungsmöglichkeiten dringend erforderlich. Derartige Alternativen sind beispielsweise endovaskuläre Verfahren wie die intraarterielle Thrombolyse oder die mechanische Rekanalisation. Effektivität und Sicherheit endovaskulärer Verfahren wurden nachgewiesen, was ab 2015 zu einem Durchbruch in der Therapie akuter Schlaganfälle führte (BERKHEMER et al. 2015; GOYAL et al. 2015). Endovaskuläre Verfahren ermöglichen höhere Rekanalisationsraten und weisen ein niedrigeres Risiko für nachfolgende Hämorrhagien auf als eine intravenöse Thrombolyse. Die endovaskuläre mechanische Rekanalisation ermöglicht die rasche Entfernung von Thromben aus großen

## Einleitung

---

Hirngefäßen und eine bessere Reperfusion als eine Behandlung mit intravenöser rtPA allein (SAVER et al. 2015). Die Schaffung eines Zugangs für die mechanische Rekanalisation sollte spätestens 6 Stunden nach Beginn der Symptome erfolgen (Ringleb & Veltkamp 2015). Allerdings kann das therapeutische Zeitfenster bei ausgewählten Patienten deutlich weiter sein. Wichtig für eine erfolgreiche Therapie ist das Vorhandensein der sogenannten Penumbra. In der Penumbra ist durch Kollateralisierung eine Restperfusion und damit -versorgung gewährleistet, welche jedoch dauerhaft nicht ausreichend ist. Durch die Wiederherstellung eines suffizienten Blutflusses kann die Penumbra aber gerettet werden kann. Patienten, die von einer Rekanalisation profitieren, können durch ein Missverhältnis zwischen der Schwere der klinischen Symptome (unverhältnismäßig groß) und dem Infarktausmaß (klein) (NOGUEIRA et al. 2018) und mit erweiterten Bildgebungsparametern (STRAKA et al. 2010) identifiziert werden.

Die medikamentöse Neuroprotektion, also der wirkstoffvermittelte Schutz des Gehirngewebes vor ischämischen Schäden, stellt eine therapeutische Alternative dar, die auch in Kombination mit Rekanalisationsverfahren eingesetzt werden kann. Unter neuroprotektiv wirkende Mittel fallen Radikalfänger, Barbiturate, Kalziumkanalblocker, Antagonisten exzitatorischer Aminosäuren und einige Wachstumsfaktoren. Neuroprotektion kann ebenfalls durch Hypothermie erreicht werden (STAIR 1999). Die therapeutische Hypothermie wird als die aktuell vielversprechendste Strategie der Neuroprotektion gehandelt (ANDRESEN et al. 2015). Da eine generelle Hypothermie aber auch zu Komplikationen führen kann, ist die Art der Anwendung entscheidend. Die selektive Hypothermie des Gehirns bietet bei Schlaganfällen die Möglichkeit, systemische Nebenwirkungen zu umgehen (SLOTBOOM et al. 2004). Die selektive Hypothermie des Gehirns ist über verschiedene Wege möglich, z. B. mittels Kühlhelmen (POLI et al. 2013), intranasalen (COVACIU et al. 2008) oder intraarteriellen Kathetern (CATTANEO et al. 2016). Es sind jedoch noch weitere Untersuchungen erforderlich, um den routinemäßigen Einsatz therapeutischer Hypothermie bei Schlaganfällen zu ermöglichen. Für die Testung und Etablierung der besonders vielversprechenden endovaskulären Verfahren sind Großtiermodelle notwendig, da nur diese die notwendige Gefäßgröße bieten, die zur Testung endovaskulärer Verfahren erforderlich ist.

In dieser Arbeit soll eine systematische Übersicht über verfügbare Großtiermodelle des ischämischen Schlaganfalls gegeben und ein translationales Anwendungsbeispiel beschrieben werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Schlaganfall

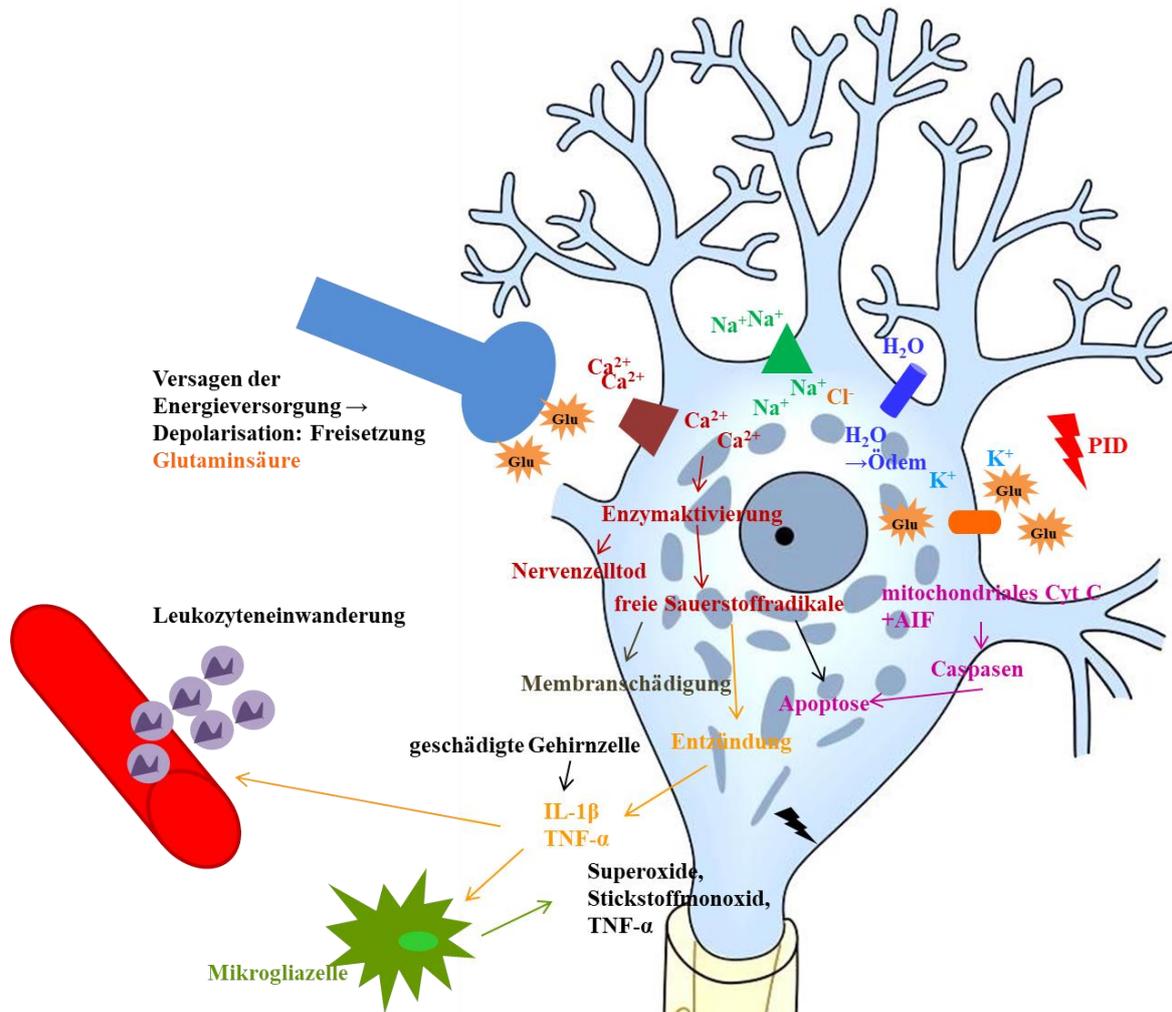
Das Gehirn benötigt für einen funktionierenden Stoffwechsel große Mengen an Sauerstoff und Glukose. Es ist für die Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) zur Energiegewinnung von der oxidativen Phosphorylierung abhängig (RINGELSTEIN und NABAVI 2007) und besitzt keine nennenswerten Sauerstoff- oder Glukosereserven. Der hohe Bedarf erfordert eine kontinuierliche Blutversorgung und damit einen ungestörten zerebralen Blutfluss. Durch einen ischämischen Schlaganfall, also den Verschluss gehirnversorgender Gefäße, ist der zerebrale Blutfluss unterbrochen oder zumindest massiv verringert. In Folge kommt es zu einem Versagen der Energieversorgung. Am schwersten sind Patienten betroffen, wenn die Versorgungsgebiete mehrerer großer hirnversorgender Arterien gleichzeitig betroffen sind. Jedoch führt auch ein isolierter Verschluss der Arteria cerebri media (ACM, im Englischen als middle cerebral artery occlusion, MCAO bezeichnet), der Arteria cerebri anterior oder der Arteria cerebri posterior bzw. deren wichtigster Stämme zu schweren Schädigungen und Beeinträchtigungen. In etwa der Hälfte aller Fälle ist die ACM betroffen (NG et al. 2007).

Patienten leiden nach einem Schlaganfall häufig an motorischen Störungen, wie z. B. Hemiparesen oder Schluckstörungen, oder auch an sensorischen Beeinträchtigungen, wie z. B. Gesichtsfeldausfällen oder einseitigen Anästhesien. Aber auch Kommunikationsstörungen, wie z. B. Sprech- und Sprachstörungen bis zum Sprachverlust, sowie Depressionen als Komplikation des Schlaganfalls erzeugen einen hohen Leidensdruck (MILLER et al. 2010). Darüber hinaus ist der Schlaganfall ein massives sozioökonomisches Problem. Die Gesamtkosten pro Überlebenden eines ischämischen Schlaganfalls wurden auf 18 517 Euro im ersten Jahr geschätzt. 37 % dieser Kosten entfielen auf die Rehabilitation, während die ambulante Versorgung in den Folgejahren der Hauptkostenfaktor war. Projektionen für den Zeitraum 2006 bis 2025 ergaben um die 2 Millionen neue Fälle ischämischer Schlaganfälle bei Männern und Frauen und einen Kostenpunkt von 51,5 bzw. 57,1 Milliarden Euro (KOLOMINSKY-RABAS et al. 2006).

### 2.1.1 Pathophysiologische Mechanismen

#### 2.1.1.1 Exzitotoxizität

Durch das Ausbleiben der Versorgung mit Sauerstoff und Glukose bricht insbesondere in den Neuronen die Energieversorgung in Form von ATP abrupt zusammen. Es kommt folglich zum Funktionsverlust ATP-abhängiger Ionenkanäle, welche zum Aufrechterhalten des Transmembranpotenzials und damit für die Depolarisation von Nervenzellen essenziell sind. Dies wiederum führt zu einem Einstrom von Kalziumionen in die Zellen und zur Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren wie beispielsweise Glutaminsäure in den extrazellulären Raum (CHERUBINI et al. 2005) (*Abbildung 1*). Die energieabhängige Wiederaufnahme von Glutaminsäure aus dem präsynaptischen Spalt ist ebenfalls gestört, wodurch es zu einer Anhäufung von Glutaminsäure im extrazellulären Raum kommt (SHI et al. 2018). Daraus resultiert die Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren wie beispielsweise  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure- (AMPA)- und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren; ein konsekutiver Kalziumeinstrom in Neuronen führt schließlich zur Exzitotoxizität (KHOSHNAM et al. 2017).

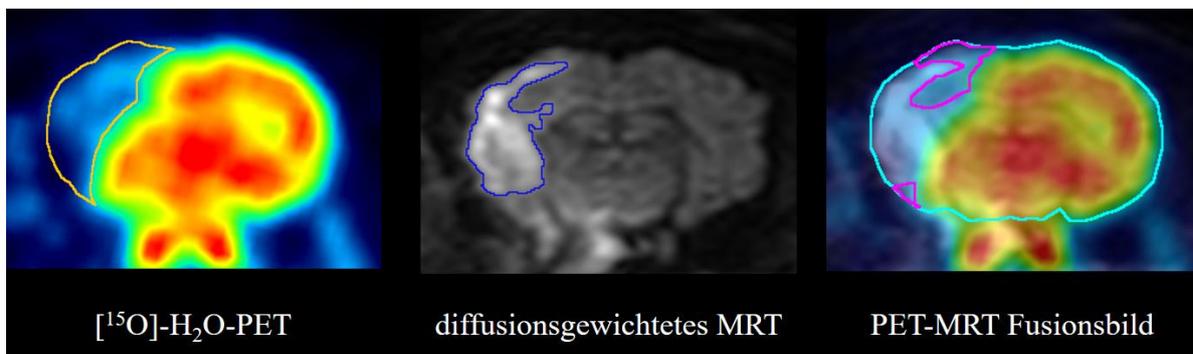


**Abbildung 1: Schemaabbildung der pathophysiologischen Mechanismen an und in einer Nervenzelle im Falle eines ischämischen Schlaganfalles**

Versagen der Energieversorgung in Form von Adenosintriphosphat (ATP) führt zur Depolarisation, Einstrom von Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Freisetzung von Glutaminsäure (Glu) und damit zur Exzitotoxizität, die sich auf umliegendes Gewebe ausweiten kann. Die Anhäufung von Kalzium in den Zellen löst Mechanismen aus, die letztendlich zum neuronalen Zelltod führen. Geschädigte Zellen setzen weiterhin proinflammatorische Zytokine frei. Dies führt zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Monozyten. Mikrogliazellen setzen zytotoxische Bestandteile frei. Freie Sauerstoffradikale, mitochondriales Cytochrom C (Cyt C) und Apoptose-induzierender Faktor (AIF) führen zur Apoptose.  $\text{Cl}^-$  (Chlorid),  $\text{IL-1}\beta$  (Interleukin 1 $\beta$ ),  $\text{Na}^+$  (Natrium),  $\text{TNF-}\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ),  $\text{H}_2\text{O}$  (Wasser) (selbstgestaltete Abbildung; Bildquelle Neuron: <https://deximed.de>, Januar 2018)

Die Anhäufung von Kalzium führt weiterhin zur Aktivierung von Kalzium-abhängigen Enzymen wie Proteasen, Phospholipasen, Endonukleasen, Proteinkinasen und der Stickstoffmonoxid-Synthase, was letztendlich zum Nervenzelltod führt (RANDALL und THAYER 1992). Phospholipase A2 und Cyclooxygenase (COX) produzieren freie Sauerstoffradikale, welche zusätzliche Lipidperoxidation, Membranschädigung, Entzündung und Apoptose bewirken (DIRNAGL et al. 1999). Zusätzlich kommt es zum Einstrom von Natrium und Chlorid und osmotisch bedingt nachfolgend von Wasser, was zur Entstehung eines Gehirnödems führt (STOKUM et al. 2016).

Wichtige Schwellenwerte einer verminderten Durchblutung sind wie folgt definiert: im ischämischen Kern sinkt der zerebrale Blutfluss auf unter  $6 \text{ cm}^3 (\text{ml}) \times 100 \text{ g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ . In der sogenannten Penumbra liegt der Blutfluss zwischen  $7$  und  $20 \text{ cm}^3 \times 100 \text{ g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  (KAUFMANN et al. 1999), es ist also ein Residualblutfluss vorhanden. Der ischämische Kern ist irreversibel geschädigt. Das Gewebe der Penumbra (*Abbildung 2*) kann durch eine rechtzeitige und ausreichende Wiederherstellung des Blutflusses gerettet werden, wobei eine funktionelle Erholung ohne morphologische Schäden möglich ist. Gelingt die Wiederherstellung des Blutflusses jedoch nicht, so wandelt sich die Penumbra innerhalb von Stunden in voll infarziertes Gewebe um. Die Entstehung von irreversiblen morphologischen Schäden ist zeitabhängig (HEISS und ZARO-WEBER 2017). Ziel einer jeden Therapie sollte es daher sein, möglichst schnell möglichst große Anteile der Penumbra zu retten, da dort sonst ebenfalls irreversible Schäden eintreten.



**Abbildung 2: Illustration des ischämischen Kerns und der Penumbra**

Simultane Positronen-Emissions- und Magnetresonanztomographie eines Schafgehirns 3 Stunden nach MCAO. Deutlich zu erkennen ist das Perfusionsdefizit, ermittelt durch die Bildgebung mittels  $^{15}\text{O}$ -markierten Wasser (links). Zum Zeitpunkt der Aufnahme war der aus dem Perfusionsdefizit resultierende Gewebeschaden, dargestellt mittels perfusionsgewichteter Magnetresonanztomographie (MRT) (Mitte) noch deutlich kleiner. Die Differenz (rechts, rosa umrandet) ist die Penumbra, welche durch zeitnahe Wiederherstellung einer adäquaten Perfusion gerettet werden kann. Bildquelle: Prof. Dr. med. H. Barthel, Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Leipzig (BOLTZE et al. 2017).

### 2.1.1.2 Peri-Infarkt Depolarisationen

Das Phänomen der Streudepolarisierung (engl. spreading depression) wurde schon früh mit der Pathogenese des Schlaganfalls in Verbindung gebracht (HANSEN und LAURITZEN 1984). Unter Streudepolarisierung versteht man eine elektrochemische Welle, die sich im Nervengewebe ausbreitet und zu einer lang andauernden Depolarisation (1-5 Minuten) und damit zur Beendigung der Nervenzellaktivität führt. Sie kann durch hohe Kalium- und Glutaminsäure-Konzentrationen im ischämischen Kern ausgelöst werden und zur Depolarisation im angrenzenden Gewebe führen. (HARTINGS et al. 2003) (*Abbildung 1*). Unter Energieverbrauch können Zellen in der Penumbra zwar repolarisieren, jedoch bei

steigenden Glutaminsäure-Konzentrationen auch wieder depolarisieren, was zu einem raschen Verbrauch des ohnehin nur in insuffizienten Mengen vorliegenden ATPs führt (DIRNAGL et al. 1999; FEUERSTEIN et al. 2016). Die sich wiederholende Depolarisation kann sich wellenartig um das Infarktgebiet ausbreiten und wird daher als Peri-Infarkt Depolarisation (PID) bezeichnet (HOPWOOD et al. 2005). PID führen außerdem zu Vasokonstriktion, einer Verschlechterung des zerebralen Blutflusses und damit zu einer schrittweisen Ausdehnung des ischämischen Kerns (SHIN et al. 2006). Der hohe Energieverbrauch und die verminderte Sauerstoffzufuhr beschleunigen dabei den Untergang der Penumbra (HARTINGS et al. 2003).

### 2.1.1.3 Entzündung

Die Entzündungsreaktion nach einem ischämischen Schlaganfall kann den Schaden am Hirngewebe einerseits intensivieren, andererseits aber auch zur Erholung beitragen (JIN et al. 2013). Geschädigte Gehirnzellen sezernieren proinflammatorische Zytokine wie z. B. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) oder Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und ermöglichen damit die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen. Dies wiederum führt zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Monozyten ins Gehirngewebe (GELDERBLOM et al. 2012) (*Abbildung 1*). Neutrophile Granulozyten beeinträchtigen die zerebrale Mikroperfusion durch die Ansammlung in Gehirnkapillaren (MORI et al. 1992) und produzieren über die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) zytotoxisches Stickstoffmonoxid, welches die Entzündung und Schädigung im Gehirn verstärkt (GARCIA-BONILLA et al. 2014).

Mikrogliazellen sind die Immunzellen des Zentralnervensystems und ein wichtiger Teil der Immunantwort nach einem ischämischen Schlaganfall. Sie setzen zu Beginn der Entzündungsreaktion neurotoxische Zytokine frei und verstärken dadurch die infarktbedingten Schäden (LALANCETTE-HÉBERT et al. 2007). Mikrogliazellen spielen aber auch eine wichtige Rolle bei der Entfernung von Zelltrümmern und toxischen Substanzen durch Phagozytose (KAWABORI et al. 2015). Mikroglia setzt im späteren Verlauf neurotrophe und antiapoptotisch wirkende Wachstumsfaktoren frei (LALANCETTE-HÉBERT et al. 2007). Die Mechanismen der frühen Entzündungsreaktion tragen überwiegend zu einer Verschlechterung der Gehirnverletzung bei, während die Mechanismen der späten Entzündungsreaktion eine Erholung, Reorganisation und unter optimalen Umständen sogar eine sehr begrenzte, lokale Regeneration des Gehirngewebes fördern (AMANTEA et al. 2009).

### 2.1.1.4 Apoptose

Im ischämischen Kern erfolgt der Zelltod überwiegend durch Nekrose, während in der Penumbra Apoptose vorherrscht (CHARRIAUT-MARLANGUE et al. 1996). Unter Apoptose versteht man einen kontrollierten physiologischen Zelltod, der sowohl im Rahmen der Individualentwicklung und beim physiologischen Zellumsatz, als im Rahmen von pathologischen Vorgängen wie dem Schlaganfall eine Rolle spielt (KHOSHNAM et al. 2017). Apoptotische Zellen werden sofort phagozytiert, womit eine Freisetzung exzitatorischer Stoffe verhindert wird. Nekrotische Zellen hingegen setzen intrazelluläre Botenstoffe frei und lösen damit schädigende Entzündungsreaktionen aus (LAUBER et al. 2003).

Caspasen sind Enzyme, die maßgeblich zur Apoptose beitragen. Sie spalten Proteine, die dann wiederum zur Zerstörung von Zellen führen (KUROKAWA und KORNBLUTH 2009). Durch ischämiebedingte Schäden kommt es zur Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C und dem Apoptose-induzierenden Faktor (AIF). Cytochrom C führt zur Bildung eines sogenannten Apoptosoms, eines Proteinkomplexes, der wiederum Caspase-9 und -3 aktiviert. AIF führt über einen Caspase-unabhängigen Weg zur DNS-Zerstörung und schließlich zum Zelltod (KHOSHNAM et al. 2017) (*Abbildung 1*). Die Apoptose von Nervenzellen ist sie für einen bestimmten Zeitraum nach Beginn des Schlaganfalles noch umkehrbar. Dies bietet die Möglichkeit therapeutisch einzugreifen (WEI et al. 2016).

### 2.1.2 Therapeutische Angriffspunkte

Hauptziel akuter Schlaganfalltherapien ist es, die Penumbra, also reversibel geschädigtes Gehirngewebe, zu retten (CHAMORRO et al. 2016).

#### 2.1.2.1 Rekanalisation

Ohne eine rechtzeitige und ausreichende Reperfusion geht die Penumbra durch Exzitotoxizität, PID, Entzündung und Apoptose schrittweise in nekrotisches Gewebe über. Möglichkeiten, den Blutfluss wiederherzustellen, umfassen die intravenöse Thrombolyse, intraarterielle Thrombolyse oder mechanische Rekanalisation (RINGLEB und VELTKAMP 2015). Nur ein kleiner Teil der Betroffenen kann mit intravenöser Gabe von rtPA therapiert werden, da etliche Kontraindikationen wie beispielsweise vorausgegangene intrakranielle Blutungen, kürzlich durchgeführte Operationen oder die Einnahme von Thrombininhibitoren einem Einsatz der Therapie entgegenstehen. Zudem wird empfohlen, rtPA möglichst innerhalb von 4,5 Stunden nach Beginn der Symptome durchzuführen. Die

## Literaturübersicht

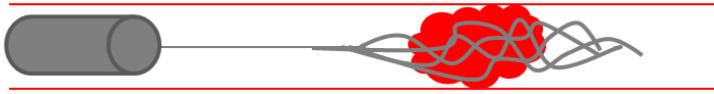
---

Methode ist außerdem durch die Größe des Thrombus eingeschränkt. Ein Thrombus mit einer Länge von mehr als 8 mm lässt sich mit intravenöser Thrombolyse allein nicht zuverlässig auflösen (RIEDEL et al. 2011). Alternative Herangehensweisen, wie die intraarterielle Thrombolyse oder die mechanische Rekanalisation sind bei einem Verschluss großer Gehirnarterien nötig (JAUCH et al. 2013).

Die intraarterielle Thrombolyse eignet sich für Patienten, die aufgrund von Kontraindikationen keine intravenöse Thrombolyse erhalten können. Außerdem kann durch einen lokalen Einsatz von rtPA die insgesamt benötigte Dosis und damit die systemische Konzentration verringert und gleichzeitig die Konzentration an Ort und Stelle erhöht werden. Allerdings ist das Risiko für Gefäßverletzungen höher, weshalb die adäquate Durchführung in spezialisierten Zentren erfolgen und von einem erfahrenen Interventionsmediziner durchgeführt werden sollte (BHASKAR et al. 2018). Patienten profitieren am meisten von einer intraarteriellen Thrombolyse, wenn sie innerhalb von 6 Stunden nach Beginn der Symptome verabreicht wird (BERKHEMER et al. 2015).

Die mechanische Rekanalisation ermöglicht die rasche Entfernung auch von großen Thromben und eine gute Reperfusion (SAVER et al. 2015). Die Punktion in der Leiste und damit Schaffung eines Zugangs für die mechanische Rekanalisation sollte spätestens 6 Stunden nach Beginn der Symptome erfolgen (RINGLEB und VELTKAMP 2015). Allerdings kann das therapeutische Zeitfenster bei Vorliegen einer Penumbra in ausgewählten Patienten deutlich weiter sein. Standard zum Nachweis einer Penumbra und damit zur Identifizierung von Patienten, die von einer Rekanalisation profitieren könnten, sind bildgebende Untersuchungen wie die Magnetresonanztomographie (STRAKA et al. 2010). Die mechanische Entfernung von Thromben ist z. B. mit Stent-Retrievern oder Merci-Retrievern möglich (*Abbildung 3*). Die mechanische Rekanalisation erfordert Erfahrung im Einsatz und in der Vorbereitung und bleibt deshalb spezialisierten Zentren vorbehalten (RINGLEB und VELTKAMP 2015).

A



B



### **Abbildung 3: Stent- und Merci-Retriever**

Diese Stents werden mit Hilfe von Führungsdrähten und Mikrokathetern durch den Thrombus geschoben und dahinter entfaltet. Beim Stent-Retriever (A) fixieren die Stentstreben den Thrombus, so dass dieser gemeinsam mit dem Stent-Retriever entfernt werden kann. Der Merci Retriever (B) besteht aus einem flexiblen Nitinoldraht mit Spule, welcher nach dem Einsetzen seine gewickelte Form annimmt und den Thrombus umfasst, so dass dieser herausgezogen werden kann (SAVER et al. 2012). Es wird empfohlen, für die mechanische Thrombektomie Stent-Retriever zu verwenden (RINGLEB und VELTKAMP 2015), da diese höhere Rekanalisationsraten und ein geringeres Risiko für Komplikationen aufweisen (SAVER et al. 2012). Selbsterstellte Abbildung.

### **2.1.2.2 Neuroprotektion**

Das therapeutische Ziel der Neuroprotektion ist es, Nervengewebe vor dem Untergang zu retten (YENARI und HAN 2012). Unter Neuroprotektion versteht man alle Strategien, die Prozesse unterbrechen oder verlangsamen, welche zu irreversiblen Schäden im Gehirngewebe führen können. Davon ausgenommen sind definitionsgemäß Strategien, die den Blutfluss wiederherstellen, namentlich die oben diskutierten Rekanalisationsansätze (GINSBERG 2008).

Es gibt verschiedenste medikamentöse Strategien der Neuroprotektion, so z. B. die orale Gabe von Kalziumkanal- (HORN et al. 2001) oder die intravenöse Verabreichung von NMDA- und AMPA-Rezeptorblockern (WALTERS et al. 2005). Diese sollen den Kalziumeinstrom und damit die Exzitotoxizität verhindern. Viele Neuroprotektiva konnten ihre Wirksamkeit in präklinischen Versuchen, nicht aber in klinischen Studien zeigen und haben sich in der Klinik nie durchgesetzt. Es ist unklar, warum diese Neuroprotektiva beim Menschen unwirksam sind. Gründe für ein Versagen können in der verabreichten Dosis, im Zeitpunkt der Verabreichung nach dem Schlaganfall und im geringen prädiktiven Wert der präklinisch verwendeten Tiermodelle liegen (STAIR 1999; KRINGE et al. 2020).

Die therapeutische Hypothermie wird als die derzeit vielversprechendste Strategie der Neuroprotektion angesehen und könnte geeignet sein, das therapeutische Zeitfenster für eine Thrombolyse zu verlängern (ANDRESEN et al. 2015).

Unter Umständen kann der größte Erfolg einer Schlaganfalltherapie aus einer Kombination aus Rekanalisation und Neuroprotektion bestehen (CATTANEO et al. 2016). Dieser Ansatz sollte daher Gegenstand weiterer Forschung sein.

## 2.2 Hypothermie

Die therapeutische Hypothermie soll eine Schutzfunktion für das ischämisch gestresste Gehirn erfüllen. Der Vorteil der Hypothermie ist, dass sie mehrere Mechanismen, die zur Schädigung des Gewebes führen können, unterbricht (BERGER et al. 2004).

Eine milde Hypothermie hat bereits bei Patienten mit Herzinfarkt (BERNARD et al. 2002) und bei Säuglingen mit hypoxisch-ischämischer Enzephalopathie (SHANKARAN et al. 2005) zu einem verbesserten klinischen Ergebnis, einem geringeren Risiko für bleibende Behinderungen und einer Reduktion der Todesrate geführt. Bei Patienten mit Schlaganfall kann eine milde Hypothermie das Risiko der Entstehung von zerebralen Ödemen und Hämorrhagien reduzieren und zu einem verbesserten Outcome führen (HONG et al. 2014). Man unterscheidet zwischen tiefer (Körpertemperatur  $< 30^{\circ}\text{C}$ ), moderat-tiefer (Körpertemperatur  $30\text{-}31,9^{\circ}\text{C}$ ), moderater (Körpertemperatur  $32\text{-}33,9^{\circ}\text{C}$ ), und milder (Körpertemperatur  $34\text{-}35,9^{\circ}\text{C}$ ) Hypothermie. Insbesondere tiefe Hypothermien können schwere Nebenwirkungen, wie z. B. Arrhythmien zur Folge haben (POLDERMAN und HEROLD 2009).

Die Wirksamkeit einer therapeutischen Hypothermie ist von mehreren Faktoren abhängig. Wichtig ist zum einen der Zeitpunkt, an dem mit der Kühlung begonnen wird, als auch die Tiefe der Hypothermie (LAMB et al. 2016) sowie die Zeitspanne, in der die Hypothermie aufrechterhalten wird (CLARK et al. 2008). Körpertemperaturen zwischen  $33\text{-}35^{\circ}\text{C}$  scheinen tief genug zu sein, um beim Schlaganfall die Effekte der Hypothermie zu nutzen und schwere Komplikationen zu vermeiden (HONG et al. 2014; WU und GROTTA 2013). Es ist dabei von Vorteil, mit der Kühlung während der Ischämie zu beginnen und sie über die Reperfusion hinaus aufrechtzuerhalten (YENARI et al. 2008).

### 2.2.1 Anwendung der Hypothermie

Die Anwendung der therapeutischen Hypothermie kann in eine Einleitungs-, eine Aufrechterhaltungs- und eine Aufwärmphase eingeteilt werden. In jeder Phase muss die Temperatur des Patienten streng überwacht werden (ANDRESEN et al. 2015). Prinzipiell kann entweder durch Oberflächenkühlung oder durch endovaskuläre Kühlung eine Hypothermie im Patienten induziert werden. Eine Oberflächenkühlung hat den Vorteil, nicht

invasiv und daher einfacher in der Anwendung zu sein. Allerdings können reaktive Gefäßverengungen an der Hautoberfläche (Zentralisation) auftreten und der Kühlung entgegenwirken (ZWEIFLER et al. 2003). Die gewünschte Zieltemperatur ist mit endovaskulären Verfahren schneller zu erreichen (OVESEN et al. 2013). Allerdings ist das Risiko für Infektionen und Blutungen erhöht (WU und GROTTA 2013). In der Literatur finden sich auch Studien zu pharmakologisch erzeugten Hypothermien (CAO et al. 2017; JOHANSEN et al. 2014), doch handelt es sich dabei um präklinische Studien an Nagetiermodellen. Dieser Ansatz hat bisher nicht den Weg in klinische Studien gefunden. Hypothermie ist in Kombination mit Rekanalisation ein vielversprechender Therapieansatz, da sowohl die Vorteile eines wiederhergestellten Blutflusses, als auch die neuroprotektive Wirkung der Hypothermie gleichzeitig genutzt werden können. So hat z. B. eine endovaskuläre Kühlung in Verbindung mit intravenöser Thrombolyse ihre Machbarkeit und Sicherheit (HEMMEN et al. 2010) und eine Oberflächenkühlung in Verbindung mit intraarterieller Thrombolyse ihre Wirksamkeit beim Menschen bereits bewiesen (MA et al. 2017). Zudem sind die positiven Wirkungen der Hypothermie bei einem wiederhergestellten Blutfluss ausgeprägter (RIDENOUR et al. 1992).

### **2.2.1.1 Globale Hypothermie**

In den oben genannten Studien zu Herzinfarkt, hypoxisch-ischämischer Enzephalopathie bei Säuglingen oder Schlaganfall wurde eine Ganzkörperkühlung (globale Hypothermie) durchgeführt. In der Regel narkotisierte Patienten werden mit Eisbeuteln, Kühldecken oder einem intravenösen Kühlkatheter in eine Hypothermie versetzt. Eine globale Hypothermie kann allerdings zu Komplikationen wie z. B. Bradykardie, Pneumonie und Zittern führen. Das durch die Kälte induzierte Zittern kann zwar durch Muskelrelaxanzien unterbunden werden, dies kann aber wiederum zur Notwendigkeit einer intensiven klinischen Überwachung und damit einer erschwerten Pflege der Patienten führen (OVESEN et al. 2013). Auch hämodynamische Veränderungen, Elektrolytstörungen, Koagulationsstörungen und Immunsuppression können auftreten, weshalb eine Überwachung der physiologischen Parameter notwendig ist (POLDERMAN und HEROLD 2009).

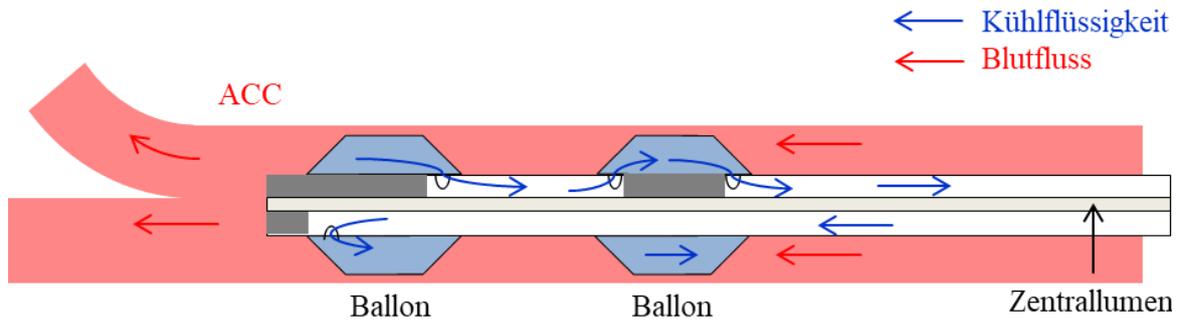
### **2.2.1.2 Selektive Hypothermie**

Bei Schlaganfällen ermöglicht die selektive Hypothermie des Gehirns nicht nur ein Umgehen der systemischen Nebenwirkungen, sondern auch eine schnellere und unter Umständen tiefere Kühlung des geschädigten Gehirngewebes (SLOTBOOM et al. 2004). In

bisherigen Studien wurden Kühlhelme (POLI et al. 2013) und Kühlkragen (GIULIANI et al. 2016) ebenso angewendet wie eine intranasale (COVACIU et al. 2008), nasopharyngeale (POLI et al. 2014) und ventrikuläre (MOOMIAIE et al. 2012) Kühlung mittels Katheter. Über intraarterielle Katheter ist bei entsprechender Platzierung eine selektive Kühlung des Gehirns ebenfalls möglich. Dabei wird das Gehirn mit Blut, das über ein extrakorporales Pumpsystem gekühlt und anschließend über die Arteria carotis communis (ACC) zurückgeführt wird, gekühlt (SCHWARTZ et al. 1996; MATTINGLY et al. 2016).

### 2.2.1.3 Kühlkathetersystem

Bei Kühlkathetern zirkuliert Kühlflüssigkeit ohne direkten Kontakt zum Blutkreislauf des Patienten im Katheter. Sie stellen damit geschlossene Systeme dar (AL-SENANI et al. 2004). Die Kühlflüssigkeit zirkuliert vom Innenlumen zum distalen Ende des Katheters und teilt sich in die Außenlumen auf, dort findet der Wärmeaustausch zwischen Ballon-Membranen und dem Blut statt (*Abbildung 4*). Die Ballons dienen als Wärmeaustauscher zwischen der Kühlflüssigkeit im Kühlkatheter und dem vorbeifließendem Blut (CATTANEO et al. 2015). Bei intravenösen Kühlkathetern, die meist in der Vena cava inferior platziert werden, existiert ein weiteres Lumen für intravenöse Infusionen (AL-SENANI et al. 2004). Unlängst wurde ein weiterer Katheter mit einem weiteren Lumen, dem Arbeitskanal, entwickelt. Der Arbeitskanal erlaubt den gleichzeitigen Einsatz eines Katheters für die mechanische Thrombektomie. Dieser Kühlkatheter ermöglicht damit eine selektive Kühlung in der ACC, und damit des Gehirns, bei gleichzeitiger Thrombektomie in der ACM (Cattaneo et al, 2015). Durch vier nacheinander angeordnete Ballons und die damit einhergehenden Querschnittsveränderungen kommt es zum Aufbrechen der thermischen Grenzschicht und dadurch zu einem verbesserten Wärmeaustausch durch Zunahme der Strömungskonvektion. Da das Kühlsystem in der ACC und damit vor der ACM liegt, ist eine Kühlung der Penumbra durch kollaterale Gefäße vor Entfernung des Thrombus möglich. Weiterhin fließt bereits gekühltes Blut nach der Thrombektomie in das ischämische Gewebe (Cattaneo et al, 2015). Der selektive Kühleffekt des Katheters wurde bereits am Schaf getestet. Hierbei zeigte sich, dass eine milde Hypothermie (35°C), die mit Hilfe von Temperatursonden im Gehirn gemessen wurde, innerhalb eines geeigneten Zeitrahmens (30-40 Minuten) für eine nachfolgende Thrombektomie erreicht werden konnte (CATTANEO et al. 2016).



**Abbildung 4: Schemaabbildung eines Kühlkathetersystems**

Wärmeaustausch an den Ballonmembranen zwischen vorbeifließendem Blut und der im Innern des Katheters zirkulierenden Kühlflüssigkeit. Zentrallumen für das Kathetersystem zur Durchführung einer Thrombektomie. ACC: Arteria carotis communis. Abbildung modifiziert nach Cattaneo et al. 2015.

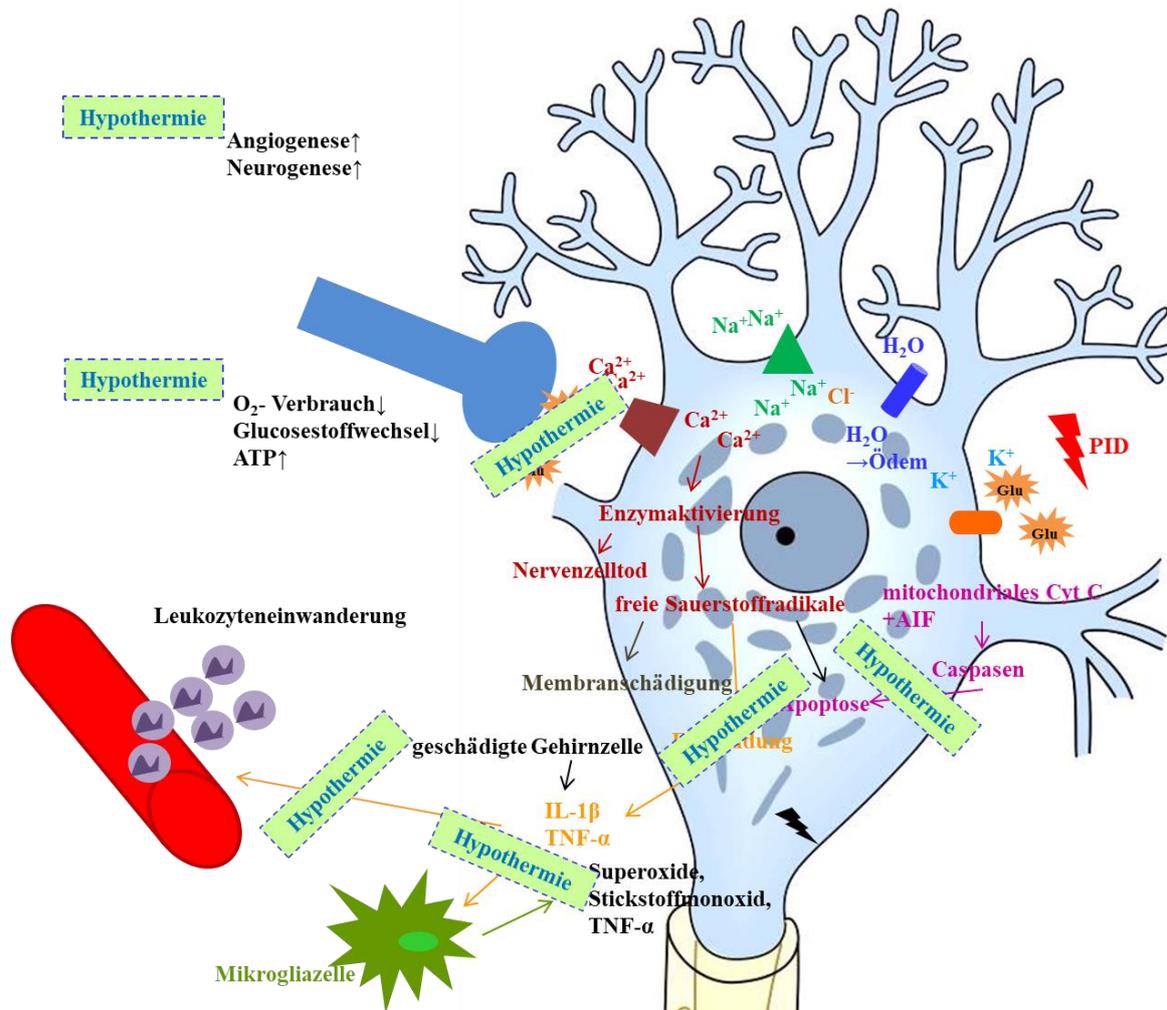
### 2.2.2 Wirkung beim Schlaganfall

In der akuten Phase (Minuten bis Stunden nach Eintreten eines Schlaganfalls) kann eine Hypothermie eine Verminderung des zerebralen Sauerstoffverbrauchs und Glukosestoffwechsels, außerdem eine Erhaltung von ATP und damit von Energiereserven sowie eine Aufrechterhaltung des Gewebe-pHs bewirken (YENARI und HAN 2012) (Abbildung 5). Als Faustregel gilt dabei, dass pro Grad Celsius Körpertemperaturabsenkung die zerebrale Verstoffwechslung von Sauerstoff um 5 % sinkt (YENARI et al. 2008). Eine Hypothermie verringert weiterhin die Freisetzung von Glutaminsäure und kann daher das Ausmaß der PID und damit das finale Infarktvolumen reduzieren (BERGER et al. 2004).

Im subakuten Zustand (Stunden bis Tage) kann eine Hypothermie den apoptotischen Zelltod einschränken, Entzündung unterdrücken und einen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke verhindern, wodurch die Entstehung von Ödemen und sekundären Hämorrhagien vermieden oder zumindest limitiert wird (YENARI und HAN 2012). Beispielsweise kann eine milde Hypothermie zur verringerten Expression des second mitochondria-derived activator of caspase (SMAC) führen, der eine wichtige Rolle in der Einleitung der Apoptose spielt (LI und WANG 2011). Sie kann darüber hinaus die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Aktivierung von Mikrogliazellen hemmen und somit die initiale Entzündungsreaktion abschwächen (DENG et al. 2003). Die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen, deren proteolytische Aktivität nach einem Schlaganfall schädigend auf die extrazelluläre Matrix und die Blut-Hirn-Schranke wirkt, kann durch milde Hypothermie ebenfalls unterdrückt werden (LEE et al. 2005).

In der chronischen Phase (Wochen bis Monate) können die Auswirkungen einer Hypothermie immer noch in einer Verbesserung der Zelldifferenzierung in Vorläuferzellen

und gesteigerten Angio- und Neurogenese beobachtet werden (YENARI und HAN 2012). So ist die Expression neurotropher Faktoren, wie Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor, NGF) oder Glia-Zelllinien isolierter neurotropher Faktor (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) unter Hypothermie erhöht (HUANG et al. 2008).



**Abbildung 5: Angriffspunkte der Hypothermie**

Therapeutische Hypothermie führt zur Senkung des Sauerstoffverbrauchs und Glucosstoffwechsels und zur Erhaltung von Adenosintriphosphat (ATP). Zudem wird die Freisetzung von Glutaminsäure (Glu) sowie die Expression von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)- und  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA)-Rezeptoren verringert. Hypothermie limitiert außerdem Apoptose und Entzündung. Ein weiterer positiver Effekt zeigt sich in einer gesteigerten Angio- und Neurogenese. AIF (Apoptose-induzierender Faktor), Ca<sup>2+</sup> (Kalzium), Cyt C (Cytochrome C), Cl<sup>-</sup> (Chlorid), IL-1 $\beta$  (Interleukin 1 $\beta$ ), Na<sup>+</sup> (Natrium), TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ), H<sub>2</sub>O (Wasser) (selbstgestaltete Abbildung; Bildquelle Neuron: <https://deximed.de>, Januar 2018)

## 2.3 Tiermodelle

Tierversuche sind für die Erforschung von neurologischen Krankheiten sowie für die Erprobung und Testung von neuen Therapieverfahren erforderlich. Nager erfahren eine breite Anwendung in der Schlaganfallforschung (FLURI et al. 2015) und bieten zahlreiche Vorteile, wie beispielsweise die kostengünstige Beschaffung und Haltung, die Möglichkeit,

reproduzierbare Infarkte zu generieren, sowie die ethische Akzeptanz von Nagermodellen (MEHRA et al. 2012). In der Forschung verwendete Nager werden häufig aus Inzuchtstämmen rekrutiert, was die inter-individuelle Variabilität innerhalb eines Versuches verringert. Jedoch können diese Stämme in ihrer Empfindlichkeit gegenüber einer Schlaganfallsetzung variieren, daher müssen deren jeweilige Vor- und Nachteile abgewogen werden (ASPEY et al. 2000; FUJII et al. 1997). Risikofaktoren für einen Schlaganfall wie Alter, Bluthochdruck und Diabetes lassen sich bei Nagern ebenfalls etablieren (REWELL et al. 2010). Allerdings haben in der Vergangenheit viele neuroprotektiv wirkende Substanzen ihre Wirksamkeit zwar bei Nagern, jedoch nicht beim Menschen gezeigt (STAIR 1999).

Weiterhin ist die Hirnanatomie zwischen Nagern und Menschen, aber auch zwischen Nagern und den meisten höheren Säugetieren grundlegend verschieden. Nager besitzen ein lissenzepales Gehirn. Der Anteil an weißer Substanz entspricht etwa 10-12 %. Dies spiegelt nicht die anatomischen Verhältnisse des gyrenzephalen menschlichen Gehirns wider, das einen Anteil an weißer Substanz von 40-45 % aufweist (BOLTZE et al. 2017). Darüber hinaus erweist es sich bei der der Testung endovaskulärer Verfahren als nachteilig, dass die Gehirngefäße meist zu klein für eine adäquate Erprobung einer interventionellen Therapie sind (MEHRA et al. 2012). Dementsprechend spielen Großtiere eine zunehmend wichtige Rolle bei der Entwicklung und Etablierung von neuen Therapien in der Schlaganfallforschung. Dies begründet sich mit einigen Vorteilen, welche diese Modelle bieten. Einen Überblick dazu bietet Kapitel 3.1.

### **2.3.1 Schafmodell**

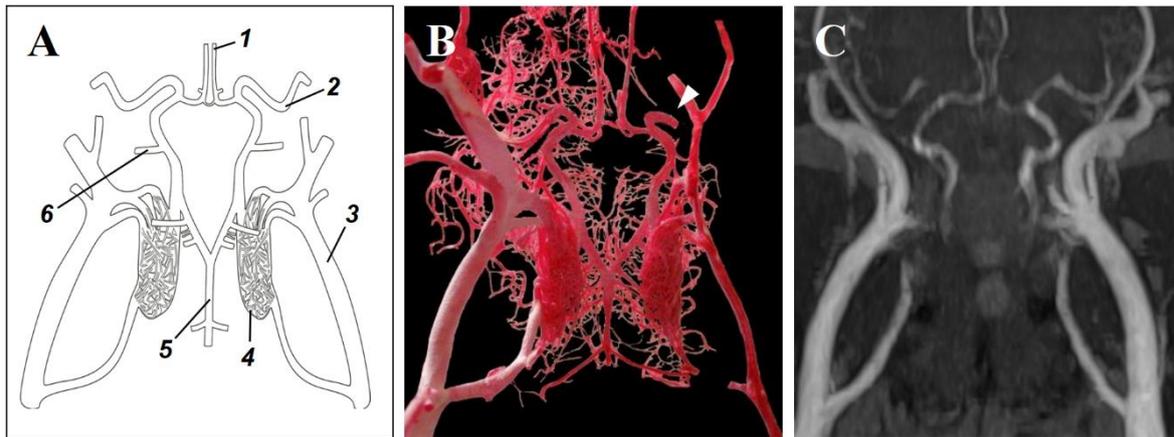
Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Schafmodell verwendet. Die Vor- und Nachteile dieses Modells sollen an dieser Stelle grob umrissen werden. Schafe zeichnen sich durch ihre relative Anspruchslosigkeit an Haltungsbedingungen und Pflege sowie hohe Anpassungsfähigkeit ihres Verhaltens gegenüber ihrem Umfeld aus (BOSTEDT und DEDIÉ 1996). Sie zeichnen sich durch eine hohe Robustheit aus und eignen sich für Langzeitversuche während eine artgerechte Haltung relativ leicht zu verwirklichen ist (BOLTZE et al. 2008). Schafe sind aufgrund ihres Einsatzes als Nutztiere gut verfügbar (FÖRSCHLER et al. 2007).

Es existieren bereits etablierte Schlaganfallmodelle im Schaf (BOLTZE et al. 2008; WELLS et al. 2012). Aufgrund des Rete mirabile epidurale rostrale ist beim Schaf ein Verschluss der ACM aber nur nach einer Trepanation zuverlässig möglich (FÖRSCHLER et al. 2007; BOLTZE et al. 2008; WELLS et al. 2012). Es bestehen die Möglichkeiten eines

permanenten Verschlusses mittels Elektrokoagulation (BOLTZE et al. 2008) oder eines transienten Verschlusses unter Nutzung eines Clips (WELLS et al. 2012). Beim Schaf können neurologische Störungen und Läsionen erzeugt werden, die denen des Menschen ähneln und mittels Verhaltenstest evaluiert werden können (BOLTZE et al. 2008). Ein wichtiger Unterschied zu etlichen anderen Säugetierspezies und insbesondere zu Primaten einschließlich des Menschen ist aber, dass die Pyramidenbahn des Schafes nicht vollständig kreuzt und so zwar Hemiparesen, nie aber komplette Plegien als Folge einer fokalen zerebralen Ischämie auftreten. Dies ist aus tierschutzrechtlicher Sicht und im Rahmen von Langzeitstudien von Relevanz. In Hinblick auf das entstehende Gehirnödem und den erhöhten Hirndruck ähnelt der experimentelle Infarkt beim Schaf dem territorialen Schlaganfall im ACM-Gebiet beim Menschen (WELLS et al. 2015). Aufgrund der Größe und des Gewichts der Tiere ist es außerdem möglich, Bildgebungsverfahren, die in der Klinik vorhanden sind, einzusetzen und so realitätsnahe Studien durchzuführen (GOUNIS and NOGUEIRA et al. 2013; BEURING et al. 2014). Das Schlaganfallmodell im Schaf findet sowohl in der Erforschung von Schlaganfallmechanismen (HÄRTIG et al. 2017) als auch in der Erforschung neuer therapeutischer Ansätze (TERPOLILLI et al. 2012) Anwendung. Es existiert ein Atlas inklusive anatomischer Landmarken und einer genauen Beschreibung der verschiedenen Gehirnareale des Schafes, welcher in der neurointerventionellen Forschung hilfreich sein kann (NITZSCHE et al. 2015). Anatomische Varianzen der ACM beim Schaf können jedoch zu Schwierigkeiten bei der Infarktsetzung und damit zu einem unterschiedlichen Infarktausmaß führen (BEURING et al. 2014). Aufgrund dieser Varianzen und des erforderlichen transkraniellen Zugangs zur ACM erfordert die Schlaganfallsetzung im Schaf umfangreiche neurochirurgische Erfahrung.

### **2.3.1.1 Blutversorgung des ovinen Gehirns**

Beim Schaf erfolgt die Blutversorgung des Gehirns über die Arteria maxillaris. Sie ist die Fortsetzung der Arteria carotis externa und bildet an der Gehirnbasis das Rete mirabile epidurale rostrale (KÖNIG und LIEBICH 2008). Aus dem Rete mirabile entspringt nach rostral die intrakranielle Arteria carotis interna. Aus ihr gehen dort die Arteria choroidea rostralis, die ACM und die Arteria cerebri rostralis hervor (FÖRSCHLER et al. 2007). Sie bildet so den Circulus arteriosus cerebri, welcher nur beim Hund geschlossen ist (KÖNIG und LIEBICH 2008).



**Abbildung 6: Blutversorgung des Schafgehirns**

(A) Die Blutversorgung des Schafgehirns erfolgt über die Arteria maxillaris (3) und die A. basilaris (5). Diese speist das Rete mirabile (epidurale rostrale) (4). Aus dem Rete mirabile entspringt die Arteria carotis interna, aus ihr gehen die Arteria choroidea rostralis (6), die ACM (2) und die Arteria cerebri rostralis (1) hervor. (B) Darstellung der Gefäßsituation anhand eines Ausgusspräparates. Die weiße Pfeilspitze zeigt den Verschluss der ACM, das nachgeschaltete Gefäßbett kommt nicht zur Darstellung. (C) Time-of-flight Angiographie der hirnvorsorgenden Gefäße im Schaf ohne ACM-Verschluss, Darstellung mittels 1.5T MRT. (Bildquelle: BOLTZE et al. 2008)

Die Charakteristika, Verfügbarkeit und Bedeutung von Großtiermodellen für die neurointerventionelle Forschung wurden bisher noch nicht systematisch untersucht. Kenntnisse über Großtiermodelle, die Möglichkeiten der Infarktsetzung bei Großtieren, sowie Vor- und Nachteile des Einsatzes dieser Modelle sind für die neurointerventionelle Forschung von Nutzen. Auch die Überprüfung hypothermischer Therapien würde von einer Evaluation im Großtier profitieren, wie Studien z. B. an Schweinen und Schafen zeigen (MATTINGLY et al. 2016; GIULIANI et al. 2016). Schafe werden, im Vergleich zu Schweinen, Hunden und Kaninchen, in der neurointerventionellen Forschung aber bisher noch vergleichsweise selten eingesetzt.

## 2.4 Fragestellung

Aus der erfolgten Literaturrecherche ergeben sich folgende Schlussfolgerungen und daraus abgeleitete offene Fragen für die vorliegende Arbeit:

1. Nager eignen sich nur sehr eingeschränkt für die Erforschung von neurointerventionellen Schlaganfalltherapien. Großtiere stellen eine Alternative dar. Zur Auswahl des geeigneten Modells muss jedoch ein derzeit in der Literatur noch fehlender Überblick über Großtiermodelle geschaffen werden. Wo liegen die spezifischen Vorteile dieser Modelle? Wo und wie werden sie eingesetzt? Wie werden Schlaganfallmodelle im Großtier erzeugt?

## Literaturübersicht

---

Unser systematisches Review in Kapitel 3.1 (HERRMANN et al. 2019) beschreibt Großtiermodelle in der neuroendovaskulären Forschung einschließlich ihrer Anwendung.

2. Schafe bieten einige Vorteile für den Einsatz in der (neurointerventionellen) Forschung. Schlaganfallmodelle im Schaf existieren bereits, allerdings unterscheiden sie sich hinsichtlich der chirurgischen Technik. Welche Methode der Schlaganfallsetzung eignet sich für einen temporären Verschluss und damit Rekanalisationsstudien am besten? Wie kann der temporäre Verschluss und das Perfusionsdefizit bildgebend beurteilt werden?

Unsere Studie in Kapitel 3.3 (HERRMANN et al. 2019) testet die Machbarkeit und Eignung bildgebender Verfahren zum MCAO-Nachweis und zur Perfusionsdefizitbewertung im Schaf. Damit soll ein Modell eines akuten Schlaganfalls mit anschließender Gefäßrekanalisation und praktikabler bildgebender Beurteilung ermöglicht werden.

3. Neuroprotektion, insbesondere Hypothermie in Kombination mit Rekanalisationsverfahren, ist ein vielversprechender Therapieansatz. Ist der Einsatz des Kühlkathetersystems im Großtiermodell machbar und sicher?

Kapitel 3.5 zeigt einen Ausblick anhand einer noch nicht veröffentlichten Studie, in der wir die Machbarkeit und Sicherheit selektiver Hypothermie und Rekanalisation mittels Kühlkathetersystem in einem Schlaganfallmodell mit temporärem MCAO getestet haben.

### **3 Kumulativer Teil der Dissertation**

#### **3.1 Large animals in neurointerventional research: a systematic review on models, techniques and their application in endovascular procedures for stroke, aneurysms and vascular malformations**

(20 pages, 4 figures, 2 tables, 155 references, 2 supplementary tables)

*J Cereb Blood Flow Metab.* 2019 Mar;39(3):375-394.



Review Article

**JCBFM**

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism  
 0(0) 1–20  
 © Author(s) 2019  
 Article reuse guidelines:  
[sagepub.com/journals-permissions](http://sagepub.com/journals-permissions)  
 DOI: 10.1177/0271678X19827446  
[journals.sagepub.com/home/jcbfm](http://journals.sagepub.com/home/jcbfm)

# Large animals in neurointerventional research: A systematic review on models, techniques and their application in endovascular procedures for stroke, aneurysms and vascular malformations

Andrea M Herrmann<sup>1,2</sup>, Stephan Meckel<sup>1</sup>, Matthew J Gounis<sup>3</sup>,  
 Leona Krings<sup>1,2</sup>, Edith Motschall<sup>4</sup>, Christoph Mülling<sup>2</sup> and  
 Johannes Boltze<sup>5</sup>

## Abstract

Neuroendovascular procedures have led to breakthroughs in the treatment of ischemic stroke, intracranial aneurysms, and intracranial arteriovenous malformations. Due to these substantial successes, there is continuous development of novel and refined therapeutic approaches. Large animal models feature various conceptual advantages in translational research, which makes them appealing for the development of novel endovascular treatments. However, the availability and role of large animal models have not been systematically described so far. Based on comprehensive research in two databases, this systematic review describes current large animal models in neuroendovascular research including their primary use. It may therefore serve as a compact compendium for researchers entering the field or looking for opportunities to refine study concepts. It also describes particular applications for ischemic stroke and aneurysm therapy, as well as for the treatment of arteriovenous malformations. It focuses on most promising study designs and readout parameters, as well as on important pitfalls in endovascular translational research including ways to circumvent them.

## Keywords

Endovascular, aneurysm, arteriovenous malformations, stroke, large animal models

Received 6 August 2018; Revised 3 December 2018; Accepted 11 December 2018

## Introduction

Neuroendovascular techniques are safe and effective for the treatment of acute ischemic stroke.<sup>1–3</sup> Recently, these techniques proved to be effective even in an extended time window for selected patient populations,<sup>4,5</sup> thereby substantially changing stroke treatment and research.<sup>6</sup> Moreover, recent technical advancements such as flow-diverting stents, intra-aneurysmal flow-diversion, and new liquid-embolic agents have widened opportunities for endovascular treatment of cerebral aneurysms and intracranial vascular malformations (AVMs).<sup>7</sup>

However, preclinical research on endovascular technologies is more challenging as compared to conventional treatment opportunities. Rodent models offer numerous advantages such as wide-spread

<sup>1</sup>Department of Neuroradiology, Medical Center – University of Freiburg, Faculty of Medicine, University of Freiburg, Freiburg, Germany

<sup>2</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Leipzig University, Leipzig, Germany

<sup>3</sup>Department of Radiology, New England Center for Stroke Research, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA

<sup>4</sup>Institute of Medical Biometry and Statistics, Faculty of Medicine and Medical Center, University of Freiburg, Freiburg, Germany

<sup>5</sup>Department of Translational Medicine and Cell Technology, Fraunhofer Research Institution for Marine Biotechnology and Cell Technology and Institute for Medical and Marine Biotechnology, University of Lübeck, Lübeck, Germany

### Corresponding author:

Stephan Meckel, Department of Neuroradiology, Medical Center – University of Freiburg, Faculty of Medicine, Breisacher Str 64, Freiburg D-79106, Germany.

Email: [stephanmeckel@gmail.com](mailto:stephanmeckel@gmail.com)

implementation, reproducibility, a broad spectrum of readout parameters and experimental imaging techniques, as well as the availability of transgenic animals.<sup>8,9</sup> On the other hand, rodent models only allow to investigate basic aspects of neuroendovascular treatments due to size limitations and significant differences in brain and cerebrovascular anatomy.<sup>10</sup>

Large animal models are available for preclinical neuroendovascular research and offer numerous advantages including larger vessel sizes, compatibility with clinical magnetic resonance imaging (MRI),<sup>11</sup> computed (CT)<sup>12</sup> or positron emission tomography (PET),<sup>13</sup> and a gyrencephalic brain with a gray-to-white-matter-ratio approximating that of humans.<sup>14</sup> Despite minor anatomical differences in some species, cerebral blood supply and cerebrovascular architecture are very similar to the human situation.<sup>15</sup> Large animal models are also feasible for long-term studies and extensive physiological monitoring. Behavioral tests for the assessment of functional outcomes are available, while international expert committees recommend confirmative research in large animal models prior to early stage clinical investigations.<sup>16,17</sup> However, large animal models are not utilized widely yet, potentially due to special maintenance requirements, the necessity of for interdisciplinary research teams as well as profound knowledge on how to successfully employ these models, as well as some species-dependent anatomical differences to humans.<sup>9,10</sup>

Here, we review existing large animal models and their use in neuroendovascular research on stroke, aneurysms and AVMs. We also provide recommendations on most feasible study designs and readout strategies in order to capitalize on the advantages of large animal models while avoiding potential limitations.

### Methodological approach

We conducted a systematic literature search for relevant publications according to the PRISMA guidelines. We accessed indexed and non-indexed Medline databases via Ovid search interface from Wolters Kluwer and Science Citation Index Expanded via Web of Science from Clarivate Analytics (Figure 1(a)). The Medline search strategy included 23 search steps of terms for the topic large animals and 37 search steps of terms for the topic cerebrovascular intervention. The databases were searched from 1990 up to the update status of the databases on November 24th 2017 (search date).

Search strategies combined the aspects “large animals” and “neurological intervention” with AND. We also used keywords with synonyms and, if available, controlled vocabulary terms for Medline (for detailed search strategies, please see Supplementary Tables 1 and 2). Only articles published in English were included.

Additionally, we searched for large animal models that were developed to represent the vascular anatomy of humans as well as human neurovascular disorders. Studies utilizing extracranial vessels to simulate intracranial interventions and/or to establish a neurointerventional model were included, but discriminated from studies describing a neurointerventional procedure in the cerebrovasculature. Additionally, reference lists from identified papers of interest were screened to find other potentially relevant publications.

We further analyzed the application of these models in neurointerventional research focusing on endovascular approaches. Studies that (i) addressed neurointerventional research, (ii) tested endovascular techniques, and (iii) were performed in large animals were assessed.

We excluded articles due to the following criteria: no full text available ( $n=20$ ), focus on diagnostic procedures only ( $n=68$ ), no neurointerventional technique reported ( $n=71$ ), no endovascular approach ( $n=23$ ), clinical study ( $n=2$ ), review/historical perspective ( $n=1/1$ ), in vitro study ( $n=9$ ), and studies focusing on interventions in the peripheral circulation without modelling the cerebrovasculature (not intracranial,  $n=11$ ) (Figure 1(a)).

## Results

### Data set

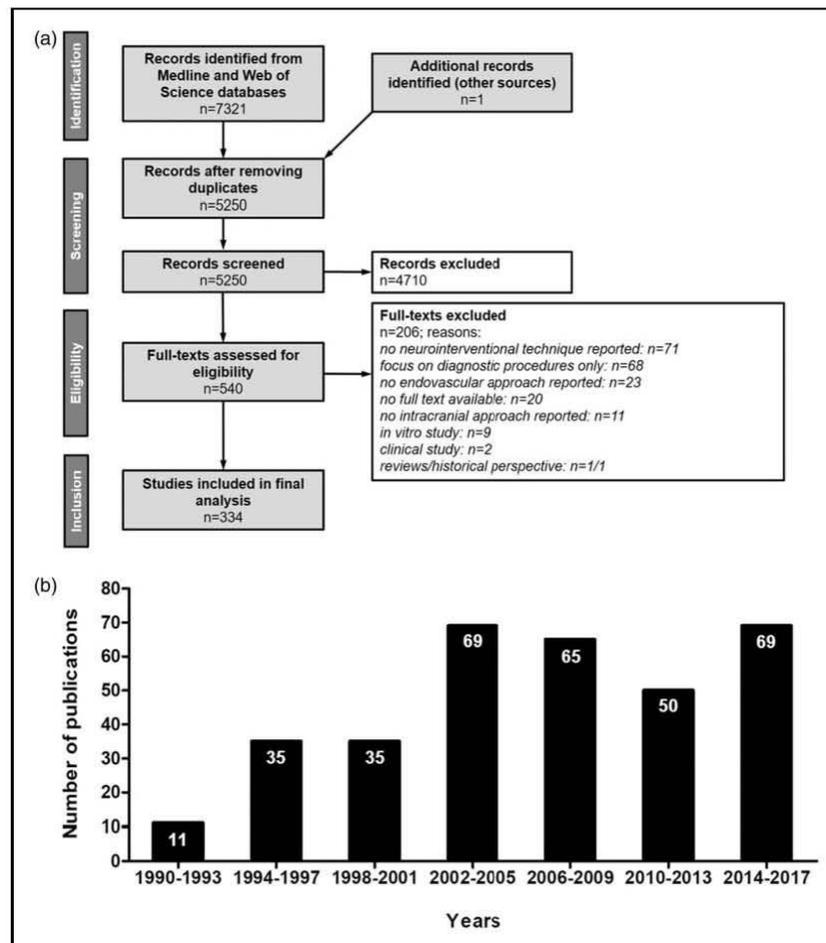
We identified 5250 articles after removal of search result duplicates. From those, 4710 abstracts did not meet the inclusion criteria and were excluded. The full text of the remaining 540 articles was assessed, and data were finally extracted from 334 papers (Figure 1(a)).

For model description, 56 different large animal models using intracranial vessels were identified through full text assessment, and additional 18 models were derived by checking the reference lists of these papers. Moreover, we identified 26 models using extracranial vessels. One paper was excluded during the full text assessment due to an unclear methodological approach.

The number of publications reporting large animal trials in neurointerventional research continuously increased from the 1990s until 2005 (Figure 1(b)). The numbers of publications slightly declined thereafter, but increased from 2014 reaching all-time highs. This is potentially due to the recent breakthroughs in the neurointerventional field, prompting many academic and industry groups to intensify translational research on novel techniques and products.

### Species and models

Table 1 provides a detailed overview on all species and models.



**Figure 1.** Study data. (a) PRISMA flow chart of selection process; systematic research in Medline and Web of Science databases, inclusion of studies that address neurointerventional research, test endovascular techniques and were performed in large animals (b) Study numbers show a continuous increase from 1990 until 2005, followed by a slight decline and a recent increase to all-time highs.

### Aneurysm models

Three different ways to induce an aneurysm in large animals are described (Figure 2(a)): elastase-induced aneurysms, venous pouch aneurysms, and use of artificial implants. Elastase-induced aneurysms imitate the biological and molecular environment of naturally occurring aneurysms and exhibit uninjured arterial walls.<sup>18</sup> On the other hand, they require time to mature,<sup>19</sup> are less reproducible in appearance,<sup>20</sup> and comparatively small.<sup>21</sup> Aneurysms created by venous pouches are commonly used, reliable aneurysm models<sup>22</sup> with reproducible characteristics such as consistent aneurysm size and neck diameters. Disadvantages are the surgical trauma required for induction, at least transient presence of suture threads, and the venous structure of the aneurysmal wall.<sup>20</sup> Aneurysms emerging from artificial implants provide good training opportunities for endovascular treatments such as

coiling,<sup>19</sup> but are expensive<sup>23</sup> and come at the risk of thrombus formation within the implant. Hybrid models connecting an artificial vascular tree with multiple aneurysms to an animal's circulation are also available for neurointerventional training purpose.<sup>19</sup>

In the analyzed literature, therapies were tested immediately after aneurysm induction (30.4%, 68/224) or after a maturation time of up to two weeks (17.9%, 40/224), up to four weeks (38.4%, 86/224), up to eight weeks (4.4%, 10/224), or after more than eight weeks of maturation (1.3%, 3/224). Some studies (7.6%, 17/224) did not mention aneurysm maturation time.

### Models of arterio-venous malformations

AVM models can be created by a carotid-jugular fistula, by using species exhibiting rete mirabile (RM), or

Table 1. Large animal models for aneurysm, AVM, ischemic stroke, carotid siphon including models using extracranial vessels.

Type	Location	Species	References	Advantages	Disadvantages
Aneurysm Elastase-induced Aneurysm	CCA	Dog, rabbit	63,18	Imitates biological and molecular environment, exhibits uninjured arterial walls	Requires time to mature, less consistent, comparatively small
	Carotid-jugular arteriovenous fistula	Rabbit	21		
Venous pouch Aneurysm	CCA-EJV	Dog, rabbit, pig, sheep	64,65,22,66	Reliable models with reproducible characteristics (consistent size, neck diameters)	Surgical trauma, presence of suture material and venous structure of aneurysmal wall
	CCA-EJV plus curved implant	Dog	49		
	CCA-femoral vein	NHP (Japanese monkey)	67		
	ECA-EJV	Dog	20		
Implant	Silicone aneurysm circuit, CCA-EJV	Dog	19	Good training model – endovascular treatments	Expensive, risk of thrombus development in implant
	Amplatz vascular plug, carotid-subclavian-renal arteries	Pig	23		
	CCA-IV	Pig	23		
AVM					
Carotid-jugular fistula	CCA-IV	Dog, NHP (rhesus monkey), cat	68,69,70,71	Easy induction	Does not provide AVM nidus
Rete mirabile (RM)	RM (anatomic arterial model)	Pig	26	Arterio-arterial malformation, suitable to study histopathological alterations	Not an arteriovenous connection, differs from real AVMs
	Carotid-jugular fistula, RM as Nidus	Pig, sheep	24,72		
Implant	Rostral rete-cavernous sinus, RM as Nidus	Pig	25	Creates relevant morphological characteristics of human AVM	Can occlude spontaneously
	Lingual artery-superior sagittal sinus (femoral artery)	Dog	27		
	MCA-superior sagittal sinus (superficial temporal artery, muscle graft)	Dog	28		
	MCAO, transorbital, occluding device, ligation	Dog, cat	38,73		
Ischemic stroke, permanent occlusion	MCAO, transorbital, occluding device, ligation	Dog, cat	38,73	Reproducible infarct size, reproducible neurological deficits, highly consistent vessel occlusion	Analysis of reperfusion not possible, diathermy can increase blood-brain barrier permeability
Extravascular device	MCAO, transorbital, occluding device, ligation	Dog, cat	38,73		
Extravascular electrocoagulation	MCAO	Pig, NHP (marmoset), sheep	32,34,30		
Intravascular artificial embolization	AchAO	Pig	31	Any required embolus shape, leads to more uniform infarcts, reducing variability	Final position of emboli depends on appropriate extent and quality of emboli, does not allow studying of thrombolysis
	MCAO	Dog, NHP (rhesus monkey)	43,45		

(continued)

Table 1. Continued

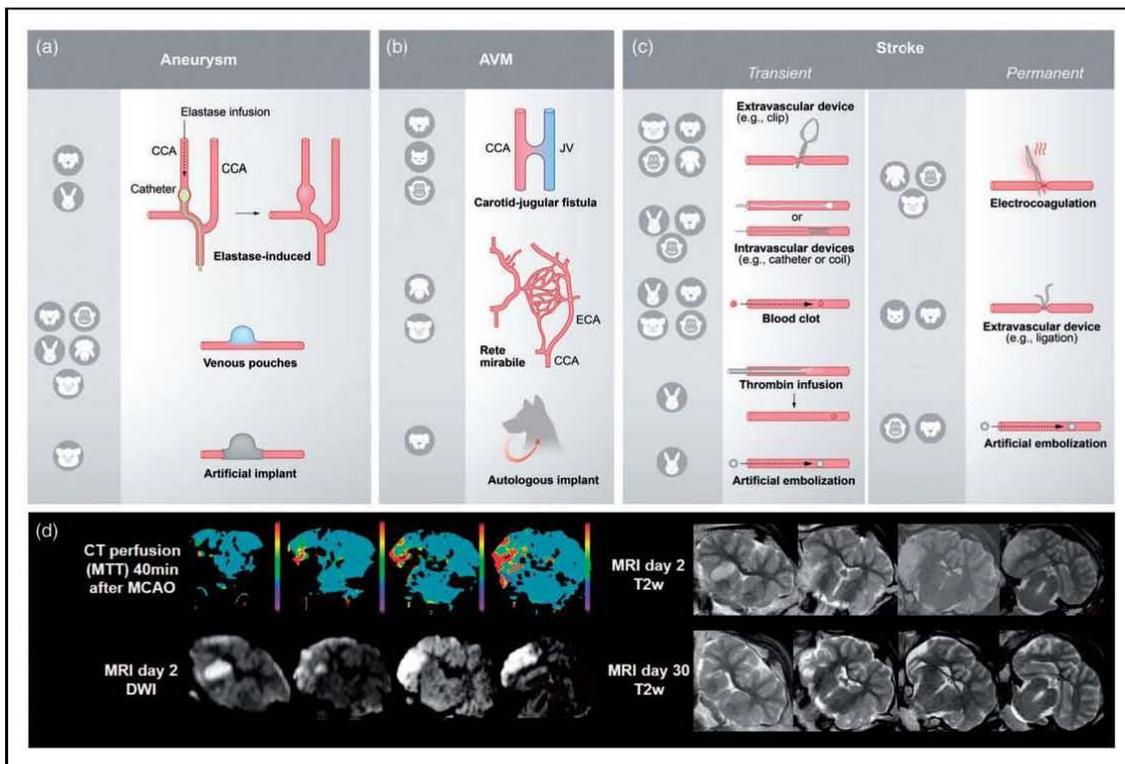
Type	Location	Species	References	Advantages	Disadvantages
<i>Ischemic stroke, transient occlusion</i>					
Extravascular device	ACAO, transorbital, clip	NHP (baboon)	74	Enables to investigate reperfusion, Reliable, consistent occlusion, less traumatic	Slightly more volatile, no exact simulation of hemodynamic reperfusion characteristics
	MCAO, transorbital, clip	NHP (squirrel monkey, baboon)	36,35		
Intravascular device	MCAO, clip	Dog, pig, sheep	75,76,33	Spatially and timely precise induction of the occlusion	Endovascular device placement technically challenging, requires surgical training, vasospasm is possible complication
	AchAO, clip	Pig	31		
	ACAO, coil	NHP (baboon)	77		
	MCAO, coil	Dog	40		
	PCAO, microcatheter	Rabbit	39		
Intravascular blood clot	MCAO	Dog, rabbit, NHP (cynomolgus monkey)	78,41,79	Simulates pathological procedure of human stroke, minimally invasive, allow studying thrombolytic or anticoagulative interventions, blood vessels remain intact	Final destination of thrombus hardly predictable, preparation of thrombus critical – important for successful deployment
	ICAO	Rabbit, pig, NHP (Rhesus or cynomolgus monkeys)	80,12,42		
Intravascular artificial embolization	basilar artery occlusion	Dog	81	Any required embolus shape, leads to more uniform infarcts, reducing variability	Final position of emboli depends on appropriate extent and quality of emboli, does not allow study of thrombolysis
	CCAO	Rabbit, pig	82,83		
	MCAO	Rabbit	44		
Intravascular thrombin infusion	MCAO	Rabbit	46	Reliable occlusion, opportunity to study thrombolysis	Does not result in uniformly sized infarcts
Ischemic stroke, spontaneous	MCAO, suspected embolus	Dog	47	Could play important role in research on stroke pathophysiology – similarities in neuroanatomy and clinical outcome, lack of confounding factors (anaesthesia, surgical trauma)	Low incidence of stroke in dogs, high variability, restricted to scenarios in which a maximal proximity to clinical situation is required

(continued)

Table 1. Continued

Type	Location	Species	References	Advantages	Disadvantages
<i>Artificial carotid siphon model</i>					
Artificial carotid siphon model	tortuous artery model, plastic curved rod ICA	Dog	49	Realistic environment to assess endovascular devices	Significant phenotypic diversity of the human CS, creation requires huge effort
	digital tube CCA	Dog	84,85		
	synthetic Dacron graft CCA	Pig	48		
	forelimb, brachial branch of subclavian artery	Pig	50	Simple, reproducible and technically less demanding	Vessel diameter does not approximate that of human ICA
<i>Models using extracranial vessels</i>					
Stroke	Renal artery blood clot	Dog	86	Arterial access much easier, diameter comparable to intracranial vessels	High simplification, less tortuous, differs with regard to arterial wall composition
	superficial femoral artery blood clot	Pig	87		
	iliofemoral bifurcation & kidney	Pig	88		
	diverse cervicocerebral arteries blood clot	Dog, rabbit, pig	89,90,91, 92,93,94,95		
	subclavian artery blood clot	Pig	96		
	Branches of subclavian artery	Pig	97		
Aneurysm/AVM	renal artery embolization	Dog, rabbit, pig	51,98,99	Suitable for recanalization studies	Differences in vascular characteristics as compared to cranial vessels
	kidney embolization	Dog	100		
	subclavian artery and branches device	Pig	101	Easier surgical access, vessel diameters similar to human cerebral vessels	Cannot simulate the complex geometry of AVMs
	femoral + subclavian artery embolization	Rabbit	102		
	femoral artery device	Dog	103		
	Silicon shunt femoral artery-vein device	NHP (baboon)	104		
	branching vessel of forelimb device	Pig	105		
	abdominal aorta device	Rabbit	106,107,108		
	abdominal aorta embolization	Sheep	109		
	auricular artery embolization	Rabbit	110		

CCA: common carotid artery; EJV: external jugular vein; ECA: external carotid artery; JV: jugular vein; MCA: middle cerebral artery; MCAO: middle cerebral artery occlusion; AchAO: anterior choroidal artery occlusion; ACAO: anterior cerebral artery occlusion; PCAO: posterior cerebral artery occlusion; ICAO: internal carotid artery occlusion; CCAO: common carotid artery occlusion; ICAO: internal carotid artery occlusion.



**Figure 2.** Illustration of the different techniques for model induction and utilization of clinical imaging procedures. (a) There are three different ways to induce an aneurysm model: elastase-induced aneurysms (aneurysm develops in a closed vessel by elastase infusion), venous pouches aneurysms (preparation of a venous pouch and suturing to artery, usually CCA) and use of artificial implants. Abbreviations: CCA: common carotid artery. (b) AVM models can be created by a carotid-jugular fistula (shunt between CCA and JV), use of RM in pigs and sheep, and use of autologous implants. Abbreviations: JV: jugular vein; ECA: external carotid artery. (c) Ischemic stroke models are based on transient or permanent occlusion of cerebral arteries. Extravascular and intravascular occlusion methods can be discriminated. Extravascular occlusion comprises electrocoagulation and the use of ligation, or occluding devices such as aneurysm clips. Intravascular occlusion can be induced by intravascular devices, such as aneurysm coils, blood clots, thrombin infusion or artificial emboli. (d) A major advantage of large animal models is the compatibility with clinical imaging technologies. Sample images were taken in a sheep after transient MCAO by a surgical clip (3-h occlusion time). Abbreviations: MTT: mean transit time; DWI: diffusion-weighted imaging; T2w: T2-weighted imaging. False color scale indicates MTTs from 0 (purple) to 10s (red). All images were taken on standard clinical scanner during an in-house study (data not published).

by using autologous implants (Figure 2(b)). Carotid-jugular fistulas can be induced easily, but do not provide an AVM nidus.<sup>24</sup> The RM in pigs and sheep can be used alternatively. The RM is the branching of the maxillary artery into a network of fine arteries, which then reunite to the internal carotid artery. Although not an arteriovenous connection,<sup>25</sup> the RM is an often utilized natural AVM model and suitable to study post-interventional histopathological alterations.<sup>26</sup> Artificial arteriovenous shunts utilizing the RM as the AVM nidus provide relevant morphological characteristics of human AVM, such as feeding artery, interposed nidus, and draining vein.<sup>24</sup> However, they are prone to the risk of spontaneous occlusion.<sup>25</sup> Further, AVMs can be induced by an autologous implant in

the cerebral circulation, such as an artery or a muscle graft with related artery. This procedure has immediate effects on cerebral circulation and provides a good simulation of pathophysiological conditions observed clinically.<sup>27,28</sup> However, excellent surgical skills are required to consistently create such AVM models.<sup>29</sup>

Therapy in AVM models is mainly tested immediately after AVM induction (72.7%, 24/33) or in some cases after a maturation time up to four weeks (18.2%, 6/33), and in rare cases even beyond that time (9.1%, 3/33).

#### Ischemic stroke models

Stroke models are based on permanent or transient occlusion of cerebral arteries (Figure 2(c)), mainly the

middle cerebral artery (MCA). Permanent occlusions models result in reproducible functional outcome and lesion size<sup>30,31</sup> but do not allow analysis of reperfusion.<sup>32</sup> Transient occlusion models tend to produce more volatile results, but enable to investigate reperfusion.<sup>33</sup>

Stroke induction can be discriminated into extravascular and intravascular occlusion methods. Extravascular occlusion involves neurosurgical access to the target vessel followed by ligation, electrocoagulation or occluding devices (e.g. aneurysm clips). Electrocoagulation is relatively easy to perform, leads to reproducible neurological deficits,<sup>34</sup> and highly consistent vessel occlusion. However, diathermy can increase blood–brain barrier permeability.<sup>32</sup> Vessel occlusion using clips or by ligation induces a reliable and consistent occlusion, which is less traumatic.<sup>35</sup> Transient vessel occlusion allows studying reperfusion effects, but hemodynamic characteristics are different from those seen in reperfusion.<sup>10</sup> Moreover, clip and thread handling can be challenging<sup>36</sup> and requires appropriate experimenter training. Extravascular occlusion needs transorbital access (mainly for the anterior or middle cerebral arteries<sup>37</sup>) or craniectomy (all major arteries accessible). Transorbital access only requires a small craniotomy in the orbita, and manipulation of surrounding tissue is minimized.<sup>38</sup> Disadvantages of this approach are eye loss and related postoperative complications, including abnormal behavior caused by vision defects.<sup>32</sup> Craniotomy results in a larger wound and is technically more demanding, but preserves the eye. Craniotomy is avoided when using intravascular occlusion models.

Intravascular occlusion requires endovascular access to the target vessel. It is induced by devices such as coils, blood clots, artificial emboli, or thrombin infusion. Intravascular devices such as coils or catheters enable a spatially and temporally precise stroke induction,<sup>39</sup> but endovascular device placement is technically challenging and requires intensive training to generate reproducible results. Moreover, vasospasm is a possible complication,<sup>40</sup> effecting many relevant outcome parameters. Using blood clots for vessel occlusion perfectly simulates the pathological mechanism of human stroke, is minimally invasive, and allows studying thrombolytic or anticoagulative interventions.<sup>41</sup> Another advantage is that blood vessels remain physically undamaged after thrombus deposition.<sup>42</sup> The major disadvantage is that the occlusion site is hardly predictable, making the outcome highly heterogeneous. Another critical factor is preparation of the thrombus, which critically influences its characteristics.<sup>41</sup> Artificial emboli made of silicone rubber or silicone-coated filaments provide a standardized but artificial alternative. These emboli could be of any required shape,<sup>43</sup> helping to define occlusion site and thereby leading to more uniform infarcts. This reduces variability,<sup>44,45</sup> but studying recanalization is not possible. Endovascular approaches

are not applicable for species exhibiting an RM.<sup>30,32</sup> Another possibility to produce a vessel occlusion also beyond the RM is thrombin infusion and subsequent thrombus formation. This method provides reliable occlusion and the opportunity to study recanalization, but induced infarcts are heterogeneous in size.<sup>46</sup>

Spontaneous stroke occurrence is reported in dogs and might play an important role in the investigation of stroke pathophysiology. There are no experimental confounding factors such as anesthesia or surgical trauma.<sup>47</sup> However, the low incidence of stroke in dogs, along with a high variability, restricts this model to scenarios in which a maximal proximity to the clinical situation is required in spite of inter-subject variability.

### Carotid siphon models

The human carotid siphon (CS) has unique anatomical bends which remain critical structures for endovascular catheter access to the intracranial vessels, in particular when using large-bore (5F or 6F) intermediate catheters for clot aspiration in acute stroke treatment or for facilitated navigation of flow-diverting stents in aneurysm therapy. In particular in elderly patients with increased CS tortuosity (Supplementary Figure 1), vascular access with these catheters may be impaired. On the other hand, too forceful manipulation during catheterization attempts may result into complications such as endothelial injury with vasospasm, dissection, thrombosis or even vessel perforation. Thus, new designs for intermediate cranial access catheters require testing using vascular models of the CS to evaluate important parameters like steerability/torquability, lubricity, stiffness, and durability under realistic *in vivo* conditions. Surgical CS models are created by using different implants and offer a realistic environment including pulsating blood flow and vascular responses for the assessment of endovascular devices in terms of vascular navigation.<sup>48</sup> However, there is a significant diversity in human CS anatomy<sup>49</sup> and each model can only represent one particular formation. Moreover, surgical implantation and creation of these models are technically challenging and require a recovery period before device testing. Alternatively, the human CS anatomy can be easily modelled by maximally flexing the porcine forelimb.<sup>50</sup> This creates a brachial artery tortuosity, resulting in an anatomical vessel configuration similar to that of the human CS. This method is simple, reproducible, and technically less demanding, but vessel diameter does not approximate that of the human ICA.<sup>50</sup>

### Models using extracranial vessels

Animal modeling of large vessel occlusion exclusively in the extracranial circulation has informed the

thrombectomy device design (Table 1), leading to efficient and effective technologies for treating stroke patients. For instance, research on thrombolysis and thrombectomy is sometimes performed on renal arteries, the superficial femoral artery, the iliofemoral bifurcation, the subclavian artery or its branches (mainly in pigs), and on different cervicocerebral arteries. The latter includes the lingual artery, maxillary artery, cervical arteries, external carotid artery (ECA), or ascending pharyngeal artery (APA). Aneurysm or AVM therapy is often simulated using renal arteries, which are suitable for recanalization studies.<sup>51</sup>

Simple metrics such as the angiographic evidence of recanalization are used to assess device efficacy. Importantly, the trauma caused to the vessel wall can be studied as well as the consequence of distal<sup>52</sup> emboli to a downstream organ (e.g., renal artery vascular occlusion models<sup>53</sup>). However, there are important limitations to these models that must be appreciated when interpreting the data. The first obvious point is that arteries of the brain have significant differences in structure,<sup>54</sup> mechanics<sup>55</sup> and function as compared to systemic arteries. Importantly, intradural arteries are not tethered or constrained in the perivascular environment. Additionally, the tortuosity of the human intracranial circulation is not seen in existing animal vascular occlusion models. It is for these reasons that an important complement to animal modeling includes *in vitro* vascular occlusion modeling in phantoms of patient-specific or population-based vascular replicas.<sup>56-61</sup> This combined approach has led to the development and ultimate regulatory approval of highly effective thrombectomy devices such as stent-retrievers and aspiration catheters.

However, the lack of the target organ of interest, namely the brain, is a critical limitation for the next evolution in stroke care.<sup>10</sup> Perhaps the optimal treatment will involve pre-thrombectomy neuroprotection,<sup>62</sup> direct to angioste mechanical thrombectomy for emergent large vessel occlusions, catheter-based delivery of thrombolytics to treat shed microemboli or other agents to further limit/alter the course of neuronal injury. When considering such a complex treatment solution, the variables are further compounded when considering dose of each treatment or route of delivery.

### ***Benefits and challenges of large animal models in neurointerventional research***

Large animal models offer several advantages and a higher similarity to the human situation compared to small animal models, which make them particularly attractive for neurointerventional research (Table 2).

In contrast to the situation in rodents, large animal and human brain anatomy share many similarities. Large animal brains are mostly gyrencephalic and

exhibit higher white matter content. This is important since white matter is more resilient to ischemia and therapeutic approaches targeting white matter are believed to have a wider therapeutic time window.<sup>111</sup> Moreover, white matter is important for higher brain function and plasticity. Another example is the comparatively rigid tentorium cerebelli in most large animal species, as compared to the soft structure in rodents. This plays a crucial role in the effects of edema and can aggravate consequences of intracerebral pressure<sup>112</sup> in humans and large animals alike. Moreover, large animals models can be used easily with clinical imaging equipment (Figure 2(d)).

Individual anatomical variations can impair model induction or the therapeutic approaches. Large animal strains are often outbred, increasing the likelihood of such variances. For instance, collateral vasculature or tortuous blood vessels as observed in pigs,<sup>76</sup> dogs,<sup>75</sup> and cats<sup>139</sup> can cause challenges in experimental interventions. Moreover, some species-specific anatomic prerequisites must be taken into consideration, the most prominent one being the RM.

Large animal experiments are often more complex than small animal studies. Training and pilot studies are therefore warranted to optimize the results of the main trial. The time and resource “loss” caused by such pilot experiments are often compensated by increased reliability and decreased variability in the main trial. This is of particular importance because large animal stroke models, such as the situation in human patients, tend to be more variable in outcome than their rodent counterparts. Pilot studies are also important to reveal at least basic information on effect sizes and thus required group/sample sizes in cases where small animal data are not available. This also helps to balance the number of required animals per group to maintain sufficient statistical power against ethical and financial constraints.

Pilot studies can further reveal whether model optimization can increase the amount or quality of information derived from the main experiment. In cases where an entirely new technical field is entered, pilot studies, together with consulting expert colleagues in large animal experimentation, help to select the appropriate large animal model.

Some genetically modified large animal strains exist and can be used to address special research questions. For instance, transgenic NHPs<sup>140</sup> or pigs<sup>141</sup> expressing green fluorescent protein have been reported. Transgenic large animal models are also available for other neurological disorders.<sup>142</sup>

### ***Types of interventions and therapies in the literature***

Experimental aneurysm therapies were reported by two-third (67.0%; 224/334) of all studies, 19.5%

Table 2. Advantages of large animal models for neurointerventional research.

	Small animal	Large animal	Human	References
Brain	Size	Small	Large	10,14,113
	Encephalization quotient (EQ)	0.4 (rat), 0.5 (mouse)	0.8 (sheep), 1.2 (dog) and 2.1 (rhesus monkey)	113,114
Anatomy	Lisencephalic	Gyrecephalic	Gyrecephalic	14,10,115-117,112
	Mouse: GM/WM: 90%/10% Rat: GM/WM: 88%/12% Soft tentorium cerebelli	Dog: GM/WM: 63%/37% Sheep: GM/WM: 70%/30% rhesus monkey: GM/WM: 68%/32% Rigid tentorium cerebelli	Gray matter: 55% White matter: 45% Rigid tentorium cerebelli	
Vascular supply	Similar to humans	Dog, rabbit, NHP: similar to humans torusity of canine ICA Sheep, pig, cat: rete mirabile (sheep, cat: ICA, pig: ascending pharyngeal artery)	Internal carotid artery (ICA), basiliary artery	40,46,42,72,118,119
Vessel	Size	Rat: MCA diameter 0.35-0.58 mm Diameter often too small for endovascular approaches	Similar to humans e.g. dog: MCA diameter 2-3.5 mm Diameter large enough for endovascular access	89,95,10,12,120-124
	physiology	Similar to humans	Similar to humans, e.g.: degree of vasospasm (dog) fibrinolytic response (rabbit) platelet response (NHP)	89,121,42
Circle of Willis (CW)	Rat, mouse: similar to humans, except missing anterior communicating artery	Dog, rabbit, monkey: similar to humans, except missing anterior artery and single median anterior cerebral artery (ACA)	Main arteries: internal carotid artery, vertebral artery contributing arteries: anterior cerebral artery, anterior communicating artery, posterior cerebral artery, posterior communicating artery, basilar artery	125-129
		Sheep and swine: different to humans: internal carotid artery forms large part of CW, irregular anterior communicating artery	Incidence of complete circle of Willis: 37.1% (overall); 43.8% (females); 31.2% (male) Most frequent of 28 variations of CW: absent posterior communicating artery (right side: 15.3%; left side: 10.9%; bilaterally: 17.1%) Clinical systems available	
Imaging	Dedicated small animal scanners required	Clinical systems applicable	Clinical systems available	
	X-ray-based	Possible (angiography, CT)	Standard routine	130,77,12,131,132
	Radionuclide	Possible (PET, SPECT)	Standard routine	133,134
	Nuclear magnetic resonance	Possible (NMR, MRI)	Standard routine	135,77
	Ultrasound	Possible, but rarely performed	Standard routine	136

(continued)

Table 2. Continued

	Small animal	Large animal	Human	References
Physiological parameter assessment	Recording	Easy	Standard routine	76,137,9,138
	Instrumentation	More challenging	Standard routine	76,137,9,138
	Simultaneous recording	Requires specialized device configuration Restricted	Human appliances can be used Possible, multiple parameters	76,137,9,138

ICA: internal carotid artery; NHP: non-human-primate; ACA: anterior cerebral artery; CT: computed tomography; PET: positron emission tomography; SPECT: single photon emission computed tomography; MRI: magnetic resonance imaging; NMR: nuclear magnetic resonance; GM: grey matter; WM: white matter.

(65/334) assessed stroke therapies, and 9.9% (33/334) AVM treatments. This is reasonable because aneurysm, stroke and AVMs are frequent and severe neurological disorders. Figure 3(a) to (c) provides detailed information on investigated approaches; 2.4% (8/334) of studies investigated conditions that were not defined in more detail; these included “intracranial lesions,” “abnormalities in central nervous system” or “brain injury” (referred to as “unspecified conditions” in Figure 3(c)); 1.2% (4/334) simulated carotid artery occlusive diseases.

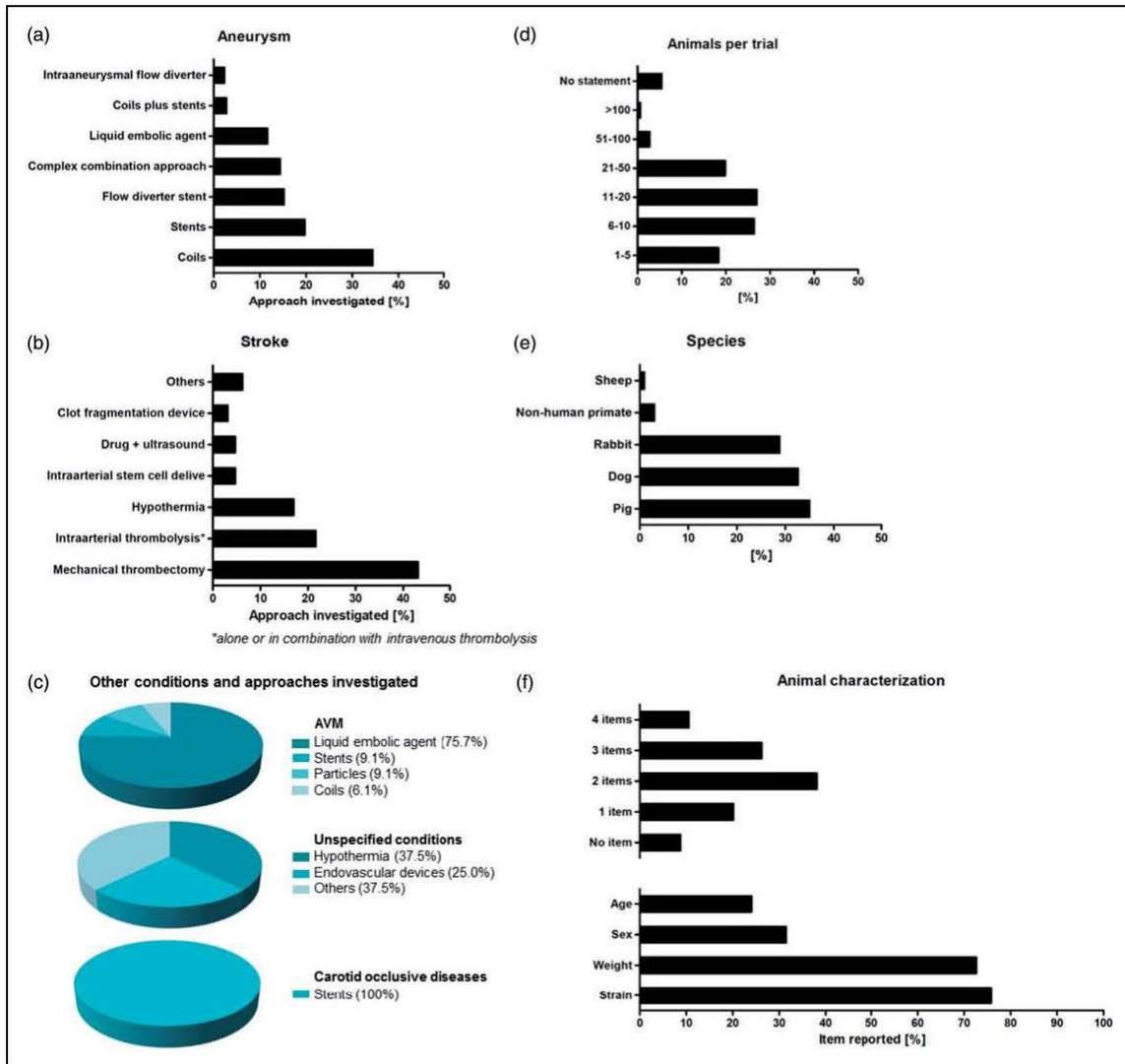
Most interventional aneurysm therapies focused on coils (34.4%, 77/224), followed by stents (19.6%, 44/224) and flow diverter stents (15.2%, 34/224). Studies also investigated liquid embolic agents or intraaneurysmal flow diverters, reflecting the technical progress in aneurysm therapy. Some therapeutic studies on aneurysms reported combined approaches. Those, for instance, comprised coils or stents in combination with additional effector substances (such as Onyx or fibroblasts,<sup>143,144</sup> 6.3%, 14/224), combined approaches using neck bridging devices (1.8%, 4/224), and micro-catheter-based delivery of stem cells,<sup>145</sup> hydrogels,<sup>146</sup> and other biomaterials<sup>147</sup> (5.4%, 12/224). Some combination approaches were only employed by very few studies, as is the case with unconventional approaches such as magnetic microparticles<sup>148</sup> (0.9%, 2/224).

Liquid embolic agents were primarily investigated in AVM therapy studies (75.8%, 25/33; Figure 3(c)). Expectedly, mechanical thrombectomy was the predominant technique investigated in stroke therapy studies (43.1%, 28/65; Figure 3(b)). Intraarterial thrombolysis was investigated by 21.5% (14/65) of the studies. A significant proportion of all studies on stroke therapy investigated hypothermia (16.9%, 11/65), which may improve the results of recanalization by neuroprotective effects.<sup>76</sup> Only a small part of the studies investigated the effects of intraarterially administered stem cells (4.6%, 3/65), an approach believed to promote neurological regeneration.

Interestingly, we also identified one paper that reported the off-label use of a stent-retriever to remove a misplaced stent.<sup>149</sup> This represents an innovative complication management approach that deserves further testing in animal studies for proving and refinement prior to use in patients.

**Study design**

Therapeutic efficacy was the most important endpoint assessed either alone or in combination with secondary endpoints. Almost one-third of all studies focused solely on efficacy (29.6%, 99/334), directly followed by studies assessing safety and efficacy (24.2%, 81/334), or feasibility and efficacy (17.7%, 59/334).



**Figure 3.** Applied therapies in analyzed studies. (a) Aneurysms: main focus was on coils, stents and flow diverter stents (b) stroke: dominant therapy was mechanical thrombectomy, a recognized alternative to intravenous thrombolysis (c) AVMs: majority of studies investigated liquid embolic agents; unspecified conditions (e.g. “intracranial lesions,” “abnormalities in central nervous system” or “brain injury”): focus was on hypothermia and endovascular devices; carotid occlusive diseases: all studies investigated stents. Information about animals: (d) Number of animals: almost half of the studies used only up to 10 animals. (e) Occurrence of different species: most commonly used species were pigs and dogs, followed by rabbits (f) Animal characteristics: only a minority of studies reported all four items – strain, weight, sex and age.

The minority of studies focused on feasibility (11.1%, 37/334) or safety (6.9%, 23/334) alone, some studies assessed safety and feasibility (7.5%, 25/334). The minority of studies (3%, 10/334) investigated the triad of feasibility, safety and efficacy simultaneously.

Some papers (23.7%, 79/334) reported acute studies (no reawakening and survival of experimental subjects), 70% (234/334) reported survival studies, and 6.3% (21/

334) featured both, non-survival and survival experiments. The follow-up periods were up to one day (1.2%, 3/255), up to three days (0.4%, 1/255), up to one week (2.7%, 7/255), up to two weeks (9%, 23/255), up to one month (21.2%, 54/255), between one and two months (15.7%, 40/255), between three and six months (36.5%, 93/255), and over six months (10.6%, 27/255). Some studies did not report the follow-up period (2.7%, 7/255).

Study objectives define study duration and follow-up periods. For instance, acute studies are adequate for feasibility and safety assessments, as potential adverse events such as tissue damage can be investigated immediately. On the other hand, survival studies allow observation of short- and long-term effects including possible disadvantages of an approach that emerge at later stages. The stroke academic and industry round table (STAIR) expert consortium generally recommends long-term studies in efficacy-oriented stroke research.<sup>16</sup> The situation may slightly differ in neurointerventional studies in which for instance successful recanalization may serve as the major efficacy endpoint. Long-term observation is nevertheless advantageous when identifying delayed effects or complications such as aneurysm recanalization in experimental aneurysm therapy,<sup>150</sup> and provide a more complete context of effects. Life span of large animals allows for observation times of a year or even more.

Lack of randomization and blinding is believed to account for a significant proportion of false-positive study results.<sup>151</sup> Surprisingly, most large animal studies we assessed were neither designed in randomized nor blinded fashion (65.9%, 220/334). Only 12.6% (42/334) randomized experimental subjects and only 4.1% (14/334) featured a completely blinded study design; 17.4% (58/334) studies only blinded analysis of selected endpoints.

Since more investigators are usually required to perform large animal studies, complete blinding might indeed be challenging. A potential solution is to separate model induction from testing the diagnostic or therapeutic paradigm, for instance by randomization right after stroke induction, as well as to strictly separate the experimenters acquiring data from those who perform data analysis.

#### ***Animal numbers and animal characterization***

Almost half of the studies only used up to 10 animals in total (44.6%, 149/334), making inter-group comparisons statistically challenging. In contrast, only a minority used more than 50 animals (3.3%, 9/334) (Figure 3(d)). Very few studies described details of animal housing and care (5.7%, 19/334). More than four fifths (82%, 274/334) of all studies reported some details on the applied anesthesia protocol. The majority gave precise information about used anesthetics (63.4%, 212/334), but some studies only provide unspecific or basic information (18.6%, 62/334). Nearly 20% of studies did not provide any information on medication at all, including anesthesia (18%, 60/334). Not even 10% of all studies (9.3%, 31/334) did report details on the use of analgesics.

Animal strain was reported most frequently (75.8%, 253/334), followed by weight (72.2%, 241/334) and sex

(31.4%, 105/334) (Figure 3(f)). Age was reported by less than a fourth of all studies (24%, 80/334), and from those about one-third (27/80) only provided an unspecific classification (e.g. “adult” or “juvenile”). More than half of the studies reported one to three characteristics (60.2%, 201/334), but only 10.5% (35/334) reported all four items (strain, weight, sex, age), while 8.7% (29/334) did not provide any of such information. Information about the animals is not only essential for reproducibility of a study, but also of relevance for study result interpretation since strain, age and sex can influence both the model and the intervention.<sup>16</sup>

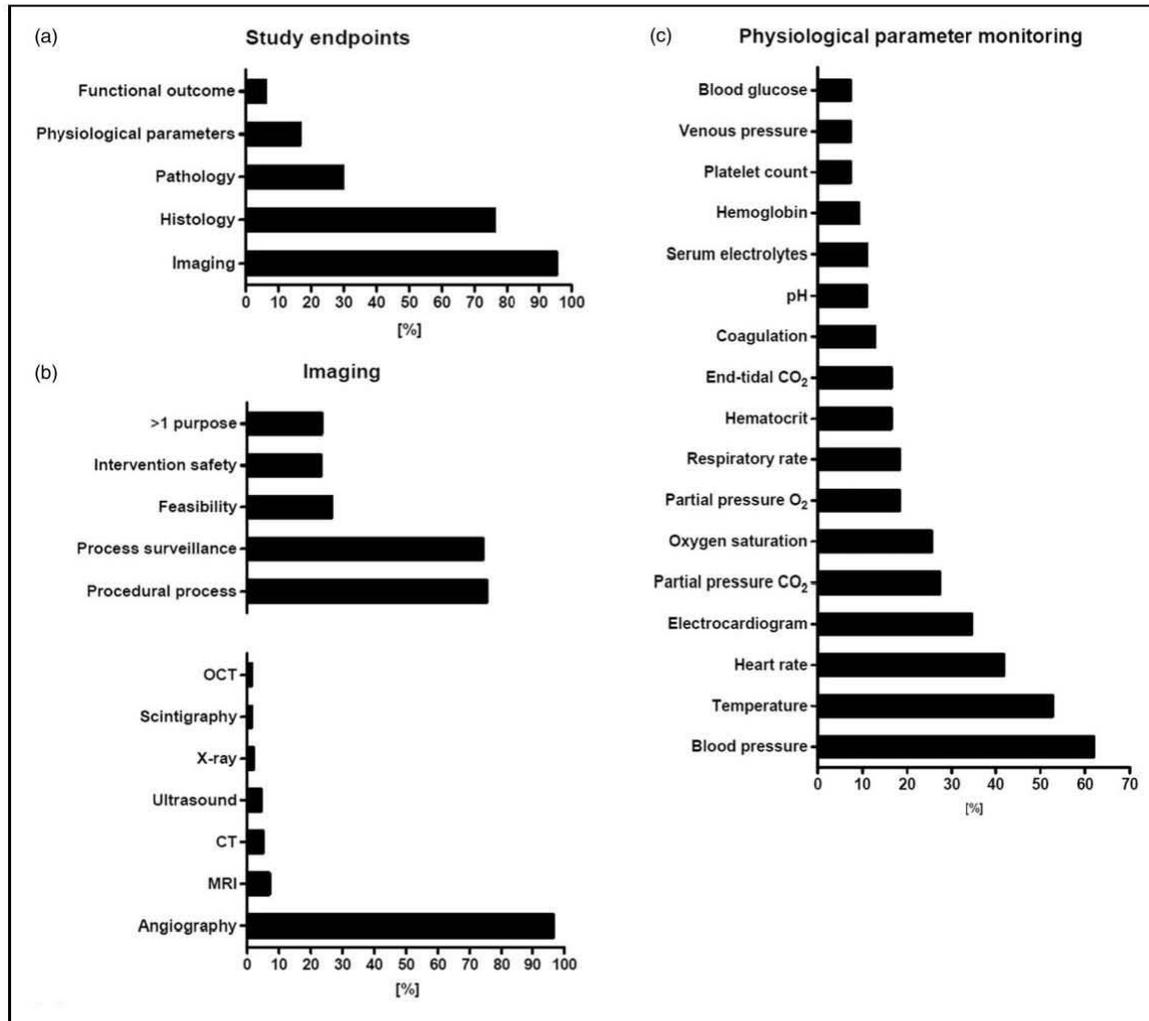
No studies reported the use of subjects exhibiting comorbidities. This can be explained by the fact that comorbidities in large animals are not genetically induced, but naturally occur with age, distress, malnutrition, and other factors as is the case in humans. Therefore, comorbid large animals exhibit extremely heterogeneous phenotypes and subjects require a long time to develop these comorbidities, impairing their use.

#### ***Selection criteria***

Only very few studies applied a priori defined selection criteria (4.8%, 16/334). Of these, 50% (8/16) reported specific inclusion criteria, 37.5% (6/16) reported the use of inclusion criteria but did not specify them, and 12.5% (2/16) reported exclusion criteria. None of the studies used both inclusion and exclusion criteria. Similarly, just a few studies mentioned post hoc exclusion of animals (11.1%, 37/334) with all, but one study providing the specific reason for subject exclusion. Some studies reported animal death prior to study conclusion, but inclusion of these cases into analysis (2.1%, 7/334). Information on inclusion and exclusion criteria is essential to ensure reproducibility. These criteria should be determined at the beginning of the study and mentioned in the publication. Animal health condition should be covered by inclusion criteria.

#### ***Endpoint assessment and readout parameters***

Imaging endpoints dominated the evaluation process (95.1%, 318/334; referred to as “study endpoints” in Figure 4(a)), what reflects the uncomplicated use of clinical imaging modalities with large animal models as well as the high importance of imaging technologies and imaging-based endpoints in clinical neurointerventional routine and research. Imaging has been used in most cases to prove therapeutic (and sometimes model) efficacy (73.9%, 235/318; referred to as “process surveillance” in Figure 4(b)), for instance to detect revascularization after vessel occlusion or occlusion of an aneurysm. More than two-third of studies using imaging for outcome assessment have also used imaging to



**Figure 4.** Overview of endpoint assessment in analyzed studies. (a) Evaluation process: frequent use of imaging (reflecting uncomplicated use in large animals) and histology. Only 16.5% evaluated physiological parameters. Behavioral tests are applied in stroke research (b) Data about imaging: clearly dominated by angiography (well qualified for use in neurointerventional research). Most common use for imaging was to prove efficacy and for procedural process. (c) Presentation of physiological parameters: dominated by blood pressure, temperature, heart rate and electrocardiogram. CT: computed tomography; MRI: magnetic resonance imaging; OCT: optical coherence tomography.

control for model performance, adequate model handling, and lesion induction (75.2%, 239/318; referred to as “procedural process” in Figure 4(b)). Angiography is particularly suitable for endovascular procedures, as it can be used to visualize blood flow and hemodynamic changes in the blood vessel, while simultaneously allowing potential interventions. Hence, it is not surprising that angiography was by far the most frequently used imaging procedure (96.5%, 307/318). Other modalities were used with much lower frequency. Examples comprise MRI (6.9%, 22/318), CT (5%, 16/318), ultrasound (4.4%, 14/318), or conventional X-rays and

fluoroscopy (1.9%, 6/318; Figure 4(b)). The lower number of studies using such modalities can be explained by the fact that MRI and in particular diffusion weighted imaging may be important in some areas such as stroke research and treatment, but are less important for aneurysm or AVM assessment as the major domains of large animal models in neuroendovascular research. There is still a lack of data reporting variability of imaging endpoints such as ischemic volume on MRI following MCA occlusion. However, such information is important for defining sample sizes for efficacy endpoints.

Histological examination was the second most frequent method employed for evaluation (76.1%, 254/334; Figure 4(a)). Histology is useful for safety assessment, for example to evaluate the inflammatory response or vessel wall damage, and almost half of the studies (41.6%, 139/334) indeed assessed safety alone or in combination with other endpoints. Moreover, histology can assess efficacy aspects such as endothelialization or neointima formation after coil placement.

Behavioral tests can be performed on pigs,<sup>31</sup> dogs,<sup>152</sup> rabbits,<sup>153</sup> NHPs,<sup>154</sup> and sheep.<sup>30</sup> However, only a small proportion of the studies used behavioral endpoints (6%, 20/334; Figure 4(a)). Interestingly, all of these studies focused on stroke. In turn, almost a third of studies focusing on stroke included behavioral tests (30.7%, 20/65). Behavioral tests are a valid option to investigate functional effects of stroke lesion induction and therapy. The STAIR committee<sup>16,17</sup> recommends at least two outcome measurements allowing both functional and morphological assessment in stroke research, what shall also account for large animal models.

Some studies measured brain temperature (3.9%, 13/334) or intra-aneurysmal pressure (1.5%, 5/334), while others specifically investigated mortality and morbidity (1.2%, 4/334). Only few studies reported special aspects such as radiation dosimetry (0.6%, 2/334), coil insertion pressure, stereographic photography, liquid scintillation counting (0.3% each, 1/334), drawing blood samples (0.6%, 2/334), pressure transducers in the RM, cerebrospinal fluid sampling, or cerebral blood flow (0.3% each, 1/334).

Not even one-fifth of all studies evaluated physiological parameters (16.5%, 55/334). This is surprising, because recording of physiological parameters in large animal models is even less complicated than in rodents, and a broad spectrum of physiological parameters may be recorded easily, and simultaneously. Blood pressure was the predominant parameter recorded (61.8%, 34/55), followed by temperature (52.7%, 29/55), heart rate (41.8%, 23/55), and electrocardiogram (34.6%, 19/55; Figure 4(c)). End-tidal isoflurane, end-tidal O<sub>2</sub>, body weight, cardiac output, intracranial pressure, electroencephalogram, d-dimer (3.6% each, 2/55), hemograms, renal function during surgery, motor-evoked potentials, and auditory brain stem response (1.8% each, 1/55) were investigated rarely. Some studies 5.5% (3/55) reported measuring of physiological parameters, but without any further details including the particular parameters monitored.

STAIR<sup>16,17</sup> recommends rigorous physiological monitoring to control for potential side effects of surgery, and to reduce or at least explain infarct size variability. This recommendation can be extended to neurointerventional research using large animals. Reporting of some core physiological parameters such

as blood pressure, temperature, and heart rate should be mandatory. Recording of additional physiological depends on the respective study objective. For example, in studies featuring hypothermia, monitoring of blood gases is essential as these are influenced by body temperature.<sup>155</sup> Any study should record physiological parameters not only at the beginning and the end of an experiment, but also in the meaningful intervals throughout the procedure. Measuring physiological parameters is an elegant way to derive the maximum of information from a single experimental subject, facilitating result interpretation and, if necessary, providing a thorough basis for subject exclusion.

Only 0.6% (2/334) of the studies clearly defined study endpoints, but these featured both primary and secondary endpoints. This is nevertheless a surprisingly low number. Large animal models are primarily used in confirmative and translational research, often as the last experimental step prior to clinical application, and thus critically depend on a clear definition of study objectives and, thereby, primary and secondary endpoints.

## Conclusion

Large animal models offer many important benefits – foremost to mention their similarities to human brain and vascular anatomy – that make them attractive for neurointerventional research. New endovascular approaches can be developed and refined in large animal experiments, which may improve minimal-invasive neurointerventional therapy for patients in future. On the other hand, large animal studies are laborious and expensive. Careful study planning, deriving maximum information from each study subject, and transparently reporting negative data or pitfalls are therefore essential. Tapping the full potential of large animal models critically requires careful outweighing the individual advantages and disadvantages of animal models, carefully selecting the model best suitable to answer the research question, and implementation of improvements where required, as well as maximally precise study design.

## Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: only intramural funds were used for this work.

## Acknowledgements

The authors wish to explicitly thank Dr. Larisa Bulavina for providing the professional illustrations in Figure 2(a) to (c).

## Declaration of conflicting interests

The author(s) declared the following potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or

publication of this article: SM: consultancy and honoraria as member of the scientific advisory board (Acandis GmbH); travel support (Covidien/Medtronic; Microvention; Stryker); study grant (money paid to institution; Bracco S.p.A.); JB: consultancy and honoraria (Acandis GmbH). All other authors declare that they have no conflict of interest.

### Availability of data and material

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on request.

### Supplementary material

Supplementary material for this paper can be found at the journal website: <http://journals.sagepub.com/home/jcb>

### References

- Campbell BCV, Donnan GA, Lees KR, et al. Endovascular stent thrombectomy: the new standard of care for large vessel ischaemic stroke. *Lancet Neurol* 2015; 14: 846–854.
- Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, et al. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med* 2015; 372: 1019–1030.
- Campbell BCV, Hill MD, Rubiera M, et al. Safety and efficacy of solitaire stent thrombectomy: individual patient data meta-analysis of randomized trials. *Stroke* 2016; 47: 798–806.
- Albers GW, Marks MP, Kemp S, et al. Thrombectomy for stroke at 6 to 16 hours with selection by perfusion imaging. *N Engl J Med* 2018; 378: 708–718.
- Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, et al. Thrombectomy 6 to 24 hours after stroke with a mismatch between deficit and infarct. *N Engl J Med* 2018; 378: 11–21.
- Jovin TG, Albers GW and Liebeskind DS. Stroke treatment academic industry roundtable: the next generation of endovascular trials. *Stroke* 2016; 47: 2656–2665.
- Kallmes DF, Hanel R, Lopes D, et al. International retrospective study of the pipeline embolization device: a multicenter aneurysm treatment study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2015; 36: 108–115.
- Ginsberg MD and Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 1989; 20: 1627–1642.
- Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J* 2003; 44: 85–95.
- Mehra M, Henninger N, Hirsch JA, et al. Preclinical acute ischemic stroke modeling. *J Neurointerv Surg* 2012; 4: 307–313.
- Xu X-Q, Cheng Q-G, Zu Q-Q, et al. Comparative study of the relative signal intensity on DWI, FLAIR, and T2 images in identifying the onset time of stroke in an embolic canine model. *Neurol Sci* 2014; 35: 1059–1065.
- Gralla J, Schroth G, Remonda L, et al. A dedicated animal model for mechanical thrombectomy in acute stroke. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27: 1357–1361.
- Kuge Y, Yokota C, Tagaya M, et al. Serial changes in cerebral blood flow and flow-metabolism uncoupling in primates with acute thromboembolic stroke. *J Cerebr Blood Flow Metab* 2001; 21: 202–210.
- Boltze J, Nitzsche F, Jolkkonen J, et al. Concise review: increasing the validity of cerebrovascular disease models and experimental methods for translational stem cell research. *Stem Cells* 2017; 35: 1141–1153.
- Sorby-Adams AJ, Vink R and Turner RJ. Large animal models of stroke and traumatic brain injury as translational tools. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2018; 315: R165–R190.
- Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR). Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 1999; 30: 2752–2758.
- Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke* 2009; 40: 2244–2250.
- Altes TA, Cloft HJ, Short JG, et al. 1999 ARRS Executive Council Award. Creation of saccular aneurysms in the rabbit: a model suitable for testing endovascular devices. American Roentgen Ray Society. *AJR Am J Roentgenol* 2000; 174: 349–354.
- Namba K, Mashio K, Kawamura Y, et al. Swine hybrid aneurysm model for endovascular surgery training. *Interv Neuroradiol* 2013; 19: 153–158.
- Raymond J, Salazkin I, Metcalfe A, et al. Lingual artery bifurcation aneurysms for training and evaluation of neurovascular devices. *AJNR Am J Neuroradiol* 2004; 25: 1387–1390.
- Ding Y, Dai D, Kadirvel R, et al. Creation of large elastase-induced aneurysms: presurgical arterial remodeling using arteriovenous fistulas. *AJNR Am J Neuroradiol* 2010; 31: 1935–1937.
- Guglielmi G, Ji C, Massoud TF, et al. Experimental saccular aneurysms. II. A new model in swine. *Neuroradiology* 1994; 36: 547–550.
- Mühlenbruch G, Nikoubashman O, Steffen B, et al. Endovascular broad-neck aneurysm creation in a porcine model using a vascular plug. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2013; 36: 239–244.
- Massoud TF, Ji C, Viñuela F, et al. An experimental arteriovenous malformation model in swine: anatomic basis and construction technique. *AJNR Am J Neuroradiol* 1994; 15: 1537–1545.
- Chaloupka JC, Viñuela F, Robert J, et al. An in vivo arteriovenous malformation model in swine: preliminary feasibility and natural history study. *AJNR Am J Neuroradiol* 1994; 15: 945–950.
- Lylyk P, Viñuela F, Vinters HV, et al. Use of a new mixture for embolization of intracranial vascular malformations. Preliminary experimental experience. *Neuroradiology* 1990; 32: 304–310.
- Yamada M, Miyasaka Y, Irikura K, et al. A canine model of intracranial arteriovenous shunt with acute cerebral venous hypertension. *Neurol Res* 1998; 20: 73–78.
- Pietilä TA, Zabramski JM, Thèllier-Janko A, et al. Animal model for cerebral arteriovenous malformation. *Acta Neurochir* 2000; 142: 1231–1240.

29. Xu M, Xu H and Qin Z. Animal models in studying cerebral arteriovenous malformation. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 178407.
30. Boltze J, Förschler A, Nitzsche B, et al. Permanent middle cerebral artery occlusion in sheep: a novel large animal model of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28: 1951–1964.
31. Tanaka Y, Imai H, Konno K, et al. Experimental model of lacunar infarction in the gyrencephalic brain of the miniature pig: neurological assessment and histological, immunohistochemical, and physiological evaluation of dynamic corticospinal tract deformation. *Stroke* 2008; 39: 205–212.
32. Imai H, Konno K, Nakamura M, et al. A new model of focal cerebral ischemia in the miniature pig. *J Neurosurg* 2006; 104: 123–132.
33. Wells AJ, Vink R, Blumbergs PC, et al. A surgical model of permanent and transient middle cerebral artery stroke in the sheep. *PLoS One* 2012; 7: e42157.
34. Marshall JW and Ridley RM. Assessment of functional impairment following permanent middle cerebral artery occlusion in a non-human primate species. *Neurodegeneration* 1996; 5: 275–286.
35. Spetzler RF, Selman WR, Weinstein P, et al. Chronic reversible cerebral ischemia: evaluation of a new baboon model. *Neurosurgery* 1980; 7: 257–261.
36. Hudgins WR and Garcia JH. Transorbital approach to the middle cerebral artery of the squirrel monkey: a technique for experimental cerebral infarction applicable to ultrastructural studies. *Stroke* 1970; 1: 107–111.
37. Huang J, Mocco J, Choudhri TF, et al. A modified transorbital baboon model of reperfused stroke. *Stroke* 2000; 31: 3054–3063.
38. Diaz FG, Mastro AR, Ausman JI, et al. Acute cerebral revascularization; part I. Cerebral ischemia experimental animal model. *Surg Neurol* 1979; 12: 353–362.
39. English JD, Hettis SW, El-Ali A, et al. A novel model of large vessel ischemic stroke in rabbits: microcatheter occlusion of the posterior cerebral artery. *J Neurointerv Surg* 2015; 7: 363–366.
40. Rink C, Christoforidis G, Abduljalil A, et al. Minimally invasive neuroradiologic model of preclinical transient middle cerebral artery occlusion in canines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 14100–14105.
41. Feng L, Liu J, Chen J, et al. Establishing a model of middle cerebral artery occlusion in rabbits using endovascular interventional techniques. *Exp Ther Med* 2013; 6: 947–952.
42. Qureshi AI, Suri MFK, Ali Z, et al. Intraarterial reteplase and intravenous abciximab for treatment of acute ischemic stroke. A preliminary feasibility and safety study in a non-human primate model. *Neuroradiology* 2005; 47: 845–854.
43. Molinari GF. Experimental cerebral infarction. I. Selective segmental occlusion of intracranial arteries in the dog. *Stroke* 1970; 1: 224–231.
44. Yang J-P, Liu H-J and Liu R-C. A modified rabbit model of stroke: evaluation using clinical MRI scanner. *Neurol Res* 2009; 31: 1092–1096.
45. Molinari GF, Moseley JI and Laurent JP. Segmental middle cerebral artery occlusion in primates: an experimental method requiring minimal surgery and anesthesia. *Stroke* 1974; 5: 334–339.
46. Jahan R, Stewart D, Vinters HV, et al. Middle cerebral artery occlusion in the rabbit using selective angiography: application for assessment of thrombolysis. *Stroke* 2008; 39: 1613–1615.
47. Thomsen BB, Gredal H, Wrenfeldt M, et al. Spontaneous ischaemic stroke lesions in a dog brain: neuropathological characterisation and comparison to human ischaemic stroke. *Acta Vet Scand* 2017; 59: 7.
48. Georganos SA, Guilbert F, Salazkin I, et al. Surgical construction of an in vivo carotid siphon model to test neurovascular devices. *Neurosurgery* 2004; 54: 1239–1243; discussion 1243.
49. Nakayama Y, Satow T, Funayama M, et al. Construction of 3 animal experimental models in the development of honeycomb microporous covered stents for the treatment of large wide-necked cerebral aneurysms. *J Artif Organs* 2016; 19: 179–187.
50. Carniato S, Mehra M, King RM, et al. Porcine brachial artery tortuosity for in vivo evaluation of neuroendovascular devices. *AJNR Am J Neuroradiol* 2013; 34: E36–E38.
51. Sadato A, Taki W, Ikada Y, et al. Experimental study and clinical use of poly(vinyl acetate) emulsion as liquid embolisation material. *Neuroradiology* 1994; 36: 634–641.
52. Nogueira RG, Levy EI, Gounis M, et al. The Trevo device: preclinical data of a novel stroke thrombectomy device in two different animal models of arterial thrombo-occlusive disease. *J Neurointerv Surg* 2012; 4: 295–300.
53. Jahan R. Solitaire flow-restoration device for treatment of acute ischemic stroke: safety and recanalization efficacy study in a swine vessel occlusion model. *AJNR Am J Neuroradiol* 2010; 31: 1938–1943.
54. Stehbens WE. *Pathology of the cerebral blood vessels*. Saint Louis: Mosby, 1972.
55. Monson KL, Goldsmith W, Barbaro NM, et al. Axial mechanical properties of fresh human cerebral blood vessels. *J Biomech Eng* 2003; 125: 288–294.
56. Chueh JY, Wakhloo AK and Gounis MJ. Effectiveness of mechanical endovascular thrombectomy in a model system of cerebrovascular occlusion. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012; 33: 1998–2003.
57. Chueh J-Y, Kühn AL, Puri AS, et al. Reduction in distal emboli with proximal flow control during mechanical thrombectomy: a quantitative in vitro study. *Stroke* 2013; 44: 1396–1401.
58. Gounis MJ, Wakhloo AK and Chueh J-Y. Preclinical investigations for thrombectomy devices – does it translate to humans? *Stroke* 2013; 44: S7–S10.
59. Chueh J-Y, Puri AS, Wakhloo AK, et al. Risk of distal embolization with stent retriever thrombectomy and ADAPT. *J Neurointerv Surg* 2016; 8: 197–202.
60. Fennell VS, Setlur Nagesh SV, Meess KM, et al. What to do about fibrin rich ‘tough clots’? Comparing the Solitaire stent retriever with a novel geometric clot

- extractor in an in vitro stroke model. *J Neurointerv Surg* 2018; 10: 907–910.
61. Nawka MT, Fiehler J, Spallek J, et al. Current status of training environments in neuro-interventional practice: are animal models still contemporary? *J Neurointerv Surg*. Epub ahead of print 26 July 2018. DOI: 10.1136/neurintsurg-2018-014036.
  62. Fisher M and Saver JL. Future directions of acute ischaemic stroke therapy. *Lancet Neurol* 2015; 14: 758–767.
  63. Shi W-Y, Li M-H, Yan L, et al. Creation of carotid fusiform aneurysm in a canine model. *Neurosurg Quarter* 2012; 22: 255–260.
  64. German WJ and Black SP. Experimental production of carotid aneurysms. *N Engl J Med* 1954; 250: 104–106.
  65. Forrest MD and O'Reilly GV. Production of experimental aneurysms at a surgically created arterial bifurcation. *AJNR Am J Neuroradiol* 1989; 10: 400–402.
  66. Stehbens WE. Histological changes in chronic experimental aneurysms surgically fashioned in sheep. *Pathology* 1997; 29: 374–379.
  67. Tenjin H, Ueda S, Fushiki S, et al. Experimental production of carotid artery aneurysms in Japanese monkey. *J Kyoto Pref Univ Med* 1994; 103: 715–720.
  68. Geremia G, Bakon M, Brennecke L, et al. Experimental arteriovenous fistulas: treatment with porous metallic stents. *AJNR Am J Neuroradiol* 1995; 16: 1965–1973.
  69. Scott BB, McGillicuddy JE, Seeger JF, et al. Vascular dynamics of an experimental cerebral arteriovenous shunt in the primate. *Surg Neurol* 1978; 10: 34–38.
  70. Spetzler RF, Wilson CB, Weinstein P, et al. Normal perfusion pressure breakthrough theory. *Clin Neurosurg* 1978; 25: 651–672.
  71. Tokiwa K, Miyasaka Y, Irikura K, et al. The effects of a carotid-jugular fistula on cerebral blood flow in the cat: an experimental study in the chronic period. *Neurol Res* 1995; 17: 297–300.
  72. Qian Z, Climent S, Maynar M, et al. A simplified arteriovenous malformation model in sheep: feasibility study. *AJNR Am J Neuroradiol* 1999; 20: 765–770.
  73. Hayakawa T and Waltz AG. Intracranial pressure, blood pressure, and pulse rate after occlusion of a middle cerebral artery in cats. *J Neurosurg* 1975; 43: 399–407.
  74. Liu XG, Branston NM, Kawauchi M, et al. A model of acute focal ischemia in the territory of the anterior cerebral artery in baboons. *Stroke* 1992; 23: 40–44.
  75. Mullan JC, Korosue K and Heros RC. The use of somatosensory evoked potential monitoring to produce a canine model of uniform, moderately severe stroke with permanent arterial occlusion. *Neurosurgery* 1993; 32: 967–973; discussion 973.
  76. Mattingly TK, Denning LM, Siroen KL, et al. Catheter based selective hypothermia reduces stroke volume during focal cerebral ischemia in swine. *J Neurointerv Surg* 2016; 8: 418–422.
  77. Schwartz AE and Pile-Spellman J. New model of reperfusion stroke by occlusion of the anterior cerebral artery in baboons. *Acta Neurochir* 2011; 153: 327–331.
  78. Chung D-J, Choi C-B, Lee S-H, et al. Intraarterially delivered human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in canine cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 2009; 87: 3554–3567.
  79. Kito G, Nishimura A, Susumu T, et al. Experimental thromboembolic stroke in cynomolgus monkey. *J Neurosci Methods* 2001; 105: 45–53.
  80. Benes V, Zabramski JM, Boston M, et al. Effect of intra-arterial tissue plasminogen activator and urokinase on autologous arterial emboli in the cerebral circulation of rabbits corrected. *Stroke* 1990; 21: 1594–1599.
  81. Qureshi AI, Boulos AS, Hanel RA, et al. Randomized comparison of intra-arterial and intravenous thrombolysis in a canine model of acute basilar artery thrombosis. *Neuroradiology* 2004; 46: 988–995.
  82. Lapchak PA, Araujo DM, Pakola S, et al. Microplasmin: a novel thrombolytic that improves behavioral outcome after embolic strokes in rabbits. *Stroke* 2002; 33: 2279–2284.
  83. Jiang Y, Li Y, Xu X, et al. An in vitro porcine model evaluating a novel stent retriever for thrombectomy of the common carotid artery. *Catheter Cardiovasc Interv* 2016; 87: 457–464.
  84. Xie J, Li M-H, Tan H-Q, et al. Establishment of an experimental intracranial internal carotid artery model and the application in covered-stent navigability testing. *AJNR Am J Neuroradiol* 2009; 30: 1041–1045.
  85. Tan H-Q, Li M-H, Zhu Y-Q, et al. Surgical construction of a novel simulated carotid siphon in dogs. *J Neurosurg* 2008; 109: 1173–1178.
  86. Jung SC, Yoon B-R, Oh JS, et al. Development of endovascular vibrating polymer actuator probe for mechanical thrombolysis: in vivo study. *ASAIO J* 2012; 58: 503–508.
  87. Gory B, Bresson D, Kessler I, et al. Histopathologic evaluation of arterial wall response to 5 neurovascular mechanical thrombectomy devices in a swine model. *AJNR Am J Neuroradiol* 2013; 34: 2192–2198.
  88. Grad Y, Sievert H, Nishri B, et al. A novel endovascular device for emboli rerouting: part I: evaluation in a Swine model. *Stroke* 2008; 39: 2860–2866.
  89. Levy EI, Sauvageau E, Hanel RA, et al. Self-expanding versus balloon-mounted stents for vessel recanalization following embolic occlusion in the canine model: technical feasibility study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27: 2069–2072.
  90. Park S, Hwang SM, Song JS, et al. Evaluation of the Solitaire system in a canine arterial thromboembolic occlusion model: is it safe for the endothelium? *Interv Neuroradiol* 2013; 19: 417–424.
  91. Haider T, Plasenzotti R, Bergmeister H, et al. New mechanical thrombectomy model in the rabbit: a feasibility study. *J Neurosci Methods* 2016; 271: 139–142.
  92. Yuki I, Kan I, Golshan A, et al. A swine model to analyze arterial structural changes induced by mechanical thrombectomy. *AJNR Am J Neuroradiol* 2013; 34: E87–E90.
  93. Zhu L, Shao Q, Li T, et al. Evaluation of the JReCan device for thrombus retrieval: efficacy and safety in a swine model of acute arterial occlusion. *J Neurointerv Surg* 2016; 8: 526–530.
  94. Yuki I, Kan I, Vinters HV, et al. The impact of thromboemboli histology on the performance of a mechanical

- thrombectomy device. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012; 33: 643–648.
95. Ringer AJ, Guterman LR and Hopkins LN. Site-specific thromboembolism: a novel animal model for stroke. *AJNR Am J Neuroradiol* 2004; 25: 329–332.
  96. Roth C, Junk D, Papanagiotou P, et al. A comparison of 2 stroke devices: the new Aperio clot-removal device and the solitaire AB/FR. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012; 33: 1317–1320.
  97. Wainwright JM and Jahan R. Solitaire FR revascularization device 4×40: safety study and effectiveness in preclinical models. *J Neurointerv Surg* 2016; 8: 710–713.
  98. Sadato A, Wakhloo AK and Hopkins LN. Effects of a mixture of a low concentration of n-butylcyanoacrylate and ethiodol on tissue reactions and the permanence of arterial occlusion after embolization. *Neurosurgery* 2000; 47: 1197–1203; discussion 1204–1205.
  99. Takao H, Murayama Y, Ebara M, et al. New thermoreversible liquid embolic agent for embolotherapy: technical report. *Neuroradiology* 2009; 51: 95–98.
  100. Nishi S, Nakayama Y, Hashimoto N, et al. Basic fibroblast growth factor impregnated hydrogel microspheres for embolization of cerebral arteriovenous malformations. *ASAIO J* 1998; 44: M405–410.
  101. Nikoubashman O, Pjontek R, Brockmann M-A, et al. Retrieval of migrated coils with stent retrievers: an animal study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2015; 36: 1162–1166.
  102. Gounis MJ, Lieber BB, Wakhloo AK, et al. Effect of glacial acetic acid and ethiodized oil concentration on embolization with N-butyl 2-cyanoacrylate: an in vivo investigation. *AJNR Am J Neuroradiol* 2002; 23: 938–944.
  103. Wellman BJ, Loftus CM, Noh D, et al. A combined surgical-endovascular device concept for giant aneurysm neck occlusion. *Neurosurgery* 1998; 42: 1364–1368; discussion 1368–1369.
  104. Hagen MW, Girdhar G, Wainwright J, et al. Thrombogenicity of flow diverters in an ex vivo shunt model: effect of phosphorylcholine surface modification. *J Neurointerv Surg* 2017; 9: 1006–1011.
  105. Nonn A, Kirschner S, Figueiredo G, et al. Feasibility, safety, and efficacy of flow-diverting stent-assisted microsphere embolization of fusiform and sidewall aneurysms. *Neurosurgery* 2015; 77: 126–135; discussion 135–136.
  106. Dai D, Ding YH, Kadirvel R, et al. Patency of branches after coverage with multiple telescoping flow-diverter devices: an in vivo study in rabbits. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012; 33: 171–174.
  107. Kallmes DF, Ding YH, Dai D, et al. A new endoluminal, flow-disrupting device for treatment of saccular aneurysms. *Stroke* 2007; 38: 2346–2352.
  108. Masuo O, Terada T, Walker G, et al. Study of the patency of small arterial branches after stent placement with an experimental in vivo model. *AJNR Am J Neuroradiol* 2002; 23: 706–710.
  109. Mottu F, Rüfenacht DA, Laurent A, et al. Iodine-containing cellulose mixed esters as radiopaque polymers for direct embolization of cerebral aneurysms and arteriovenous malformations. *Biomaterials* 2002; 23: 121–131.
  110. Momeni A, Valliant EM, Brennan-Pierce EP, et al. Developing an in situ forming polyphosphate coacervate as a new liquid embolic agent: from experimental design to pilot animal study. *Acta Biomater* 2016; 32: 286–297.
  111. Falcao ALE, Reutens DC, Markus R, et al. The resistance to ischemia of white and gray matter after stroke. *Ann Neurol* 2004; 56: 695–701.
  112. Vink R. Large animal models of traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 2018; 96: 527–535.
  113. Roth G and Dicke U. Evolution of the brain and intelligence. *Trends Cogn Sci* 2005; 9: 250–257.
  114. Cairó O. External measures of cognition. *Front Hum Neurosci* 2011; 5: 108.
  115. Atchaneeyasakul K, Guada L, Ramdas K, et al. Large animal canine endovascular ischemic stroke models: a review. *Brain Res Bull* 2016; 127: 134–140.
  116. Zhang K and Sejnowski TJ. A universal scaling law between gray matter and white matter of cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 5621–5626.
  117. Nitzsche B, Boltze J, Ludewig E, et al. A stereotaxic breed-averaged, symmetric T2w canine brain atlas including detailed morphological and volumetric data sets. *Neuroimage*. Epub ahead of print 31 January 2018. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2018.01.066.
  118. Frackowiak H and Godynicki S. Brain basal arteries in various species of Felidae. *Pol J Vet Sci* 2003; 6: 195–200.
  119. Yamori Y, Horie R, Handa H, et al. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke* 1976; 7: 46–53.
  120. Wey H-Y, Kroma GM, Li J, et al. MRI of perfusion-diffusion mismatch in non-human primate (baboon) stroke: a preliminary report. *Open Neuroimag J* 2011; 5: 147–152.
  121. Gounis MJ, Nogueira RG, Mehra M, et al. A thromboembolic model for the efficacy and safety evaluation of combined mechanical and pharmacologic revascularization strategies. *J Neurointerv Surg* 2013; 5(Suppl 1): i85–89.
  122. Sommer CJ. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 2017; 133: 245–261.
  123. Rai AT, Hogg JP, Cline B, et al. Cerebrovascular geometry in the anterior circulation: an analysis of diameter, length and the vessel taper. *J Neurointerv Surg* 2013; 5: 371–375.
  124. Fukuyama N, Tsukamoto Y, Takizawa S, et al. Altered blood flow in cerebral perforating arteries of rat models of diabetes: a synchrotron radiation microangiographic study toward clinical evaluation of white matter hyperintensities. *Geriatr Gerontol Int* 2015; 15(Suppl 1): 74–80.
  125. Kapoor K, Kak VK and Singh B. Morphology and comparative anatomy of circulus arteriosus cerebri in mammals. *Anat Histol Embryol* 2003; 32: 347–355.
  126. Förschler A, Boltze J, Waldmin D, et al. MR-Bildgebung eines experimentellen Schlaganfallmodells beim Schaf. *Rafo* 2007; 179: 516–524.

127. Dorr A, Sled JG and Kabani N. Three-dimensional cerebral vasculature of the CBA mouse brain: a magnetic resonance imaging and micro computed tomography study. *Neuroimage* 2007; 35: 1409–1423.
128. Lee RM. Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther* 1995; 66: 149–173.
129. Zaninovich OA, Ramey WL, Walter CM, et al. Completion of the circle of Willis varies by gender, age, and indication for computed tomography angiography. *World Neurosurg* 2017; 106: 953–963.
130. van der Bom IMJ, Mehra M, Walvick RP, et al. Quantitative evaluation of C-arm CT cerebral blood volume in a canine model of ischemic stroke. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012; 33: 353–358.
131. Badea CT, Drangova M, Holdsworth DW, et al. In vivo small-animal imaging using micro-CT and digital subtraction angiography. *Phys Med Biol* 2008; 53: R319–350.
132. Lin M de, Ning L, Badea CT, et al. A high-precision contrast injector for small animal x-ray digital subtraction angiography. *IEEE Trans Biomed Eng* 2008; 55: 1082–1091.
133. Eich T, Eriksson O, Sundin A, et al. Positron emission tomography: a real-time tool to quantify early islet engraftment in a preclinical large animal model. *Transplantation* 2007; 84: 893–898.
134. Sinharay S, Lee D, Shah S, et al. Cross-sectional and longitudinal small animal PET shows pre and post-synaptic striatal dopaminergic deficits in an animal model of HIV. *Nucl Med Biol* 2017; 55: 27–33.
135. Li H, Yan J-Z, Chen Y-J, et al. Non-invasive quantification of age-related changes in the vertebral endplate in rats using in vivo DCE-MRI. *J Orthop Surg Res* 2017; 12: 169.
136. Cha S-H, Han MH, Choi YH, et al. Vascular responses in normal canine carotid arteries: comparison between various self-expanding stents of the same unconstrained size. *Invest Radiol* 2003; 38: 95–101.
137. Mack WJ, Huang J, Winfree C, et al. Ultrarapid, convection-enhanced intravascular hypothermia: a feasibility study in nonhuman primate stroke. *Stroke* 2003; 34: 1994–1999.
138. Cai B and Wang N. Large animal stroke models vs rodent stroke models, pros and cons, and combination? *Acta Neurochir Suppl* 2016; 121: 77–81.
139. Lee KC, Joo JY, Huh JS, et al. Effects of repeated short versus single long episodes of focal ischemia on somatosensory evoked potentials and development of cerebral infarction in cats. *Neurol Med Chir* 1997; 37: 447–451. (discussion 451–452).
140. Seita Y, Tsukiyama T, Iwatani C, et al. Generation of transgenic cynomolgus monkeys that express green fluorescent protein throughout the whole body. *Sci Rep* 2016; 6: 24868.
141. Park K-E, Park C-H, Powell A, et al. Targeted gene knockin in porcine somatic cells using CRISPR/Cas ribonucleoproteins. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 810.
142. Schuldenzucker V, Schubert R, Muratori LM, et al. Behavioral testing of minipigs transgenic for the Huntington gene – a three-year observational study. *PLoS One* 2017; 12: e0185970.
143. Murayama Y, Viñuela F, Tateshima S, et al. Endovascular treatment of experimental aneurysms by use of a combination of liquid embolic agents and protective devices. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000; 21: 1726–1735.
144. Marx WE, Cloft HJ, Helm GA, et al. Endovascular treatment of experimental aneurysms by use of biologically modified embolic devices: coil-mediated intraaneurysmal delivery of fibroblast tissue allografts. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001; 22: 323–333.
145. Adibi A, Eesa M, Wong JH, et al. Combined endovascular coiling and intra-aneurysmal allogeneic mesenchymal stromal cell therapy for intracranial aneurysms in a rabbit model: a proof-of-concept study. *J Neurointerv Surg* 2017; 9: 707–712.
146. Killer M, Kallmes DF, McCoy MR, et al. Angiographic and histologic comparison of experimental aneurysms embolized with hydrogel filaments. *AJNR Am J Neuroradiol* 2009; 30: 1488–1495.
147. Metcalfe A, Desfaits A-C, Salazkin I, et al. Cold hibernated elastic memory foams for endovascular interventions. *Biomaterials* 2003; 24: 491–497.
148. Oechtering J, Kirkpatrick PJ, Ludolph AGK, et al. Magnetic microparticles for endovascular aneurysm treatment: in vitro and in vivo experimental results. *Neurosurgery* 2011; 68: 1388–1397; discussion 1397–1398.
149. Meyer T, Nikoubashman O, Kabelitz L, et al. Endovascular stentectomy using the snare over stent-retriever (SOS) technique: an experimental feasibility study. *PLoS One* 2017; 12: e0178197.
150. Ding Y, Dai D, Kallmes DF, et al. Preclinical testing of a novel thin film nitinol flow-diversion stent in a rabbit elastase aneurysm model. *AJNR Am J Neuroradiol* 2016; 37: 497–501.
151. Bebarta V, Luyten D and Heard K. Emergency medicine animal research: does use of randomization and blinding affect the results? *Acad Emerg Med* 2003; 10: 684–687.
152. Lu S-S, Liu S, Zu Q-Q, et al. In vivo MR imaging of intraarterially delivered magnetically labeled mesenchymal stem cells in a canine stroke model. *PLoS One* 2013; 8: e54963.
153. Feng L, Liu J, Liu Y, et al. Tirofiban combined with urokinase selective intra-arterial thrombolysis for the treatment of middle cerebral artery occlusion. *Exp Ther Med* 2016; 11: 1011–1016.
154. Susumu T, Yoshikawa T, Akiyoshi Y, et al. Effects of intra-arterial urokinase on a non-human primate thromboembolic stroke model. *J Pharmacol Sci* 2006; 100: 278–284.
155. van der Worp HB, Macleod MR and Kollmar R. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: ready to start large randomized trials? *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30: 1079–1093.

### 3.2 Darstellung der Eigenleistung

Ich hatte an allen Arbeitsschritten bis zur Erstellung des Reviews einen wesentlichen eigenständigen Anteil. Die Definition der generellen Fragestellung erfolgte in Zusammenarbeit mit Professor Boltze. Die Konzeption des Reviews und der Entwurf der Suchstrategie einschliesslich der Suchkriterien erfolgten nach Einweisung durch Frau Motschall eigenständig. Die Suchstrategie wurde in Zusammenarbeit mit Professor Boltze, Professor Meckel und Frau Motschall iterativ verbessert. Die eigentliche Suche, sowie die Analyse der Suchergebnisse erfolgten durch mich. Die Bewertung der Publikationen, sowie die Analyse und Interpretation der Daten wurden ebenfalls von mir durchgeführt. Bei fachlichen Unklarheiten wurden Professor Boltze und Professor Meckel hinzugezogen. Ebenso habe ich das Manuskript geschrieben. Die Durchsicht des Manuskriptes, Korrekturen und die Setzung wichtiger fachlicher Akzente erfolgten durch Professor Boltze, Professor Meckel, Professor Gounis und Professor Mülling.

**3.3 Development of a routinely applicable imaging protocol for fast and precise middle cerebral artery occlusion assessment and perfusion deficit measure in an ovine stroke model: a case study**

(11 pages, 5 figures, 2 tables, 15 references)

Front Neurol. 2019 Nov 14;10:1113. doi: 10.3389/fneur.2019.01113



# Development of a Routinely Applicable Imaging Protocol for Fast and Precise Middle Cerebral Artery Occlusion Assessment and Perfusion Deficit Measure in an Ovine Stroke Model: A Case Study

Andrea Maria Herrmann<sup>1,2†</sup>, Giorgio Franco Maria Cattaneo<sup>3†</sup>, Sebastian Alexander Eiden<sup>1</sup>, Manuela Wieser<sup>1</sup>, Elias Kellner<sup>4</sup>, Christoph Maurer<sup>5</sup>, Jörg Haberstroh<sup>6</sup>, Christoph Mülling<sup>2</sup>, Wolf-Dirk Niesen<sup>7</sup>, Horst Urbach<sup>2</sup>, Johannes Boltze<sup>8,9</sup>, Stephan Meckel<sup>2,4†</sup> and Mukesch Johannes Shah<sup>10†</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Rick M. Dijkhuizen,  
University Medical Center  
Utrecht, Netherlands

### Reviewed by:

Norbert Nighoghossian,  
Université Claude Bernard  
Lyon 1, France  
Helen M. M. Van Beusekom,  
Erasmus Medical Center, Netherlands

### \*Correspondence:

Stephan Meckel  
stephanmeckel@gmail.com

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Stroke,  
a section of the journal  
Frontiers in Neurology

**Received:** 11 April 2019

**Accepted:** 04 October 2019

**Published:** 14 November 2019

### Citation:

Herrmann AM, Cattaneo GFM,  
Eiden SA, Wieser M, Kellner E,  
Maurer C, Haberstroh J, Mülling C,  
Niesen W-D, Urbach H, Boltze J,  
Meckel S and Shah MJ (2019)  
Development of a Routinely Applicable  
Imaging Protocol for Fast and Precise  
Middle Cerebral Artery Occlusion  
Assessment and Perfusion Deficit  
Measure in an Ovine Stroke Model: A  
Case Study. *Front. Neurol.* 10:1113.  
doi: 10.3389/fneur.2019.01113

<sup>1</sup> Department of Neuroradiology, Faculty of Medicine, Medical Center – University of Freiburg, University of Freiburg, Freiburg, Germany, <sup>2</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Leipzig University, Leipzig, Germany, <sup>3</sup> Institute for Biomedical Engineering, University of Stuttgart, Stuttgart, Germany, <sup>4</sup> Department of MR Physics, Faculty of Medicine, Medical Center – University of Freiburg, University of Freiburg, Freiburg, Germany, <sup>5</sup> Department of Diagnostic and Interventional Neuroradiology, University Hospital Augsburg, Augsburg, Germany, <sup>6</sup> Department of Experimental Surgery, CEMT-FR, Faculty of Medicine, Medical Center – University of Freiburg, University of Freiburg, Freiburg, Germany, <sup>7</sup> Department of Neurology, Faculty of Medicine, Medical Center – University of Freiburg, University of Freiburg, Freiburg, Germany, <sup>8</sup> Fraunhofer Research Institution for Marine Biotechnology and Institute for Medical and Marine Biotechnology, University of Lübeck, Lübeck, Germany, <sup>9</sup> School of Life Sciences, University of Warwick, Coventry, United Kingdom, <sup>10</sup> Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Medical Center – University of Freiburg, University of Freiburg, Freiburg, Germany

Temporary middle cerebral artery occlusion (MCAO) in sheep allows modeling of acute large vessel occlusion stroke and subsequent vessel recanalization. However, rapid and precise imaging-based assessment of vessel occlusion and the resulting perfusion deficit during MCAO still represents an experimental challenge. Here, we tested feasibility and suitability of a strategy for MCAO verification and perfusion deficit assessment. We also compared the extent of the initial perfusion deficit and subsequent lesion size for different MCAO durations. The rete mirabile prevents reliable vascular imaging investigation of middle cerebral artery filling status. Hence, computed tomography perfusion imaging was chosen for indirect confirmation of MCAO. Follow-up infarct size evaluation by diffusion-weighted magnetic resonance imaging revealed fluctuating results, with no apparent relationship of lesion size with MCAO at occlusion times below 4 h, potentially related to the variable collateralization of the MCA territory. This underlines the need for intra-ischemic perfusion assessment and future studies focusing on the correlation between perfusion deficit, MCAO duration, and final infarct volume. Temporary MCAO and intra-ischemic perfusion imaging nevertheless has the potential to be applied for the simulation of novel recanalization therapies, particularly those that aim for a fast reperfusion effect in combination with mechanical thrombectomy in a clinically realistic scenario.

**Keywords:** CT perfusion, DSA, MCAO, reperfusion, sheep stroke model, cerebral ischemia, translational research, brain imaging

## INTRODUCTION

Several recent randomized-controlled trials have shown that endovascular mechanical thrombectomy is highly beneficial for patients with acute ischemic stroke and large vessel occlusion (LVO) (1). This breakthrough in acute stroke treatment has led to steadily increasing numbers of patients undergoing endovascular treatment with recanalization, providing options for novel combined treatment strategies. For instance, companion neuroprotective therapies are believed to augment the beneficial impact of recanalization therapies in future settings (2, 3).

Although ischemia/reperfusion rodent models exist, these models have limitations in simulating endovascular approaches under conditions which are similar to a clinical intervention in humans. The major limitation are the much smaller vessels which, for instance, would not allow to test intravascular test devices used for or to support thrombectomy. Large animal models can fill this gap by providing a suitable vascular anatomy and size for preclinical evaluation of new endovascular or combination treatment concepts for LVO stroke (4). Non-human primate and canine stroke models are restricted by ethical concerns and high mortality in the acute and subacute stages after stroke, preventing long-term assessment of functional outcome and final lesion size as the most important clinical endpoints. Alternatively applied porcine and ovine models are more suitable to monitor long-term impact of an intervention, but exhibit a rete mirabile which does not allow direct endovascular access to the middle cerebral artery (MCA) for occlusion (MCAO). Stroke models using these species therefore require surgical access to the MCA. Recently, ovine permanent and transient MCAO stroke models were established (5, 6). Effective occlusion of the MCA main trunk or its branches was reported to depend on the qualitative visual assessment of the operating surgeon, but this may only be predictive in permanent occlusion studies. In reperfusion studies, the individual extent and capacity of collaterals can cause significant variations in final lesion volume similarly to the situation in human LVO stroke. Thus, a reliable, rapid and unbiased estimation of the perfusion deficit during MCAO is an important prerequisite for acute and long-term MCA recanalization studies. Investigating how the initial diffusion deficit corresponds to final infarct size is another important aspect awaiting clarification.

In this feasibility study, we tested several imaging modalities for application in acute ovine MCAO modeling human LVO stroke. We specifically aimed to assess (i) the reliability to confirm successful transient MCAO, (ii) MCA territory hypoperfusion, and (iii) feasibility of the imaging strategy in an experimental MCAO setting only offering a short imaging time window between vessel occlusion and reopening. This work is also intended to report pitfalls and challenges we faced during this development. We finally want to share the experience we have gained with other groups in the field, or trying to access it.

## MATERIALS AND METHODS

### Animal Baseline Data

The study involved 10 merino sheep half breed (age, 1–3 years; weight,  $80.2 \pm 7.4$  kg), kept in the CEMT-FR (Center

for Experimental Models and Transgenic Service, Freiburg, Germany) under following conditions: straw boxes, daily grazing, water and hay *ad libitum*, concentrated feed pellets as reward and to foster human familiarization.

### Anesthesia

Anesthesia was prepared by intramuscular injection of midazolam [0.5 mg/kg bodyweight (BW)] and ketamine hydrochloride (20 mg/kg BW), and was induced by intravenous propofol administration (2–4 mg/kg BW). Following endotracheal intubation, 12–15 breaths/min were provided by a volume-controlled ventilator at a 10–15 mL/kg BW tidal volume and 5-mbar positive end-expiratory pressure. Settings were adjusted to normalize oxygen and carbon dioxide tension, and pH values.

Anesthesia for surgical and endovascular procedures was maintained by isoflurane in oxygen/air ( $FiO_2 > 0.4$ ), intravenous ketamine (10 mg/kg BW/h) and fentanyl (2–3  $\mu$ g/kg BW/h) administration. For CT perfusion and CT angiography as well as brain MRI and angiography anesthesia was maintained by intravenous propofol (15–18 mg/kg/h).

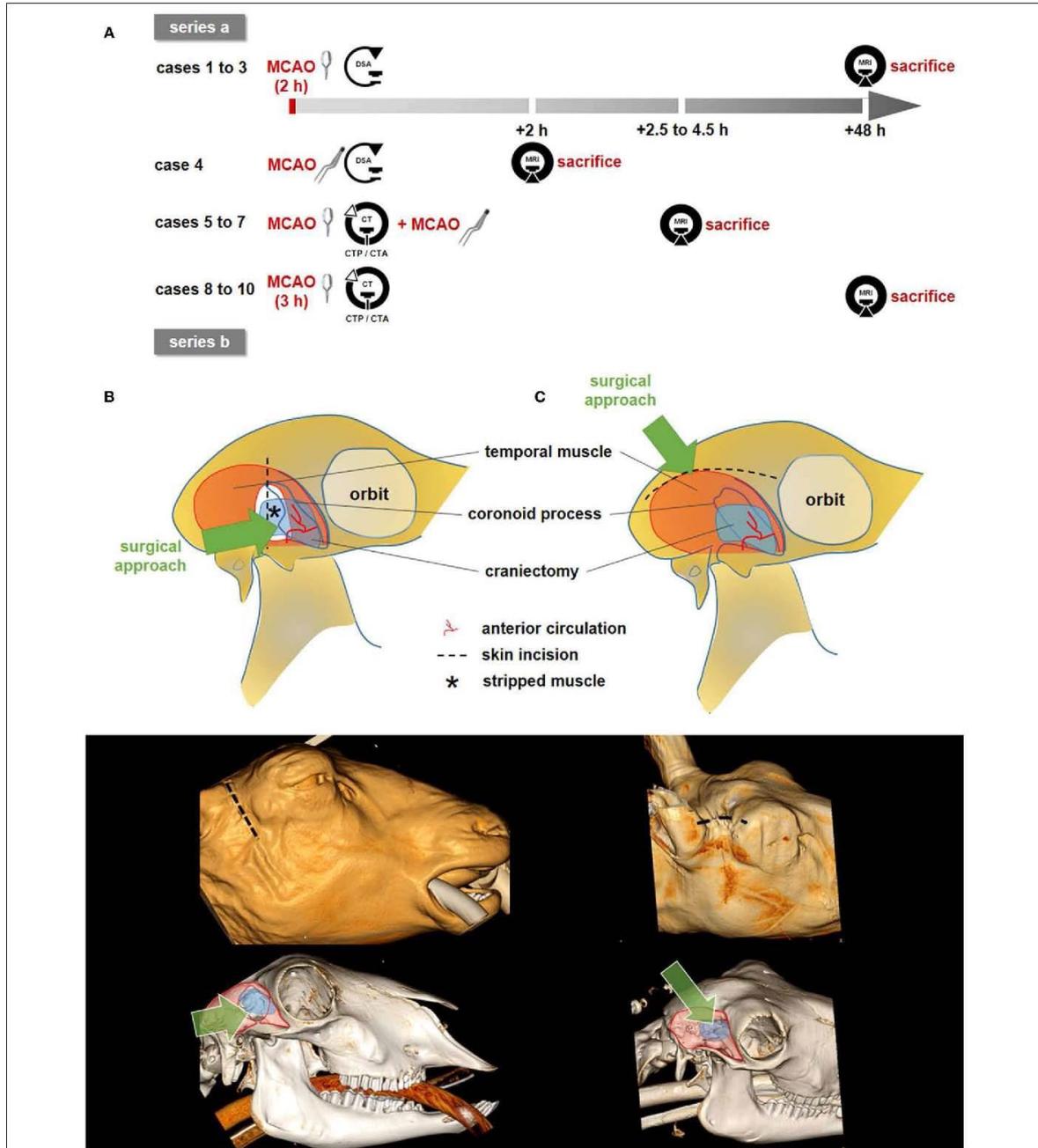
Fluid homeostasis was maintained by intravenous infusion of Ringer solution (10 mg/kg BW/h). Electrocardiogram and blood pressure were monitored continuously. A postsurgical antibiotic (dihydrostreptomycin sulfate 12.9 mg/kg, benzylpenicillin-procaine 8 mg/kg) and analgesic (carprofen 4 mg/kg) treatment was performed.

### Surgical MCA Preparation, Occlusion, and Recanalization

Sheep were placed in the supine position slightly elevating the right shoulder. The head was then tilted to the left by ninety degrees. The wool between the ear and eye was shorn, and sterile draping was applied to cover the surgical field.

Two different approaches to the MCA were performed. MCAO surgery in the first series of experiments (series a, cases 1–3) was carried out as described by Wells et al. (6), with the following modifications (Figure 1B). A 5 cm vertical incision was made, terminating at the zygomatic arch. Temporal and other mastication muscles were divided and stripped from the coronoid process of the mandible. Partial removal of the coronoid process was omitted when accessing the proximal MCA. The remaining masticators were then divided and stripped from the outer table as far rostral as the fibrous ring attaching the posterior orbit to the concave border of the parietal bone. Thereafter, a small craniectomy over the junction of the parietal and squamous temporal bones was performed using an electric high-speed drill (microspeed, Aesculap, Tuttlingen, Germany) to access the floor of the middle cranial fossa directly behind the orbita. The dura was then opened carefully. A 3 Head VM-900 surgical microscope (Möller-Wedel, Wedel, Germany) was used for surgical preparation of the proximal MCA and terminal ICA. The proximal MCA was occluded by a Yasargil temporary titanium clip (Aesculap) for 2 h.

Surgery in the second series (series b, cases 4–10) was carried out as described by Boltze et al. (5) (Figure 1C). The skin between the eye and ear was incised at 5–7 cm along the superior



**FIGURE 1** | Study design and surgical approaches. **(A)** Overview on study design with two experimental series. Clip pictograms indicate (transient) MCAO by vessel clipping whereas the forceps indicate MCAO by electrocoagulation. **(B,C)** Schematic illustration of the surgical approaches (top), 3D-Reconstruction showing the skin incision (middle), 3D-bony-reconstruction with muscle (red), and craniectomy (blue) overlays (bottom). **(B)** The surgical approach according to Wells et al. (series a). The proximal MCA and terminal ICA were reached easily. Bony CT reconstruction shows the partial removal of the coronoid process. **(C)** Approach according to Boltze et al. (series b), in which the distal branches of the MCA were followed proximally until the optic nerve and the terminal internal carotid artery (ICA) had been identified. A partial resection of the coronoid process was not necessary (CT reconstruction). Dotted lines: skin incision; blue areas: craniectomy; \*: muscle dissection (series a only). The green arrows describe the surgeon's approach and the approximate line of vision.

temporal fossa. The fascia of the temporal muscle was opened and the muscle was stripped away in lateral manner to expose the temporal fossa. During this maneuver, the coronoid process was lateralized and thereafter kept laterally with a self-holding spreader. The remaining masticators were then stripped from the outer table of the cranium as far rostral as the fibrous ring attaching the posterior orbit to the concave border of the parietal bone.

Craniectomy was performed as described for series a. The distal branches of the MCA were followed proximally until the optic nerve and the terminal internal carotid artery (ICA) had been identified. The MCA was permanently occluded using an electrocoagulation device (KLS Martin, Mühlheim, Germany) in case 4. This was performed to control for the influence of the exact occlusion site. In cases 5–7, a clip was placed on the MCA and left in place during CT imaging. The clip was then removed and the vessel was immediately electrocoagulated at the same location (Figure 1A). MCAO varied between 2.5 and 4.5 h depending on the particular research question to be addressed in each case. In cases 8–10, the clip was placed on the MCA and removed after 3.0 h without subsequent electrocoagulation (Figure 1A).

### Endovascular Procedure

MCAO was immediately followed by surgical cut down of the femoral artery for introduction of a 12F sheath by an experienced veterinarian (J.H.). An 8F 90-cm sheath (Flexor Shuttle Guiding Sheath; Cook, Bloomington, Indiana, USA) was then inserted into the right common carotid artery (CCA) using a coaxial 125 cm 5F vertebral or Simmons-2 shaped inner catheter for vessel selection by an experienced interventional neuroradiologist (S.M., C.M.). Selective digital subtraction angiography (DSA) with injections of contrast media (Solutrast 300, Bracco Imaging Deutschland, Konstanz, Germany) into the right CCA that was performed using a C-arm monoplanar angiography system (XA BV300, Philips Health Systems, Hamburg, Germany). Angiographic imaging for visualization of the clip-occluded right MCA was performed in variable angulations.

### Brain MRI and MR Angiography

Magnetic resonance imaging (MRI) was performed on a 3T MRI Scanner (Trio, Siemens, Erlangen Germany) using a combined 12-channel head/neck coil. The MRI protocol included sequences as shown in Table 1.

Volumetric analysis of ischemic volume (on coronal DWI) and volume of edema (ischemic area plus surrounding edema on coronal T2w) was based on manual segmentations using the medical imaging platform NORA (<http://www.nora-imaging.org>). Ischemic areas were classified as such after correlation with generated ADC maps. Image evaluation and infarct localization was performed by an experienced neuroradiologist (S.M., C.M.) on a PACS station.

### CT Perfusion and CT Angiography

Cases 5 to 10 in series b were transferred to a 16-slice computed tomography (CT) scanner (Somatom Sensation 16, Siemens)

immediately after surgical clip placement. Plain CT of the brain was performed in coronary plane sequential acquisition (5-mm slice thickness) to localize the surgical clip and to rule out intracranial hemorrhage. Then, a CT perfusion (CTP) scan was performed covering a 2.4 cm slab of the sheep brain which was centered on the tips of the MCAO clip within the MCA territory (four slices; 6-mm slice thickness). Post-processing of standard perfusion maps (CBV, CBF, and Tmax) was conducted using a dedicated commercial software package (SyngoVia, Siemens). These perfusion maps were rated by an experienced neuroradiologist (S.M.) for presence and degree of MCA territory hypoperfusion using the following semiquantitative score: 0 = no lesion visible on Tmax/CBF/CBV, 1 = lesion visible on Tmax only, 2 = lesion visible on Tmax and partially visible on CBF/CBV, 3 = lesion visible on Tmax/CBF and partially on CBV. Finally, thin-section CT angiography of the craniocervical arterial vasculature (slice thickness; 0.75 mm) was performed with arterial bolus tracking. Assessment of CTA 3D datasets was conducted by an experienced neuroradiologist (S.M., C.M.) on a PACS station.

### End of Experiments

Sheep were killed in deep anesthesia by an intravenous potassium chloride overdose at the end of each experiment (after MRI acquisition on day 2 in cases 1–3 and 8–10 and on day 0 in cases 4–7). Death by cardiac arrest was certified by an independent veterinarian.

## RESULTS

All procedures were performed without major complications. No sheep suffered from any clinical complications except for neurological deficits after MCAO. Physiological parameters were continuously monitored before and directly after MCAO, and were in normal ranges throughout the experiments. Mean arterial blood pressure (MAP, median [IQR]) was 93 [82.25–103.75] mmHg/92 [82–107] mmHg, and pulse rate was 78 [71–99] beats/min/81 [73–97] beats/min before/after MCAO, respectively. Both parameters did not differ significantly between pre- and in-traschemic measurements ( $p = 0.903$  for MAP and  $p = 0.451$  for pulse rate). Imaging results from all experiments are summarized in Table 2.

### Results From Series a

#### Case 1

DWI and T2w MRI on day 2 after MCAO showed a small ischemic lesion (1.7 mL; Figure 2A) in right thalamic and midbrain regions after 2 h of transient clip MCAO. The midbrain ischemia suggested an erroneous confusion of the MCA main trunk (M1 segment) with the terminal ICA, resulting in occlusion of terminal ICA and thus of perforating and choroidal artery branches with mesencephalic supply. This appears likely since the proximal segment of the MCA trunk forms a steep 180° curvature with an almost parallel course to the terminal ICA at the anterior skull base of sheep (please also see case 2, Figure 2B; and case 4, Figure 4).

# Kumulativer Teil der Dissertation

**TABLE 1 |** Summary of 3 Tesla MRI sequence parameters.

MRI sequence	Sequence parameters	Orientation	Voxel size	Acquisition time
3D FLAIR	TE/TR, 395 ms/5,000 ms; TI, 1,800 ms; FA, 15°; NA, 1; IPAT, 2	sagittal	1.0 × 1.0 × 1.0 mm	5:52 min
3D MPRAGE	TE/TR, 2.15 ms/1,400 ms; FA, 15°; NA, 1; IPAT, 2	sagittal	1.0 × 1.0 × 1.0 mm	3:27 min
TSE T2	TE/TR, 95 ms/4,090 ms; FA, 140°; IPAT, 2; NA, 1	axial	0.4 × 0.4 × 0.4 mm	2:29 min
TSE T2	TE/TR, 102 ms/5,680 ms; FA, 140°; IPAT, 2; NA, 1	sagittal	0.7 × 0.7 × 3.0 mm	2:23 min
TSE T2	TE/TR, 95 ms/4,911 ms; FA, 140°; NA, 1	coronal	0.4 × 0.4 × 3.0 mm	4:51 min
3D TOF MRA	TE/TR, 3.85 ms/23 ms; FA, 18°; 3D slabs, 3; NA, 2; IPAT, 2	coronal	0.5 × 0.4 × 0.6 mm	11:14 min
DWI	TE/TR, 87 ms/4,700 ms; NA, 3; IPAT, 2	coronal	1.3 × 1.3 × 3.0 mm	1:12 min
DWI	TE/TR, 86 ms/3500 ms; NA, 3; IPAT, 2	axial	1.3 × 1.3 × 3.0 mm	1:12 min

DWI, diffusion weighted imaging; FA, flip angle; FLAIR, Fluid-attenuated inversion recovery; IPAT, integrated parallel imaging techniques; MPRAGE, Magnetization Prepared Rapid Acquisition GRE (gradient echo); NA, number of averages; TE, echo time; TOF MRA, time-of-flight MR angiography; TR, repetition time; TSE, turbo spin echo.

**TABLE 2 |** Summary of MCAO technique, MRI findings, and visualization of MCAO with various imaging modalities.

Animal No.	MCAO		MRI findings				Visibility of MCAO on vascular imaging modalities			
	Surgical technique	Duration of ischemia* [hours]	Day of MRI	DWI lesion volume [ml]	T2 lesion volume [ml]	Location of ischemia/surrounding edema	TOF MRA <sup>‡</sup>	CT Angiography	CT Perfusion – hypoperfusion score <sup>§</sup>	DSA of CCA/retro mirabile score <sup>§</sup>
1	Clip	2	2	1.7	4.8	Midbrain/No	NA	NA	NA	NA/NA
2	Clip	2	2	25.6	17.0	Large MCA infarct/No	NA	NA	NA	NV/NA
3	Clip	2	2	0.5	3.6	Small MCA infarct/Yes	NA	NA	NA	NV/NA
4	Coagulation	2	0	13.3	5.8	Large MCA ischemia/No	Visible	NA	NA	NV/NV
5	Clip for CTP - coagulation for MRI	2.5	0	2.2	0	Medium MCA ischemia/No	Visible	NV	1	NA/NA
6	Clip for CTP - coagulation for MRI	4.5	0	14.5	11.3	Large MCA ischemia/No	Visible	NV	NV - Artifacts	NA/NA
7	Clip for CTP - coagulation for MRI	4.0	0	16.8	0.2	Large MCA ischemia/No	Visible	NV	3	NV/NA
8	Clip	3.0	2	6.0	5.4	Medium MCA ischemia/No	NA	NV	1	NV/NA
9	Clip	3.0	2	8.5	9.2	Medium MCA ischemia/minimal	NA	NV	3	NV/NA
10	Clip	3.0	2	0.9	3.9	Small MCA infarct/Yes	NA	NV	2 - clip Artifacts	Partially visible/NA

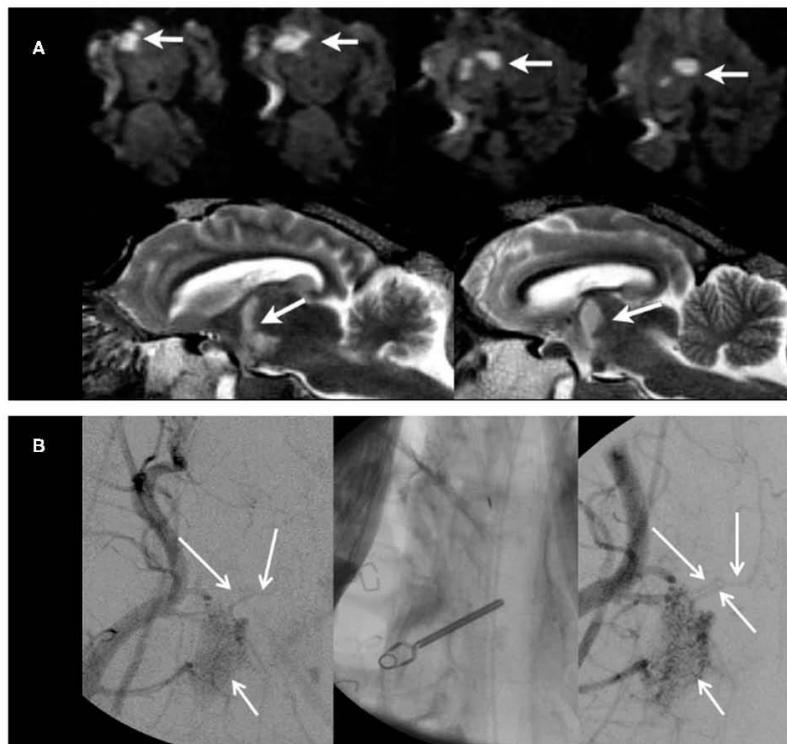
\*refers to time interval from start of MCAO until MRI DWI was performed in cases 4–7 (vessel coagulation). <sup>‡</sup> refers to semiquantitative visual assessment of hypoperfusion in MCA territory: 0, no lesion on Tmax/CBF/CBV; 1, lesion visible on Tmax only; 2, lesion visible on Tmax and partially visible on CBF/CBV; 3, lesion fully visible on Tmax/CBF and partially on CBV. NV, not visible; NA, not available.

## Case 2

Transient clip MCAO was performed for 2 h. Selective DSA of the CCA could not unequivocally demonstrate MCA main trunk occlusion despite variable angulations of the DSA images during angiography (Figure 2B). MRI on day 2 showed a large-sized MCA territory infarct (Figure 3, upper panels) with recanalized MCA on 3D TOF MRA.

## Case 3

Transient clip MCAO was performed for 2 h. Selective DSA of CCA during MCAO again failed to demonstrate MCA main trunk occlusion despite variable angulations of the DSA images during angiography. MRI on day 2 showed no relevant ischemia on DWI (DWI lesion volume, 0.5 ml). A small area of vasogenic edema with scattered and small hemorrhagic foci was found in the area of the surgical access to the MCAO (Figure 3, lower



**FIGURE 2 |** Results from case 1. **(A)** MRI Images on day 2 after MCAO from case 1. Upper panels show DWI Images in coronal view with Ischemic lesions of the midbrain tegmental area within the right crus cerebri and right thalamus (white arrows). Lower panels show consecutive edema on T2w images in mid-sagittal views. **(B)** CCA DSA images before and after clip MCAO. After clip MCAO, no clear out-of of MCA main trunk was visible with possible faint MCA filling (DSA image in left panel) at the clip level (unsubtracted image in mid panel). After clip removal (DSA image in right panel), filling of the main MCA trunk was visible. However, the distal MCA branch vasculature was not seen due to vessel overlap from rete mirabile and larger extracranial arteries.

panels). The MCA showed a normal flow signal on 3D TOF-MRA images at day 2 after temporary clip occlusion. The neuro-deficit of the animal was light.

The chosen approach in series a (cases 1–3) resulted in a highly variable infarct configuration for two potential reasons. First, the vessel location for the surgical clip placement was inappropriate in case 1 (resulting in mid brain infarcts). Second and similar to the human situation, there might be a variable extent of MCA vessel collateral flow resulting in highly different infarct sizes between cases 2 and 3. Thus, we decided to modify the surgical approach in series b. We further tested whether the chosen MCAO location was correct by using an optimized imaging algorithm during the ischemia phase.

## Results From Series b

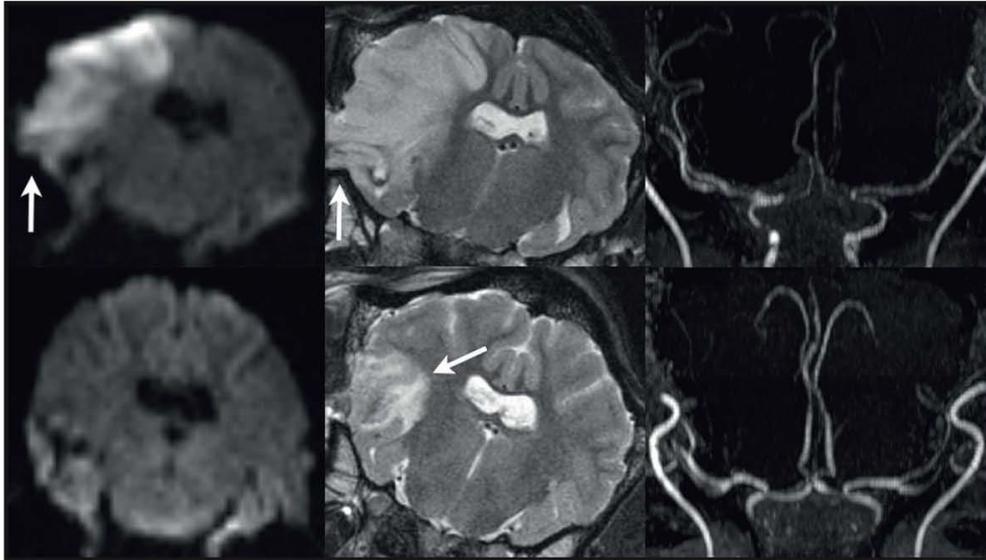
### Case 4

In this case, we tested whether DSA of the CCA with additional superselective views from injection of the right rete mirabile is capable of proofing MCAO. For immediate comparative assessment of the vessel status after MCAO on 3D TOF MRA, the MCA main trunk was electrocoagulated to avoid MRI artifacts

emerging from the clip. A 0.021 inch microcatheter (Prowler Select Plus, Codman & Shurtleff, Inc., Raynham, USA) was introduced into the largest inferior arterial branch supplying the rete mirabile via long sheath endovascular access to right CCA directly after MCAO. Despite multiple angulated vessel views on superselective DSA (Figure 4, left panel), MCAO could not be correctly visualized. Further distal microcatheter navigation toward the rete mirabile led to subsequent vasospasm with impaired demonstration of downstream vasculature. MRI was performed directly at 2 h following vessel occlusion. MRA visualized the MCAO site at the MCA main trunk (Figure 4, right panel). The resulting early MCA territory infarct was visible on DWI images (DWI lesion volume 13.3 ml) with beginning edematous change on T2w images (T2 lesion volume 5.8 ml).

### Case 5

Since DSA (including superselective views used in case 4) failed to demonstrate adequate vessel occlusion, we decided to further amend the imaging protocol by introducing CTA with CTP imaging in cases 5–7. Since electrocoagulation is not a feasible technique for transient MCAO, we decided to first perform



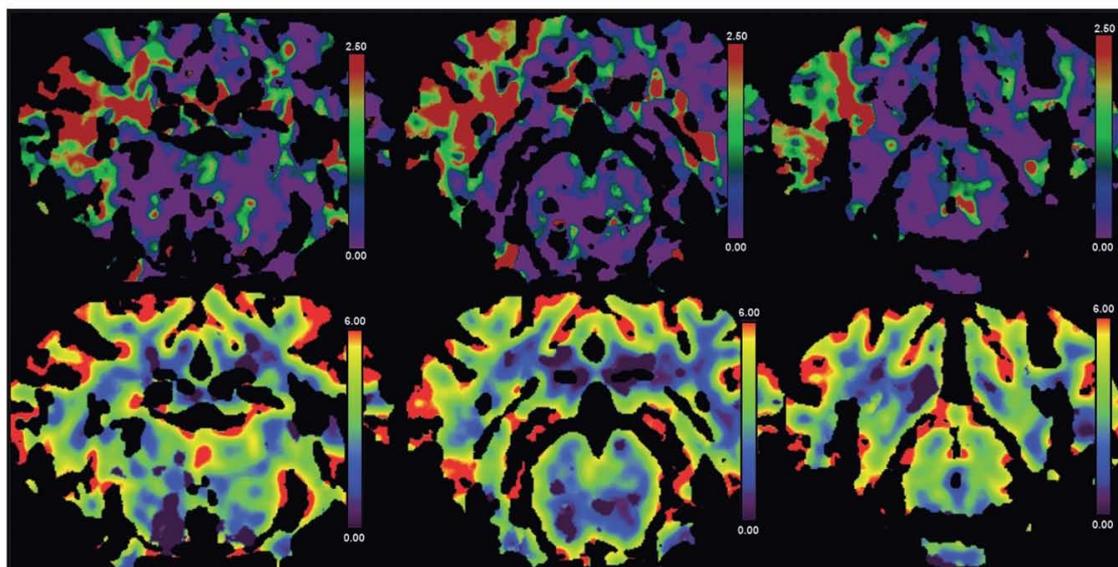
**FIGURE 3 |** Results from cases 2 and 3. MRI images of case 2 (**upper panels**) and case 3 (**lower panels**) on day 2 after 2 h of transient MCAO. DWI and T2w images show a large right MCA territory infarct lesion (DWI lesion volume, 25.6 ml) with swelling and mild herniation through the craniectomy site (arrows in **upper left** and **mid panels**). MRA (**upper right panel**) demonstrates adequate MCA recanalization after right temporary MCAO. In case 3, no relevant MCA territory ischemia is seen on DWI images (**lower left panel**; DWI lesion volume, 0.5 ml), whereas T2w images exhibit vasogenic edema in the area of the craniectomy with mild hemorrhagic foci (arrow in **lower middle panel**). Again, MRA demonstrates adequate MCA vessel recanalization after right temporary MCAO (**lower right panel**).



**FIGURE 4 |** Results from case 4. DSA image (**left panel**) showing superselective rete mirabile injection (red arrow) after permanent MCAO (animal 4) without clear evidence of MCA main trunk occlusion (red arrow). 3T TOF MRA showing duplicated right MCA main trunk post temporary MCAO (**mid panel**, arrows) and clear evidence of right MCA occlusion after permanent MCAO (**right panel**).

MCAO with a clip followed by immediate transfer to CTA/CTP imaging. Thereafter, the clip was removed and the vessel was occluded in the same location by electrocoagulation in order to perform subsequent MRI without clip-borne artifacts. Thus, CTP findings could be correlated with the results of MRI simulating a temporary MCAO with ischemia duration of 2.5 h (time interval from initial vessel occlusion to MRI acquisition).

On CTP, a large area of right MCA territory hypoperfusion was seen on Tmax, whereas CBF and CBV maps showed no areas hypoperfusion (perfusion score 1; **Figure 5**). Missing flow signal of the MCA main trunk was seen on 3D TOF MRA. Visualization of the MCAO at the main trunk was not possible on CTA images due to beam hardening artifacts originating from skull bone and the clip. On DWI, signs of a small infarct in the MCA territory



**FIGURE 5 |** Results from case 5. CTP images from case 5. Directly after clip MCAO profound hypoperfusion is visible on Tmax maps (**upper panels**) without reduction in CBV (**lower panels**). False color scale indicates Tmax from 0 (purple) to 2.5 s (red) in upper panels and CBV from 0 ml/100 g (purple) to 6 ml/100 g (red) in lower panels, respectively.

were detected (lesion volume 2.2 ml) without edematous change on T2w images. In this case, evidence of correct temporary MCAO at the main trunk by visualization of CTP hypoperfusion during the time window of clip occlusion was first demonstrated with good correspondence to findings in immediate MRI. Hence, duration of MCAO for 2.5 h may still have been too short to detect a fully evolved infarct.

#### Case 6

MCAO and imaging procedures were performed as described in case 5 except for the longer (4.5 h) duration of ischemia at the time of the MRI measurements in order to avoid a small final infarct due to premature recanalization. Perfusion in the right hemisphere could not be evaluated on CTP due to major streak artifacts from extensive jugular venous contrast media reflux. Correct MCA main trunk occlusion could be reliably demonstrated using 3D TOF MRA, but CTA again failed to do so due to beam hardening artifacts. Four and a half hours of ischemia led to a rather large-sized MCA infarct that was seen on DWI MRI (lesion volume 14.5 ml) with resulting early edematous changes on T2w images.

#### Case 7

MCAO was performed as described in case 5 and 6 except for a modification in the positioning of the animal during CTP acquisition in order to avoid streak artifacts originating from contrast media reflux into the jugular veins. To this end, the animal was placed in left anterior-lateral position on the CT scanner table to relieve paunch-related increase in central venous pressure. DSA was also added directly after CTP

and before removal of the clip, and subsequent permanent electrocoagulation of the MCA. However, as in the previous cases, DSA images could not clearly demonstrate correct vessel occlusion. MRI was performed at 4.0 h after MCAO. MRA was able to correctly visualize MCA main trunk occlusion. On CTP, a large area of MCA territory hypoperfusion was seen on and on CBF maps with hypoperfusion also visible on CBV maps (perfusion score 3). There were no major artifacts on CTP images. However, MCAO was not visible on CTA images due to beam hardening artifacts similar to cases 5 and 6. Likewise, a rather large-sized MCA territory infarct was seen on MRI (DWI volume, 16.8 ml) without significant early edematous change on T2w images after 4 h of ischemia.

#### Cases 8–10

During an interim summary of cases 5–7, the utilization of CT perfusion for demonstrating MCA territory hypoperfusion as an indicator of correct MCAO was found successful except for extensive beam hardening artifacts in case 6, caused by jugular venous reflux. Thus, we planned to gain further experience with this CT perfusion protocol (applied with modified animal positioning as described in case 7) in combination with the modified surgical approach of series b. However, we decided to continue by performing a transient clip MCAO only (omitting electrocoagulation) and infarct size measurement by MRI on day 2. The latter modifications were chosen in order to establish an imaging-based MCAO model which is designed for testing novel combined endovascular approaches of LVO stroke therapy in the future. Such transient MCAO stroke model should not only allow for ultra-early MRI but also for delayed imaging assessment

of final infarct evolution and clinical follow-up as additional outcome measures.

The clip was removed after an ischemic period of 3.0 h. CTP imaging was performed directly after clip placement with modified animal positioning on the scanner table as described in case 7. Ultra-early MRI scanning was skipped and animals were allowed to wake-up and recover from the procedure. Infarct size measurement was performed on MRI at day 2 after MCAO in all three cases. On CTP, MCA territory hypoperfusion was visible on Tmax in all three cases. In addition, CBF reduction 9 and mild CBV reduction within the MCA territory was found in case 9 (perfusion score 3). In case 10, there were streak artifacts within the MCA territory from clip placement which, however, did not severely impair visibility of hypoperfusion (perfusion score 2). The MCAO was again not visible at all on DSA of the CCA in cases 8 and 9 after clip placement, and only poorly visible in case 10. On MRI at day 2, medium-sized MCA territory infarcts were evident on both DWI and T2w images (DWI volume, 6–8.5 ml) in cases 8 and 9. In contrast, the MCA territory infarction was rather small-sized (DWI volume, 0.9 ml) despite proved MCA territory hypoperfusion on CTP in case 10. This surprising result was explained by MRA on day 2 showing an early duplication of the MCA vessels as a normal variation in this case (Figure 4, mid panel). This variant may be a source for strongly improved collateralization within the MCA territory in some individuals. Identification and occlusion of the duplicate MCA main trunk can be challenging as it could be located deeply within a cerebral sulcus or the brain parenchyma.

## DISCUSSION

The aim of this case study was to establish a feasible imaging modality for MCA territory hypoperfusion assessment in an ovine transient MCAO model, and to document our experience collected on the way toward this aim. Final infarct size on MRI represents a meaningful efficacy surrogate in experiments on acute stroke therapeutic interventions. However, in studies using transient MCAO this is only valid when the extent of brain hypoperfusion and thus the expected final lesion size without reperfusion or therapeutic intervention is known in order to compare it to the final lesion volume with recanalization and/or accompanying therapeutic intervention.

We evaluated different imaging protocols for both intra-ischemic and post-ischemic perfusion and infarct assessment, and performed a step-wise amendment of the imaging procedures and protocols. The finally resulting imaging strategy was feasible to demonstrate temporary MCA territory hypoperfusion during clip occlusion prior to vessel reopening in the intra-ischemic phase of temporary MCAO. Furthermore, we performed a “two-step” occlusion by MCA clipping prior to CTP, and electrocoagulation after CTP at the exact same vessel location to validate the results by means of TOF MRA without the risk of clip-derived artifacts.

We also determined CTP using standard post-processed image maps (Tmax, CBF, and CBV). This imaging technique was feasible to confirm hypoperfusion and thus the correct clip

placement during MCAO. Such confirmation is an important quality assurance method when later removing the clip to model successful recanalization. Although derived from a relatively small number of animals undergoing CTP, our results indicate that final infarct size may be highly variable at least within a time window of 3–4.5 h of MCAO. These results are in-line with previous experiments done by Wells et al. (7) that demonstrated DWI volumes ranging from 7 to 15% of whole brain tissue after 2 h of ischemia with proximal clip MCAO in six animals. In principle, this variability may arise from incomplete MCA occlusion or a variable extent of collateral circulation to the MCA territory. Although a definite conclusion is hard to make, we argue for the latter as the most likely explanation due to numerous reasons. First, the Yasargil clips used in our experiments are also used in humans and exhibit closing forces (>150 g, 1.47 N) that should be absolutely sufficient to occlude the ovine MCA. Complete vessel coverage by the clip was confirmed after thorough visual inspection by the surgeon (M.J.S.). Of note, the ovine MCA is smaller than the vessels Yasargil clips are usually placed on, so it is not difficult to cover it entirely. Second, we report cases of considerable infarcts (e.g., cases 2, 8, and 9). This points at a factor being different between individual subjects rather than a technical failure. Indeed, the extent of collateral circulation determines the extent of the core infarct size very early after onset of human IVO stroke of the MCA (8, 9), and the situation can be similar in sheep. If this assumption was right, it would underpin the translational value of the model described herein, but also calls for pretest assessment of collateral status to exclude extreme outcomes. In the sheep model, collateral circulation of the MCA may further be enhanced by dedicated variants of the ovine cerebral arteries such as a duplicated MCA main trunk (see case 10). Permanent MCAO by electrocoagulation as employed in our study was previously reported to result in reproducible infarct volumes throughout a 7 week surveillance period, starting 24 h after MCAO (5). Similar findings were reported for swine (10). This might come in line with our assumption, as the initially tissue-preserving effects of collateralization will become less prominent over time in case a critical hypoperfusion/complete blood flow disruption is present. During the acute stage, however, individual differences in collateralization capacity would result in much more variable lesion volumes.

The volume of hypoperfused brain tissue at early time points of vessel occlusion may be later correlated to the final lesion size. In our series, some cases that demonstrated profound hypoperfusion at the time of vessel occlusion (score 3) showed rather large-sized infarct volumes on follow-up DWI MRI. However, owing to the small number of cases with well-evaluable CTP images ( $n = 4$ ) we were not able to clearly prove a suggested association between the extent of hypoperfusion early after clip application and final infarct on DWI by using a semiquantitative analysis of perfusion deficits. In order to provide a robust estimation of final infarcts, more data from CTP before clip removal (simulating the endovascular recanalization) should be compared to final infarct size on MRI or infarct histology in future studies.

## Surgical Approach

Reproducible and reliable infarcts could not be induced in series a, and effective occlusion depended on qualitative visual assessment by the surgeon. Due to the basal approach, the proximal MCA and terminal ICA could be reached easily. However, the narrow loop between the terminal ICA and the proximal MCA may have led to erroneous terminal ICA occlusion, resulting in brain stem infarct presumably from associated choroidal vessel occlusion with the absence of any MCA territory ischemia (case 2). Surgical knowledge of this dedicated anatomy being different to human basal brain arteries is crucial to avoid such complication. Moreover, duplication of MCA main trunk (M1 segment, see case 10 and Figure 4) represents a relatively frequently observed anatomical variant in sheep, and is also supposed to be the source for of a high degree of collateralization within the MCA territory. Such duplication may not be entirely visible during neurosurgical exposure.

According to the impression from our experienced vascular neurosurgeon (M.J.S.), the surgical approach chosen in series b was technically more suitable for MCAO, as long as possible early duplication of the MCA was ruled out and the proximal MCA (vascular loop near the optic nerve) was clearly identified.

## MCAO Imaging

DSA, superselective DSA of vessels supplying the rete mirabile, and CTA were not suitable to confirm correct MCAO. This was presumably due to the tiny caliber of intracranial arteries distal to the rete mirabile on superselective DSA and CTA, and many overlapping large-sized extracranial branches of the carotid artery on non-selective DSA, respectively. 3D rotational DSA might be an alternative option to visualize the occlusion of the MCA main trunk which was however not possible due to limited technical capabilities of our experimental angiography suite. Imaging of leptomeningeal collateral status in MCAO may be of interest as it could serve as an estimate for clinical outcome and final infarct size. However, the same methodological limitations of DSA and CTA as in the confirmation of correct MCAO may also account for the poor visualization of the tiny pial vessels in the sheep brain that impair a sufficient analysis of collaterals. However, in analogy to human large vessel occlusion stroke, CT perfusion penumbral imaging may also provide indirect information on the presence or absence of collaterals (11, 12). Non-human primate (NHP) models of ischemic stroke [for review see (4)] might be advantageous when assessing small-caliber intracerebral vessels and the cranial anatomy in NHPs is even closer to the human situation. However, the use of NHPs is ethically restricted in many countries, and costs related to using the species by far exceed those of other large animal stroke models. In turn, this restricts sample sizes and often severely limits endpoints that can be addressed quantitatively.

Beam-hardening metal artifacts were visible on CTA during temporary MCAO induced by titanium clip application. 3D TOF MRA at 3T reliably showed MCAO, but required (permanent) occlusion by electrocoagulation to avoid clip-borne artifacts (13). This issue might be mitigated by the use of newly developed and improved, but extremely expensive MRI-compatible clips. These are made of special titanium based alloys or Phynox, an

alloy composed of cobalt, chrome, nickel, and molybdenum (e.g., Aesculap Yasargil mini clips) and cause only minimal artifacts. However, in transient MCAO, this imaging modality may be less efficient and also difficult to apply during a short ischemic time window between two neurosurgical procedures for clip placement and subsequent removal. This is particularly relevant for experiments that add additional time for endovascular procedures, e.g., for intra-arterial neuroprotective therapy, which necessitate additional navigation and placement of a catheter into the brain supplying arteries. Nevertheless, MRI-compatible clips might allow perfusion-weighted imaging sequences to assess the perfusion deficit during occlusion.

Positron emission tomography (PET) has been reported as a gold standard for experimental perfusion deficit assessment and is applicable in sheep (14, 15). Moreover, PET imaging is hardly susceptible to metal artifacts from a placed clip. However, PET imaging requires a dedicated infrastructure while its application and in particular full data analysis may be too time-consuming to be applied in acute experimental settings during a short time window of temporary vessel occlusion.

We found that CT perfusion reliably provided indirect evidence of MCAO by demonstrating MCA territory hypoperfusion already in a small number of cases. Importantly, it was the most feasible modality that could be applied in a time-efficient manner during temporary neurosurgical clip MCAO among the tested imaging techniques. In our experience, streak artifacts related to venous reflux into the internal jugular vein may be reduced by placing the animal in a left anterior-lateral position on the CT scanner table to relieve paunch-related venous pressure. This finally resulted in good diagnostic quality of the CTP images.

## Study Limitations

In this pilot study with small number of consecutive animals, no complete blinding or randomization could be performed which may potentially bias the analysis of study outcomes. However, the investigators who performed the volumetric analysis of infarct volume on MRI images were blinded to the respective animals' treatment protocols. Detailed information derived on correlation of infarct size with hypoperfusion volume could not be obtained due to variable imaging protocols and the small number of animals that finally underwent CTP, warranting additional research on this aspect. Consequently, further studies with a fixed CTP imaging protocol and ischemic time window of temporary MCAO are necessary.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on request.

## ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of the German animal protection law

and the animal care guidelines of the European Community (2010/63/EU). The protocol was approved by the local ethics committee (Regierungspräsidium Freiburg, Germany; reference numbers #35-9185.81/G-14/85 and #39-9185.81/G-15/38). Study design is illustrated in Figure 1A. ARRIVE guidelines were followed as applicable for a pilot study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AH: significant contribution to study design, to data acquisition, analysis of data, to article drafting, critical review of intellectual contents, and approval of final version. GC: significant contribution to study design, to article drafting, critical review of intellectual contents, and approval of final version. SE: significant contribution to data acquisition, analysis and interpretation of data, and to critical review of intellectual contents, and approval of final version. MW, EK, and CMa: significant contribution to data acquisition, analysis of data, and to critical review of intellectual contents, and approval of final version. JH: significant contribution to concept and study design, to data acquisition, and to critical review of intellectual contents, and approval of final version. CMü and HU: significant contribution to concept and study design, and to critical review of intellectual contents,

and approval of final version. W-DN: significant contribution to data acquisition, and to critical review of intellectual contents, and approval of final version. JB: significant contribution to concept and study design, to data interpretation, and to article drafting, critical review of intellectual contents, and approval of final version. SM: significant contribution to experimental design image analysis, data acquisition and analysis and interpretation of data, article drafting, critical review of intellectual contents, and approval of final version. MS: significant contribution to experimental design, to article drafting, critical review of intellectual contents, and approval of final version.

## FUNDING

This work was supported by Federal Ministry of Education and Research, Germany (grant #13GW0015B).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank our research technician Hansjörg Mast for valuable support with the MRI measurements of all animals. We thank Acandis GmbH (Pforzheim, Germany) for the collaboration in the frame of the joint granted project 13GW0015B.

## REFERENCES

- Goyal M, Menon BK, van Zwam WH, Dippel DWJ, Mitchell PJ, Demchuk AM, et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet*. (2016) 387:1723–31. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00163-X
- Linfante I, Cipolla MJ. Improving reperfusion therapies in the era of mechanical thrombectomy. *Transl Stroke Res*. (2016) 7:294–302. doi: 10.1007/s12975-016-0469-3
- Savitz SI, Baron, J.-C., Yenari MA, Sanossian N, Fisher M. Reconsidering neuroprotection in the reperfusion era. *Stroke*. (2017) 48:3413–9. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017283
- Herrmann AM, Meckel S, Gounis MJ, Kringe L, Motschall E, Mülling C, et al. Large animals in neurointerventional research: a systematic review on models, techniques and their application in endovascular procedures for stroke, aneurysms and vascular malformations. *J Cereb Blood Flow Metab*. (2019) 39:375–94. doi: 10.1177/0271678X19827446
- Boltze J, Förtschler A, Nitzsche B, Waldmin D, Hoffmann A, Boltze CM, et al. Permanent middle cerebral artery occlusion in sheep: a novel large animal model of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. (2008) 28:1951–64. doi: 10.1038/jcbfm.2008.89
- Wells AJ, Vink R, Blumbergs PC, Brophy BP, Helps SC, Knox SJ, et al. A surgical model of permanent and transient middle cerebral artery stroke in the sheep. *PLoS ONE*. (2012) 7:e42157. doi: 10.1371/journal.pone.0042157
- Wells AJ, Vink R, Helps SC, Knox SJ, Blumbergs PC, Turner RJ. Elevated intracranial pressure and cerebral edema following permanent MCA occlusion in an ovine model. *PLoS ONE*. (2015) 10:e0130512. doi: 10.1371/journal.pone.0130512
- Wheeler HM, Mlynash M, Inoue M, Tipirmini A, Liggins J, Bammer R, et al. The growth rate of early DWI lesions is highly variable and associated with penumbral salvage and clinical outcomes following endovascular reperfusion. *Int J Stroke*. (2015) 10:723–9. doi: 10.1111/ijss.12436
- Maurer CJ, Egger K, Dempfle, A.-K., Reinhard M, Meckel S, Urbach H. Facing the time window in acute ischemic stroke: the infarct core. *Clin Neuroradiol*. (2016) 26:153–8. doi: 10.1007/s00062-016-0501-8
- Imai H, Konno K, Nakamura M, Shimizu T, Kubota C, Seki K, et al. A new model of focal cerebral ischemia in the miniature pig. *J Neurosurg*. (2006) 104:123–32. doi: 10.3171/ped.2006.104.2.123
- Vagal A, Menon BK, Foster LD, Livorine A, Yeatts SD, Qazi E, et al. Association between CT angiogram collaterals and CT perfusion in the interventional management of stroke III trial. *Stroke*. (2016) 47:535–8. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.011461
- Lu S-S, Zhang X, Xu X-Q, Cao Y-Z, Zhao LB, Liu Q-H, et al. Comparison of CT angiography collaterals for predicting target perfusion profile and clinical outcome in patients with acute ischemic stroke. *Eur Radiol*. (2019) 29:4922–9. doi: 10.1007/s00330-019-06027-9
- Steiger HJ, van Loon JJ. Virtues and drawbacks of titanium alloy aneurysm clips. *Acta Neurochirurg*. (1999) 72:81–8.
- Terpolilli NA, Kim S-W, Thal SC, Kataoka H, Zeisig V, Nitzsche B, et al. Inhalation of nitric oxide prevents ischemic brain damage in experimental stroke by selective dilatation of collateral arterioles. *Circ Res*. (2012) 110:727–38. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.253419
- Werner P, Saur D, Zeisig V, Ettrich B, Patt M, Sattler B, et al. Simultaneous PET/MRI in stroke: a case series. *J Cereb Blood Flow Metab*. (2015) 35:1421–5. doi: 10.1038/jcbfm.2015.158

**Conflict of Interest:** GC was engineer at the company Acandis GmbH until August 2019. SM received fees and travel grants as member of scientific advisory board of company Acandis GmbH.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Herrmann, Cattaneo, Eiden, Wieser, Kellner, Maurer, Haberstroh, Mülling, Niesen, Urbach, Boltze, Meckel and Shah. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

### **3.4 Darstellung der Eigenleistung**

Ich hatte in allen Phasen der Pilotstudie und der Erstellung des Papers einen erheblichen eigenständigen Anteil. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Professor Cattaneo, Professor Boltze, Professor Meckel und Dr. Shah. Ich war für die klinische und klinisch-chemische Untersuchung, Anästhesie und medikamentelle Versorgung der Schafe verantwortlich. Das Erfassen, Verarbeiten und Analysieren der Daten wurde ebenfalls von mir in Zusammenarbeit mit Professor Meckel, Professor Boltze und Dr. Shah durchgeführt. Weiterhin habe ich die Daten zur Diskussion im Team aufgearbeitet und das Manuskript zusammen mit Professor Cattaneo, Professor Boltze, Professor Meckel und Dr. Shah geschrieben. Die weiteren Koautorinnen und Koautoren leisteten ihrem fachlichen Profil entsprechende, wichtige intellektuelle Beiträge zu Studienplanung, -durchführung und/oder Datenanalyse und waren an der Durchsicht und Überarbeitung des Manuskriptes beteiligt.

### **3.5 Ausblick: Selective intracarotid blood cooling in acute ischemic stroke: a safety and feasibility trial of hypothermia vs. normothermia in an ovine stroke model**

Die im Folgenden exzerpt- und überblicksartig dargestellten Methoden und Ergebnisse sind Teil einer weiteren Publikation, die sich zum Zeitpunkt der Einreichung der Dissertation allerdings noch in der Begutachtung befand. Daher erfolgt hier die Darstellung der wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit, welche in Abschnitt 4 im Zusammenhang mit allen anderen Befunden und Ergebnissen diskutiert werden und für die Dissertation als Ganzes von wissenschaftlichem Interesse sind.

#### **3.5.1 Überblick zur Methodik**

In einem letzten Schritt wurde das etablierte Schafmodell in einer Rekanalisationsstudie eingesetzt. Die therapeutische Hypothermie ist, vor allem in Kombination mit einem Rekanalisationverfahren, ein äußerst vielversprechender Therapieansatz bei Schlaganfallpatienten. Ziel der durchgeführten Untersuchung war es daher, die Sicherheit und Machbarkeit des neuen Kühlkatheters, der sowohl eine selektive Kühlung des Gehirns als auch eine Thrombektomie ermöglicht, zu testen.

In der Studie wurden zwanzig weibliche Merinoschafe verwendet, die nicht-randomisiert in die Studie eingeschlossen wurden. Bei allen Schafen wurde ein temporärer Verschluss der ACM mittels Clip-Setzung durchgeführt und mittels Computertomographie (CT)-Perfusion

bestätigt. Zur Darstellung der ACC-Zirkulation nach ACM- Verschluss und nach Abnahme des Clips wurde eine Angiographie durchgeführt. In der Hypothermie-Gruppe (10 Schafe) wurde ein Kühlkatheter in die rechte ACC eingeführt, in der Normothermie-Gruppe (10 Schafe) wurde stattdessen ein Standardkatheter, wie er bei der Durchführung von Thrombektomien zum Einsatz kommt, verwendet. In beiden Versuchsgruppen wurde somit ein Katheter in den Bereich der ACC vorgeschoben. Grund dafür war, dass der Sicherheitsendpunkt nicht in Bezug auf das Platzieren eines Katheters erfolgen sollte, sondern in Hinblick auf die Verwendung des Kühlkatheters bei gleichzeitiger Durchführung einer selektiven Hypothermie. Mit der Kühlung wurde in der Hypothermie-Gruppe 20 Minuten vor ACM-Rekanalisation (Clip-Entfernung) begonnen. Die Kühlung wurde 180 Minuten lang aufrechterhalten. Nasale und rektale Temperatur der Schafe wurden kontinuierlich aufgezeichnet. Die nasale Temperatur wurde als zuverlässiges Surrogat der Hirntemperatur beschrieben (CATTANEO et al. 2016). Die Schafe wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen klinisch und neurologisch überwacht. Ein MRT des Gehirns wurde an den Tagen 2 und 30 nach dem Eingriff durchgeführt. Die Analyse der primären Endpunkte basierte unter anderem auf histologischen Befunden (Sicherheit) sowie den intranasalen und rektalen Temperaturmessungen (Anwendbarkeit und Durchführbarkeit). Der sekundäre Endpunkt (Wirksamkeit) wurde unter anderem durch neurologische Verhaltenstests (Boltze et al., 2008) und das Infarktausmaß im MRT beurteilt. Die Auswertung der Daten erfolgte verblindet. Eine Randomisierung der Versuchstiere war aus logistischen Gründen nicht möglich. Beispielsweise konnte die Beschaffung der Versuchstierpopulation nicht komplett, sondern aus Gründen der Haltungskapazität und jahreszeitlich bedingt nur in kleineren Tranchen erfolgen. Weiterhin verzögerte sich die Fertigstellung des Kühlkatheter-Versuchsmusters seitens des herstellenden Unternehmens so lange, dass eine zeitgerechte Durchführung des (drittmittelfinanzierten) Vorhabens nur möglich war, weil zwischenzeitlich mit Untersuchungen in der Kontrollgruppe begonnen wurde.

### 3.5.2 Ausgewählte Ergebnisse

Die histopathologische Untersuchung der 30 Tage nach ACM- Verschluss und Kühlung entnommenen ACCs ergab keinerlei Hinweise auf eine verminderte Gefäßwandintegrität bei der Hypothermie- im Vergleich zur Normothermiegruppe (*Tabelle 1*). Darüber hinaus wurden in der Hypothermiegruppe keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten ACCs beobachtet (*Tabelle 1*).

**Tabelle 1: Histopathologische Befunde der ACC-Proben**

Diese Tabelle ist Bestandteil der eingereichten Publikation und zeigt die Analyse der histopathologischen Befunde der ACC-Proben. P-Werte: Chi-Quadrat-Test zum Vergleich der Befunde zwischen Hypothermie- und Normothermiegruppe und McNemar-Test zum Vergleich zwischen behandelten (rechts) und unbehandelten (links) ACCs innerhalb der Hypothermiegruppe. ACC (Arteria carotis communis), HT (Hypothermie), NT (Normothermie), vs. (versus).

Histopathologische Parameter	HT-gruppe - behandelte ACC	HT-gruppe - unbehandelte ACC	NT-gruppe - behandelte ACC	NT-gruppe - unbehandelte ACC	p-Werte <sup>#</sup>	
					HT- vs. NT-gruppe - behandelte ACC	behandelte vs. unbehandelte ACC - HT-gruppe
Blutgerinnsel an der Wand haftend	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	1,0	1,0
Fibrinoleukozytärer Schorf	0 / 10	0 / 10	1 / 10	2 / 10	1,0	1,0
Luminaler Thrombus	7 / 10	7 / 10	4 / 10	7 / 10	0,369	1,0
Dissektion	0 / 10	0 / 10	1 / 10	0 / 10	0,501	1,0
Intimale Verdickung	7 / 10	7 / 10	7 / 10	8 / 10	1,0	1,0
Entzündung der Intima	0 / 10	0 / 10	0 / 10	1 / 10	1,0	1,0
Fragmentierung elastischer Fasern	1 / 10	3 / 10	1 / 10	2 / 10	1,0	0,317
Verdickung & Zellreichtum in der Media	0 / 0	3 / 10	2 / 10	2 / 10	0,456	0,083

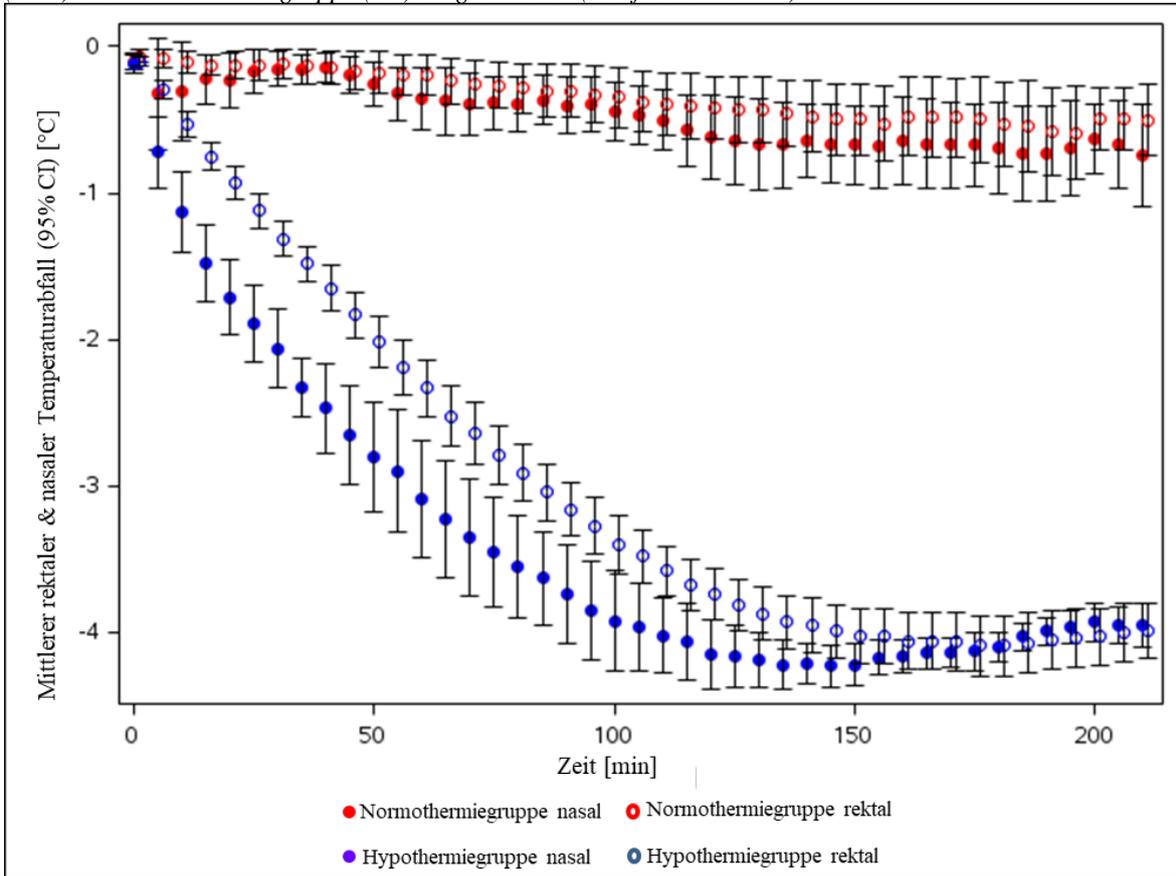
In beiden Gruppen traten geringfügige Affektionen der Gefäßinnenwände auf, wobei diese interessanterweise in der Normothermiegruppe etwas zahlreicher waren.

Das Einbringen des Kühlkatheters zur ACC war bei allen Tieren komplikationsfrei und zügig möglich. Unmittelbar nach Beginn der selektiven Kühlung begann die ipsilaterale Nasaltemperatur zu sinken und näherte sich asymptotisch einem Plateau an, das nach etwa 120 min erreicht war und etwa 4,1° C unterhalb der Ausgangstemperatur lag (Abbildung 7). Die Körperkerntemperatur (rektale Messung) in der Hypothermiegruppe sank um ein vergleichbares Niveau (4,1° C). Allerdings erfolgte der Abfall der Körperkerntemperatur deutlich langsamer. Bereits 10 Minuten nach Beginn der Kühlung war die Temperatur statistisch signifikant geringer als in der Normothermiegruppe ( $p < 0,01$ ). In der Normothermiegruppe konnte ein leichter Abfall der nasalen (max. -0,7° C) und der Körperkerntemperatur (max. -0,53° C) beobachtet werden. Diese waren jedoch deutlich geringer als in der Hypothermiegruppe und vermutlich der Narkose und dem damit einhergehenden Verlust der aktiven Temperaturregulation geschuldet (

Tabelle 2).

**Abbildung 7: Temperaturabfall während der Kühlungsphase**

Diese Abbildung ist Bestandteil der eingereichten Publikation und zeigt die mittleren (95 %-CI) Temperaturabfälle ( $\Delta T$ , °C) in 5-Minuten-Intervallen während der Abkühlungs- (180 min) und Nachkühlungsphase (30 min). Diese sind für die rektale (●) und nasale (○) Temperatur in der Hypothermie- (blau) und Normothermiegruppe (rot) dargestellt. CI (Konfidenzintervall).



**Tabelle 2: Vergleich der Temperaturabfälle bei selektiver Kühlung**

Diese Tabelle ist Bestandteil der eingereichten Publikation,  $\Delta T$  bezieht sich auf den mittleren (95 %-CI) Temperaturabfall, der durch Subtraktion der gemessenen Verfahrenstemperatur von der Temperatur bei der Basislinie berechnet wird, die über die letzten 30 Minuten vor Verfahrensbeginn pro Sonde und Tier zeitlich gemittelt wurde. Das Sternchen (\*) zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der Hypothermie- und der Normothermiegruppe an. CI (Konfidenzintervall), HT (Hypothermie), NT (Normothermie).

Zeitpunkt	Ipsilaterale nasale Temperatur $\Delta T$ in °C (Mittelwert; 95 %-CI)			Rektaltemperatur $\Delta T$ °C (Mittelwert; 95 %-CI)		
	HT-gruppe	NT-gruppe	p-Wert	HT-gruppe	NT-gruppe	p-Wert
5 min	-0,72 (-0,97; -0,48)	-0,32 (-0,70; 0,06)	0,0621	-0,29 (-0,35; -0,23)	-0,09 (-0,15; -0,02)	< 0,01*
10 min	-1,13 (-1,41; -0,86)	-0,30 (-0,64; 0,03)	< 0,01*	-0,53 (-0,62; -0,44)	-0,11 (-0,18; -0,03)	< 0,01*
20 min	-1,71 (-1,97; -1,45)	-0,23 (-0,42; -0,05)	< 0,01*	-0,93 (-1,05; -0,82)	-0,13 (-0,22; -0,04)	< 0,01*
30 min	-2,06 (-2,33; -1,79)	-0,15 (-0,27; -0,03)	< 0,01*	-1,31 (-1,43; -1,20)	-0,12 (-0,22; -0,01)	< 0,01*
60 min	-3,09 (-3,49; -2,69)	-0,35 (-0,57; -0,14)	< 0,01*	-2,33 (-2,53; -2,14)	-0,20 (-0,33; -0,06)	< 0,01*
90 min	-3,74 (-4,08; -3,41)	-0,40 (-0,60; -0,21)	< 0,01*	-3,16 (-3,35; -2,98)	-0,31 (-0,49; -0,12)	< 0,01*

## Kumulativer Teil der Dissertation

120 min	-4,15 (-4,39; -3,91)	-0,62 (-0,91; -0,34)	< 0,01*	-3,74 (-3,92; -3,57)	-0,42 (-0,63; -0,21)	< 0,01*
150 min	-4,22 (-4,36; -4,08)	-0,67 (-0,94; -0,41)	< 0,01*	-4,02 (-4,21; -3,84)	-0,50 (-0,74; -0,25)	< 0,01*
180 min	-4,10 (-4,21; -4,00)	-0,70 (-1,01; -0,38)	< 0,01*	-4,09 (-4,30; -3,88)	-0,53 (-0,82; -0,24)	< 0,01*

Das Ausmaß der neurologischen Defizite im Zeitverlauf über 30 Tage nach ACM-Verschluss (erfasst mittels AUC, area under the curve) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Hypothermie- und Normothermiegruppe (p=0,82), obwohl bei Tieren mit Hypothermie eine geringere Fläche unter der Kurve (AUC) festgestellt wurde (Tabelle 3).

### ***Tabelle 3: Ergebnisse der neurologischen Verhaltenstests und MRT Bildgebung***

*Die Entwicklung der ACM-Infarkte zeigte im MRT keinen Unterschied im Volumen des frühen Infarkts und Ödems (T2) an Tag 2 sowie des chronischen Infarkts an Tag 30 (T2) zwischen Hypothermie- und Normothermiegruppe (p=0,56-0,74). Alle ACM-Gefäße blieben bei beiden MRT-Messungen auf TOF MRA rekanalisiert. Die mittleren Größen von Infarkt und Ödem fielen allerdings in der Hypothermiegruppe um etwa 16 % bzw. 37 % höher aus. AUC (area under the curve), DWI (diffusionsgewichtete Bildgebung), HT (Hypothermie), IQR (Interquartilsabstand), MRA (Magnetresonanztomographie), NT (Normothermie), S (Standardabweichung).*

	HT-gruppe	NT-gruppe	p-Wert
<b>Neurologisches Outcome</b>			
Neuroscore (AUC, Tag 1-30), median (IQR)	34 (19-80)	53 (15,5-123,5)	0,82
<b>MRI an Tag 2</b>			
Infarktvolumen (DWI) in ml, Mittelwert (S)	5,58 (3,21)	4,79 (2,77)	0,56
Ödemvolumen (T2) in ml, Mittelwert (S)	8,33 (3,78)	6,07 (3,48)	
ACM-Rekanalisation (TOF MRA); in %	100 %	100 %	0,18
<b>MRI an Tag 30</b>			
Finales Infarkt (T2) Volumen; ml, Mittelwert (S)	1,62 (1,26)	1,80 (1,17)	0,74
ACM Rekanalisation (TOF MRA) (%)	100 %	100 %	

### **3.5.3 Darstellung der Eigenleistung**

Bei dieser Studie hatte ich an einer Vielzahl von Arbeitsschritten der Studie und der Erstellung des Papers einen eigenständigen und erheblichen Anteil. Die klinischen und neurologischen Untersuchungen der Schafe wurden von mir durchgeführt. Die Anästhesie und medikamentelle Versorgung der Schafe erfolgten mehrheitlich durch mich. Das Erfassen und Verarbeiten der Daten aus den klinischen und neurologischen Untersuchungen der Schafe wurde ebenso von mir durchgeführt. Weiterhin analysierte ich die Daten in Zusammenarbeit mit der Statistikerin Frau Ihorst. Ebenso schrieb ich gemeinsam mit Professor Cattaneo, Professor Boltze, Professor Meckel und Dr. Shah das Manuskript, welches derzeit (Stand Juli 2020) zur Einreichung vorbereitet wird.

### 4 Diskussion

#### 4.1 Hintergrund der Arbeit

Die Anzahl der Menschen, die einen Schlaganfall erleiden und anschließend unter den Folgen leiden, hat weltweit sowohl bei Männern als auch bei Frauen jeden Alters zugenommen. Schätzungen zeigten, dass in den letzten zweieinhalb Jahrzehnten die Zahl der Schlaganfall-Patienten und -Überlebenden um 50 % bis 100 % gestiegen ist (FEIGIN et al. 2017). In den Vereinigten Staaten erleidet im Durchschnitt alle 40 Sekunden ein Mensch einen Schlaganfall (MOZAFFARIAN et al. 2016). Die Folgen eines Schlaganfalles, wie motorische Störungen und Kommunikationsstörungen, sind für Betroffene und Angehörige sehr belastend (MILLER et al. 2010) und stellen darüber hinaus eine erhebliche sozioökonomische Herausforderung dar (KOLOMINSKY-RABAS et al. 2006).

Die derzeit angewendeten, etablierten Therapieverfahren wie die intravenöse Thrombolyse oder die mechanische Rekanalisation sind mit zahlreichen Limitationen und Kontraindikationen behaftet sowie nur in einem engen Zeitfenster und/oder bei einem ausgewählten Patientenkollektiv effektiv einsetzbar. Bei der Mehrheit der Schlaganfallpatienten ist daher mit erheblichen Folgeschäden zu rechnen. Aus diesem Grund ist die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten von herausragender Bedeutung und absolut unerlässlich. Für deren Entwicklung und eingehende Erforschung sind präklinische Studien essentiell. Neue Therapien können zunächst an In-vitro-Modellen getestet werden (CATTANEO et al. 2015), erfordern aber vor dem Einsatz beim Menschen meist Studien an Tiermodellen. Nagetiermodelle eignen sich nur bedingt für die Erforschung neurointerventioneller Therapien (FISHER et al. 2009), wodurch dem Einsatz von Großtieren in diesem Bereich ein besonderer Stellenwert zukommt.

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war die Betrachtung der Vor- und Nachteile von Großtiermodellen im Einsatz in der neurointerventionellen Forschung. Das Schaf bietet eine Reihe von wesentlichen Vorteilen für die Schlaganfallforschung und wurde daher in den von uns durchgeführten Studien als Versuchstierart ausgewählt. Das zweite Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines geeigneten akuten Schlaganfallmodells im Schaf mit anschließender Gefäßrekanalisation und der Etablierung einer praktikablen Bildgebung zum Zwecke der Testung eines Verfahrens zur intravaskulären, selektiven Hyperthermie. Gegenstand einer dritten, noch nicht veröffentlichten Studie war die abschließende Beantwortung der Fragestellung, ob ein endovaskuläres Kühlkathetersystems für eine kombinierte Rekanalisation und Hypothermie praktikabel und sicher einsetzbar ist.

### **4.2 Übersicht zu existierenden Großtiermodellen des ischämischen Schlaganfalls und deren Anwendung**

Zur Erarbeitung einer detaillierten Übersicht wurde eine Literaturrecherche in Form eines systematischen Reviews vorgenommen. Reviews sind für eine breite Leserschaft und zum Teil auch fachfremde Personengruppen von Nutzen, um einen Überblick über die oft komplexe Primärliteraturlage zu erhalten und um zuverlässig aktuelle Informationen und Trends in der Forschung abschätzen zu können (BYRNE 2016). Außerdem können Reviews dabei helfen, Tierversuche zu verfeinern oder unnötige Tierversuche zu vermeiden. Der Nutzen eines Reviews ist allerdings stark von der Qualität der Methoden abhängig, die angewandt wurden, um die entsprechende Fachliteratur zu identifizieren und aufzuarbeiten. Systematische Reviews bieten die Möglichkeit einer genauen, standardisierten und damit gleichermaßen transparenten wie zuverlässigen Zusammenfassung der Literatur. Dies wird durch klar festgelegte Ziele, eine unmissverständliche und reproduzierbare Methodik, eine systematische Literaturrecherche, Bewertung der Validität der Ergebnisse in den aufgenommenen Studien sowie eine systematische Darstellung und Auswertung der Rechercheergebnisse erreicht (LIBERATI et al. 2009). Nicht-systematische Reviews unterliegen der Limitation nicht immer vordefinierter Auswahlkriterien für Primärliteratur und dem häufigen Fehlen des Nachweises einer umfassenden Literaturrecherche, was die Zuverlässigkeit der Ergebnisse entscheidend limitieren kann (BYRNE 2016). Vollständige und genaue Angaben zur Suchstrategie der Übersichtsarbeit sind essenziell, um deren Qualität beurteilen zu können. Leitlinien, wie beispielsweise das etablierte Format PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses) erhöhen die Qualität von Übersichtsarbeiten (TOEWS 2017). Unser Review wurde daher konsequent nach den PRISMA-Richtlinien erstellt. Außerdem sind die zur Recherche eingesetzten Datenbanken essenziell und vom jeweiligen Fachgebiet abhängig. Es sollten mindestens zwei Datenbanken durchsucht werden, um möglichst alle relevanten Studien finden zu können und um eine umfassende Literatursuche zu gewährleisten. Ebenso ist es wichtig, die Suchstrategie detailliert darzulegen (SHEA et al. 2007). Im vorliegenden Review wurden die zwei bedeutendsten Datenbanken im biomedizinischen Bereich, Medline (via Ovid von Wolters Kluwer) und Science Citation Index (via Web of Science von Thomson Reuters, jetzt Clarivate Analytics), durchsucht und die Suchstrategie detailliert dokumentiert (Kapitel 3.1, Abbildung 1, Anhang 8.1, 8.2). Die Ergebnisse beider Datenbanken wiesen einen hohen Übereinstimmungsgrad auf: Es wurden bei der Suche via Web of Science aus 1987 neu

identifizierten Studien nur noch 28 weitere Originalpublikationen und 8 weitere Tiermodelle identifiziert. Die Anzahl der durch die Suchstrategie primär identifizierten (7.321) und letztendlich eingeschlossenen Studien (334) war vergleichsweise hoch und lässt daher aussagekräftige Ergebnisse erwarten. Um die Ermittlung relevanter Studien weiter zu optimieren, ist der Einsatz von mehreren, unabhängigen Wissenschaftlern/Autoren, die das Suchergebnis überprüfen, von Vorteil (EDWARDS et al. 2002). Im vorliegenden Review hat die Promovendin das Suchergebnis primär überprüft. Bei Unsicherheiten über den Ein- oder Ausschluss einer Studie wurde Rücksprache mit den Koautoren gehalten.

Das systematische Review gibt einen Überblick über den Einsatz von Großtieren in der neurointerventionellen Forschung. Es werden die verschiedenen Großtiermodelle vorgestellt, wodurch Forscher sich einen Überblick über die verschiedenen Methoden sowie deren Vor- und Nachteile verschaffen und das für eine geplante Studie passende Tiermodell auswählen können. Vor Anfertigung des Reviews existierten Überblicksarbeiten, die die verschiedenen Methoden und die Vor- und Nachteile von Schlaganfallmodellen (MEHRA et al. 2012), Aneurysmmodellen (BOUZEGHRANE et al. 2010) und AVM-Modellen (XU et al. 2015) bei Großtieren und Nagern beschreiben, aber jeweils auf bestimmte methodische oder klinische Aspekte beschränkt sind. Im Gegenzug dazu bietet das im Rahmen dieser Dissertation angefertigte Review eine umfassende Zusammenfassung der Großtiermodelle in der neurointerventionellen Forschung und damit eine genaue und informative Darstellung für Forscher, die mit Großtieren arbeiten bzw. arbeiten möchten. Es erfolgt eine detaillierte Darstellung von Techniken mit denen Aneurysmen, AVM, Schlaganfälle und der humane Carotis-Siphon im Großtier modelliert werden können (Kapitel 3.1, Species and models).

Das Review zeigt weiterhin auf, bezüglich welcher Aspekte in Studien mit Großtieren noch Raum für Verbesserungen besteht, um das volle Potential von Großtieren nutzen und aussagekräftige Studien durchführen zu können. Auf dieser Basis wurde ein weiteres systematisches Review erstellt (Kringe et al., 2020), an dem die Promovendin mitwirkte, das aber nicht Gegenstand dieser Dissertation ist. Dabei wurde deutlich, dass im Rahmen einer großen Zahl der von uns bewerteten Studien im Versuchsaufbau weder randomisiert noch verblindet wurde. Der komplexe Versuchsaufbau von Großtierstudien wird dabei häufig als Argument dafür verwendet, Qualitätssicherungsmaßnahmen zu ignorieren. Großtiermodelle erfordern die Verfügbarkeit von ausgebildeten und spezialisierten Experimentatoren, aufwendigen und speziellen Geräten und Einrichtungen, daher sind die Gesamtkosten von Großtierversuchen viel höher als die von Standard-Nagetierversuchen. Dies wiederum schränkt die Anzahl der Tiere, die in eine Studie aufgenommen werden können und die

statistische Validität mitunter stark ein. Durchdachte Studiendesigns, idealerweise unter Berücksichtigung der Ergebnisse früherer Nagetierstudien (falls vorhanden und relevant), können helfen, gezielt die am besten geeigneten Endpunkte auszuwählen, eventuelle Effektstärken abzuschätzen und die jeweilige Studie so zu designen, dass die statistische Validität möglichst hoch ist (Abschätzung der benötigten Stichprobengröße). Weiterhin ist der konsequente Einsatz von Protokollen zur Randomisierung und Verblindung erforderlich (FAHED et al. 2016).

Das Review ermöglicht unter anderem die Auswahl eines geeigneten Modells für die jeweilige Untersuchung/Fragestellung in Hinblick auf die Modelletablierung (Kapitel 3.1, Abbildung 2) als auch die Vor- und Nachteile des jeweiligen Modells (Kapitel 3.1, Tabelle 1). Im Fall der Auswahl eines Schlaganfallmodells stellt sich zunächst die Frage eines permanenten oder transienten Verschlusses eines Gehirngefäßes und damit die Frage nach der Möglichkeit der Reperfusion (Kapitel 3.1, Species and models). Im nächsten Schritt sollten Fragen hinsichtlich der Technik des Gefäßverschlusses (extra- oder intravaskulär), des operativen Zuganges zum Gehirngefäß und der passenden Tierart beantwortet werden. Um mit dem ausgewählten Modell aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse erhalten zu können, ist es wichtig, genügend Tiere im Versuch zu verwenden und Angaben zu den Tieren, zur Haltung und Anästhesie exakt zu dokumentieren (Kapitel 3.1, Animal numbers and animal characterization). Für die Reproduzierbarkeit einer Studie ist es außerdem essenziell, Ein- und Ausschlusskriterien zu Beginn der Studie zu definieren (Kapitel 3.1., Selection criteria). Um die Qualität der Studien zu erhöhen, sollten ebenso vor Beginn einer Studie die Studienendpunkte genau definiert und priorisiert (primäre, sekundäre und tertiäre Endpunkte) werden (Kapitel 3.1, Endpoint assessment and readout parameters).

Der Schwerpunkt in den von uns ausgewerteten Studien lag auf der Therapie von Aneurysmen, Schlaganfällen und AVM. Die meisten Studien untersuchten Therapien, die in ähnlicher Form mittlerweile in der Klinik Anwendung finden oder zukünftig finden sollen. Dazu zählen beispielsweise Metallspiralen (coils) oder Katheter zur mechanischen Thrombektomie. Sowohl aus klinischer als auch aus ethischer Sicht ist es wünschenswert, Therapien zu testen, die eine realistische Chance haben, später in der Klinik eingesetzt zu werden. Weiterhin ist es notwendig, alternative Behandlungsmethoden zu erforschen, wenn bewährte Behandlungen nicht hinreichend erfolgreich sind. Beispielhaft dafür ist die mechanische Thrombektomie als Alternative zur intravenösen Thrombolyse. Bei der Suche nach therapeutischen Alternativen kann durchaus auf Verfahren zurückgegriffen werden, die sich bereits in verwandten Anwendungsgebieten bewährt haben (z.B. die Hypothermie).

Insgesamt zeigte sich, dass Großtiermodelle ein wertvolles Element der translationalen Forschung sein können, da sie die (Patho-) Physiologie und klinische Situation menschlicher Patienten gut widerspiegeln können.

### **4.3 Etablierung eines Tiermodells zur temporären MCAO mit Akutbildgebung**

Der nur temporäre Verschluss eines Gehirngefäßes im Tiermodell ist zwingend notwendig, um Rekanalisations-Studien durchzuführen. Nur so kann die Auswirkung einer erfolgreichen Rekanalisation oder einer Therapie untersucht werden, die auf die Konservierung der Penumbra über einen bestimmten Zeitraum hinweg abzielt. Für die Beurteilung des Therapieeffektes (z. B. Wiederöffnung eines obliterierten Gefäßes) ist es wichtig, zunächst den temporären Gefäßverschluss nachzuweisen und das Ausmaß des zu erwartenden Infarktes abschätzen zu können, wenn keine Therapie erfolgt wäre (KRINGE et al. 2020). Ziel dieser Studie war es daher, ein Bildgebungsverfahren zu etablieren, mit dem die detaillierte Analyse des Perfusionsdefizits während eines temporären Gefäßverschlusses im Schaf beurteilt werden kann. Das bildgebende Verfahren soll eine zügige, idealerweise während des Versuches mögliche Beurteilung des Perfusionsausfalles gewährleisten.

In dieser Fallserie wurde bei zehn Schafen ein Schlaganfall induziert. Der Zugang zur ACM ist beim Schaf auf verschiedenen Wegen erreichbar, es existieren prinzipiell zwei unterschiedliche Techniken (BOLTZE et al. 2008; WELLS et al. 2012). In der vorliegenden Studie hat sich der operative Zugang nach BOLTZE et al. (2008) als geeignet erwiesen, um einen zuverlässigen Verschluss der ACM zu erreichen. Um Rekanalisationsverfahren testen zu können, wurde aber im Gegensatz zu BOLTZE et al. (2008) ein temporärer Verschluss mit Clip durchgeführt.

Im Anschluss an den Gefäßverschluss wurden eine digitale Subtraktionsangiographie (DSA), MRT, MRA sowie eine CT durchgeführt, um die Auswirkungen auf die lokale Hirnperfusion zu analysieren. Die DSA wird in Studien zur mechanischen Thrombektomie oft für den Nachweis eines Gefäßverschlusses verwendet (BREKENFELD et al. 2008). In der von uns durchgeführten Studie konnte die DSA den Verschluss jedoch nicht zuverlässig nachweisen (Fall 1-4). Dies könnte auf feinkalibrige intrakranielle Hirnarterien distal des Rete mirabile beim Schaf und deutlich kräftigere, große extrakranielle Äste der Arteria carotis communis, die diese in den Bildprojektionen überlagern, zurückzuführen sein. Aufgrund dieser Überlagerungen lassen sich Unterbrechungen der ACM durch einen

Verschluss unter Umständen nicht gut beurteilen. In der Humanmedizin sind die CT und MRT wichtige diagnostische Bildgebungsverfahren bei Schlaganfällen (POWERS et al. 2018). Zudem ermöglichen die CT-Perfusion und -Angiographie zusätzliche prognostische Aussagen in der Akutphase nach einem ischämischen Schlaganfall (VAN SEETERS et al. 2014). Durch den Versuchsaufbau mit mehreren Bildgebungsverfahren konnte beurteilt werden, welches Verfahren das jeweils am besten geeignete für den Nachweis des Perfusionsausfalls und die Beurteilung des Infarktausmaßes im Schafmodell ist. Es konnte gezeigt werden, dass die CT-Perfusion auch im Schafmodell gut geeignet ist, um über die Hirnminderperfusion den ACM-Verschluss indirekt nachzuweisen. Durch den Vergleich mit anderen Bildgebungsverfahren und -befunden konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Ausmaß des minderdurchbluteten Bereichs mit der Größe der endgültigen Läsion korreliert. Damit kann die CT-Perfusion nicht nur eingesetzt werden, um den temporären Verschluss zu demonstrieren, sondern auch, um die Wirksamkeit einer Therapie einzuschätzen. Außerdem kann sie eingesetzt werden, um zeitabhängige Schwellenwerte der Gehirndurchblutung für die Differenzierung des Infarktkerns vor der Reperfusion zu bestimmen (WRIGHT et al. 2016). Eine zerebrale Hirnminderperfusion im Schaf wurde bereits im C-Bogen-CT untersucht. Die Sensitivität ist dabei allerdings geringer als mit CT-Perfusion (BEUING et al. 2014). Die Time-of-Flight-MRA (TOF-MRA) hat sich bei unseren Schafen zur Darstellung eines permanenten ACM-Verschlusses als zuverlässig erwiesen, was im Einklang mit Studien beim Schaf und Hund ist (FÖRSCHLER et al. 2007; KANG et al. 2009). Auch beim Schlaganfallpatienten stellt die TOF-MRA die Standardmethode zur Gefäßdarstellung mittels MRT dar (ALFKE et al. 2011). Allerdings eignet sie sich bei einem temporären Verschluss im Versuch nicht zur vaskulären Bildgebung, da sie zu zeitaufwendig ist und durch den gesetzten Clip Artefakte entstehen können. Die diffusionsgewichtete Bildgebung („diffusion-weighted imaging“, DWI) im MRT eignet sich beim Menschen für die Diagnostik eines akuten ischämischen Schlaganfalls (BRUNSER et al. 2013). Auch in dieser Studie hat sich die Bildgebung mittels DWI im MRT als geeignet erwiesen, das Ausmaß der Infarktgröße zu bestimmen. Allerdings ist diese Bestimmung in Rekanalisationsstudien nur sinnvoll, wenn zusätzlich der Perfusionsausfall und das damit zu erwartende, endgültige Infarktvolumen noch vor Therapieeinsatz bestimmt werden. Eventuelle Abweichungen von diesem vorab bestimmten, endgültigen Infarktvolumen wären genau dann der therapeutischen Intervention zuzuschreiben, wenn diese exklusiv in der Therapiegruppe auftreten. Ein weiterer Grund für die Sinnhaftigkeit dieser Bestimmung ist die individuell variable Kollateralversorgung, die

die Größe des Infarktkerns in der Frühphase der Ischämie beeinflusst. Die am Schaf erhobenen Befunde zeigen dabei erhebliche Parallelen zu klinischen Beobachtungen an menschlichen Patienten (MAURER et al. 2016). Beim Einsatz eines Schafmodells muss beachtet werden, dass die Kollateralversorgung des ACM-Stromgebietes durch anatomische Extremvarianten der Gehirnarterien, wie beispielsweise einen gedoppelten ACM-Hauptstamm, in Einzelfällen deutlich besser als beim Menschen ausfallen kann (Fall 10). Es wichtig zu beachten, dass nur eine vergleichsweise kleine Anzahl an Schafen untersucht wurde, weshalb die Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden sollten. Zukünftige Studien sollten deutlich mehr Tiere einsetzen, um eine valide statistische Auswertung zu ermöglichen. Da es sich um einen hypothesenbildenden Pilotversuch mit fallweiser Ergebnisbeurteilung handelte, war eine vollständige Verblindung oder Randomisierung nicht gut möglich und auch noch nicht erforderlich. Da die Ergebnisse aber dennoch vielversprechend waren, konnte das verwendete Modell in Verbindung mit dem etablierten Bildgebungsverfahren weiter eingesetzt werden. Die Modelletablierung in Verbindung mit gründlicher Entwicklung eines Bildgebungsverfahrens gab uns die Möglichkeit, das Design der anschließenden Sicherheits- und Machbarkeitsstudie zu optimieren.

### **4.4 Machbarkeits- und Sicherheitsstudie zum Einsatz des endovaskulären Kühlkathetersystems**

Der in dieser Studie getestete Kühlkatheter ermöglicht die mechanische Thrombektomie bei gleichzeitiger Einleitung der Kühlung direkt an der Stelle des Gefäßverschlusses. Vorgekühltes Blut würde so unmittelbar nach der Rekanalisation selektiv das Gehirngewebe erreichen. Darüber hinaus umgeht diese Technik die Notwendigkeit der systemischen Applikation größerer Mengen gekühlter Kochsalzlösung, was möglicherweise mit systemischen Nebenwirkungen wie Immunsuppression und Lungenentzündung verbunden ist (POLDERMAN und HEROLD 2009). Sicherheit und Durchführbarkeit des Kühlkatheters können nicht an Nagetiermodellen untersucht werden, da der Kühlkatheter aufgrund der doppelten Funktion eine gewisse Mindestgröße aufweisen muss und somit nur ein Großtiermodell in Frage kommt (Kapitel 3.1).

In Bezug auf die histologischen Sicherheitsendpunkte wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt, die auf eine schädliche Wirkung des Kühlkatheters hindeuten. Das Einbringen der jeweiligen Katheter in die ACC war in beiden Gruppen mit einer geringen Anzahl lokal begrenzter und sehr leichter Gewebeaffektionen verbunden. Die histopathologische Untersuchung der ACCs ergab jedoch keinen Hinweis

## Diskussion

---

auf eine zusätzliche Gewebeschädigung oder einen anderen schädlichen Einfluss des Kühlkatheters oder der Behandlung. Die Mediaverdickung war in der Hypothermiegruppe tendenziell sogar am geringsten, wobei aber keine statistische Signifikanz erreicht wurde ( $p=0,08$ ). Dieser P-Wert ist sehr nahe an der statistischen Signifikanz und es könnte durchaus möglich sein, dass ein protektiver Effekt der Hypothermie auf das lokale Gefäßendothel aufgrund einer nur moderaten statistischen Power ( $n=10$ /Gruppe) nicht statistisch validiert werden konnte (Fehler 2. Art). Zukünftige Untersuchungen sollten sich also auch der Fragestellung widmen, ob durch den Einsatz des Kühlkatheters eine geringgradige, lokale Mediaprotektion erreicht werden könnte. Durch die Beobachtungszeit von 30 Tagen war es zudem möglich, Spätfolgen des Kathetereinsatzes festzustellen und somit die Sicherheit gut beurteilen zu können. Das Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR) Experten-Konsortium (FISHER et al. 2009) rät zu einer Beobachtungszeit von mindestens 4 Wochen nach Schlaganfallsetzung, um einen nachhaltigen Erfolg nachweisen zu können, was in diesem Versuchsaufbau gegeben war. Die Sicherheit des Kathetereinsatzes konnte demnach erfolgreich nachgewiesen werden. Da das Vorbringen der Katheter in allen Fällen reibungslos gelang, kann ebenfalls von einer hervorragenden Machbarkeit des Verfahrens ausgegangen werden.

Die Kühlleistung des Kühlkatheters entsprach eindeutig den Erwartungen. Die intranasale Temperatur als Surrogat der Gehirntemperatur sank bereits innerhalb der ersten 20 Minuten, das heißt vor einer hypothetischen Rekanalisation, um etwa  $1,7^{\circ}\text{C}$  und innerhalb der nächsten 10 Minuten weiter um  $2,06^{\circ}\text{C}$ . Eine Absenkung der nasalen Temperatur um  $2^{\circ}\text{C}$  nach 30 Minuten ermöglicht es, ein hinreichendes Maß lokaler Kühlung zu erreichen, ohne die mechanischen Thrombektomie zu verzögern. Es kann, abhängig von der Ausgangstemperatur des Patienten, eine Temperatur von  $35^{\circ}\text{C}$  (milde Hypothermie) im therapeutischen Zeitfenster erreicht werden, die eine Neuroprotektion des Gehirngewebes ermöglichen sollte (CATTANEO et al. 2016). Nach einer Stunde lokaler selektiver Hypothermie fiel die intranasale Temperatur im Vergleich zum Ausgangswert um  $3,09^{\circ}\text{C}$ . Die systemische (rektale) Temperatur blieb dahinter zurück und näherte sich erst nach 180 Minuten Abkühlung den intranasalen Temperaturen an. Dennoch sank die Körpertemperatur in der Hypothermiegruppe zu diesem Zeitpunkt um mehr als  $4^{\circ}\text{C}$ . Das bedeutet, dass systemische Nebenwirkungen der Kühlung langfristig nicht sicher ausgeschlossen werden können. Dies muss in zukünftigen Studien untersucht werden, in denen auch untersucht werden sollte, ob bereits eine kürzere Abkühlungsdauer, gegebenenfalls in Kombination mit

## Diskussion

---

einer noch höheren Kühlrate, ausreichen könnte, um neuroprotektive Effekte auf das hypoxisch-ischämische Gewebe auszuüben.

Der sekundäre Endpunkt (Wirksamkeit), zum einen eine Verbesserung des neurologischen Defizits im Sinne der therapeutischen Effektivität und zum anderen die Reduktion des Infarktausmaßes im MRT, wurden in dieser Studie nicht erreicht. Die mittlere AUC der Ergebnisse der neurologischen Verhaltenstests war in der Hypothermiegruppe (n=10; 34) zwar niedriger als in der Normothermiegruppe (n=10; 53), der p-Wert von 0,83 legt aber nahe, die Nullhypothese zu akzeptieren. Dies wird üblicherweise ab  $p=0,4$  empfohlen. Die Größe der Läsionen im MRT an Tag 30 war zwischen den Gruppen vergleichbar.

Großtiere wie Schafe sind Zuchttiere, bei denen die Variabilität zwischen den Versuchstieren nach einem Schlaganfall aufgrund individueller Unterschiede in der Kollateralisierung und Anatomie der Blutgefäße höher ist als bei Inzuchtnagerstämmen (Kapitel 3.1 & 3.3). Dies erhöht auch die Variabilität der funktionellen Endpunkte zwischen den Versuchstieren und vermindert die statistische Trennschärfe. Diese Situation ähnelt der, die bei menschlichen Schlaganfallpatienten beobachtet werden kann, und ist daher realistischer als bei Nagetiermodellen. Andererseits kann die höhere Variabilität auch potenzielle therapeutische Effekte von geringer bis mittlerer Größe statistisch «verdecken». Zukünftige Studien sollten daher, wenn finanziell möglich, deutlich mehr Versuchstiere einschließen. Dazu sollte eine Gruppengrößenabschätzung vorgenommen werden, wofür der Effekt des Interventionsverfahrens auf den jeweiligen primären Endpunkt sowie die zu erwartende Streuung der Messwerte (Standardabweichung) aus Vordaten abgeschätzt werden muss. Therapeutische Effekte sollten nach Expertenempfehlungen im realistischerweise mit einer Effektstärke von 10-20 % angenommen werden (MACLEOD et al. 2008). Die empfohlene statistische Power beträgt 80 %.

Unsere Studie unterliegt einer Reihe von Einschränkungen. Die offensichtlichste und gravierendste ist die fehlende Randomisierung, die aus logistischen Gründen nicht durchgeführt werden konnte. Die Studie wurde als eine explorative Sicherheits- und Machbarkeitsstudie konzipiert, die nicht zwingend eine Randomisierung erfordert. Das Fehlen der Randomisierung hat die Studie weiterhin wahrscheinlich nicht zu Gunsten der Hypothermiegruppe verzerrt, da sich die Tiere in dieser Gruppe statistisch nicht von denen der Normothermiegruppe unterscheiden. Daher können wir mit hinreichender Sicherheit davon ausgehen, dass ein falsch-positives Ergebnis hinsichtlich der primären Endpunkte unwahrscheinlich ist. Es bestand sogar eine geringe, statistisch nicht signifikante Mittelwertverschiebung zu Gunsten der Normothermiegruppe (1,26 zu 1,17). Ein

durchschnittlich um etwa 16 % höheres mittleres Infarktvolumen und ein um 37 % höheres Ödem könnten auf eine solche Verzerrung hindeuten, die sich möglicherweise mit der fehlenden Randomisierung erklären ließe. Da die Hypothermie- nach der Normothermiegruppe in den Versuch eingeschlossen wurde, könnte eine fortgeschrittene Routine in der technisch anspruchsvollen Infarktinduktion zu leicht größeren Infarkt- und damit Ödemvolumina geführt haben. Die fehlende Randomisierung hatte darüber hinaus noch weitere Konsequenzen, insbesondere ein höheres Alter und Gewicht der Hypothermiegruppe zu Versuchsbeginn. Dies könnte sich unter Umständen auf sekundäre Endpunkte ausgewirkt haben. Das unterstreicht eindrucksvoll die Notwendigkeit der Einbeziehung geeigneter Randomisierungsparadigmen in zukünftigen konfirmativen Studien. Eine zweite Einschränkung unserer Studie ist die relativ große interindividuelle Variabilität im Verhaltensergebnis, die möglicherweise verhindert hat, dass moderate Effektgrößen hinsichtlich der Effektivität statistisch nachgewiesen wurden.

Das erste MRT nach Infarktinduktion wurde jedoch erst an Tag 2 aufgenommen. Theoretisch wäre es daher ebenfalls denkbar, dass der Einsatz der selektiven Hypothermie mittels Katheter für die leicht erhöhten, hier statistisch nicht signifikanten Infarkt- und Ödemvolumina verantwortlich ist. Diese Alternativhypothese muss in zukünftigen, effektivitätsorientierten Studien als (sekundärer) Sicherheitsendpunkt überprüft werden. Eine Randomisierung der Versuchstiere und eine Abschätzung der zu erwartenden Infarktgröße ohne Intervention noch während der Okklusion würden hierzu hinreichend sein. Da aber in keinem anderen Sicherheitsendpunkt Hinweise auf eine mögliche schädigende Wirkung der Hypothermie gefunden wurden und derartige Effekte auch in der Literatur nicht beschrieben sind, legt nahe, dass unsere Studie trotz dieser Einschränkungen mit hinreichender Sicherheit gezeigt hat, dass der getestete Kühlkatheter nach einem ischämischen Schlaganfall sicher und gut eingesetzt werden kann.

### 4.5 Fazit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Vor- und Nachteile bestehender Großtiermodelle in der neurointerventionellen Forschung zu analysieren und ein Schlaganfallmodell im Schaf mit praktikabler bildgebender Beurteilung zu etablieren, welches von uns in einer noch nicht veröffentlichten Studie auch verwendet wurde.

Die zu Beginn gestellten Fragen können wie folgt beantwortet werden:

1. Vorteile und Einsatz von Großtiermodellen. Erzeugung eines Schlaganfallmodells im Großtier.

## Diskussion

---

Es bestehen vielfältige Möglichkeiten, Schlaganfälle im Großtier zu erzeugen, diese reichen von permanenten Gefäßverschlüssen durch Elektrokoagulation bis hin zu transienten Gefäßverschlüssen durch im Labor hergestellte und ins Gefäß verbrachte Thromben oder Emboli. Großtiermodelle sind unter anderem aufgrund der Gefäßgröße für die Entwicklung und Leistungsbeurteilung neuer endovaskulärer Verfahren im hohen Maße relevant. Großtiere werden daher vielfältig eingesetzt. Andererseits muss festgestellt werden, dass beim Einsatz von Großtieren im Bereich der Methodik Raum für Verbesserungen besteht und das volle Potenzial dieser Tiermodelle damit noch nicht ausgeschöpft ist.

2. Schlaganfallsetzung für einen temporären Verschluss. Bildgebende Beurteilung des temporären Verschlusses und des Perfusionsdefizits.

Eine solide Methodik und ein stabiles Tiermodell sind für die Durchführung von tierexperimentellen Studien unerlässlich. Zu diesem Zweck wurden im Pilotversuch Schlaganfallmodelle beim Schaf evaluiert und eine bildgestützte Nachweismöglichkeit für den erfolgreichen Verschluss der ACM etabliert. Hier hat sich der Ansatz von Boltze et al. (BOLTZE et al. 2008) als geeignet erwiesen, um einen zuverlässigen Verschluss der ACM zu erreichen; für einen temporären Verschluss wurde allerdings ein gefäßverschließender Clip platziert und primär keine Elektrokoagulation vorgenommen. Die CT-Perfusion konnte als zuverlässiges und effizientes Bildgebungsverfahren bestätigt werden, um indirekt den Verschluss der ACM zu nachzuweisen.

3. Das getestete Kühlkathetersystem ist technisch komplikationsfrei sowie gut und ohne medizinische Sicherheitsbedenken einsetzbar.

Das Schlaganfallmodell aus unserem Pilotversuch wurde in unserer Studie für eine Rekanalisation in Kombination mit Hypothermie verwendet. Dabei ergab sich die Sicherheit und Machbarkeit des Kühlkathetersystems.

## 5 Zusammenfassung

**Andrea Maria Herrmann**

### **Großtiermodelle in der neurointerventionellen Forschung: systematische Methodenübersicht und Anwendungsbeispiel**

Veterinär-Anatomisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig  
Klinik für Neuroradiologie des Universitätsklinikums Freiburg

Eingereicht im Juli 2020

(73 Seiten, 16 Abbildungen, 7 Tabellen, 263 Literaturangaben, 16 Seiten Anhang)

*Schlüsselwörter: Großtiermodelle, Neurointervention, endovaskulär, Schaf, Schlaganfall, Bildgebung, Rekanalisation, Hypothermie*

**Einleitung:** Der Schlaganfall ist die zweithäufigste Todesursache weltweit. Für die Therapie des ischämischen Schlaganfalls steht derzeit nur eine bewährte Methode zur Verfügung, die Rekanalisation durch Thrombektomie oder Fibrinolyse mit recombinant tissue plasminogen activator. Doch ein enges therapeutisches Zeitfenster und Kontraindikationen führen dazu, dass weniger als 10 % der Patienten davon profitieren können. Die Suche nach alternativen Therapiestrategien ist zwingend erforderlich. Eine vielversprechende Alternative ist Neuroprotektion durch Hypothermie, die sich gut mit Rekanalisationsverfahren kombinieren ließe. Für die Erforschung neuer Therapiestrategien sind präklinische Studien nötig. Da sich Nagetiermodelle nur bedingt für die Erforschung neurointerventioneller Therapien eignen, ist hier der Einsatz von Großtieren unerlässlich. Schafe eignen sich aufgrund einiger Vorteile für Schlaganfallmodelle. Bei Rekanalisationsstudien ist es notwendig, den temporären Verschluss eines Gehirngefäßes nachweisen zu können.

**Ziele der Untersuchungen:** Ziel dieser Arbeit war zum einen die Darstellung der Vor- und Nachteile und des Einsatzes von Großtieren in der neurointerventionellen Forschung. Weitere Ziele dieser Arbeit waren die Evaluierung eines Schaf-Schlaganfallmodells und die Testung eines geeigneten Verfahrens zur zuverlässigen Darstellung eines temporären Gefäßverschlusses (Etablierungsstudie). Darüber hinaus sollte die Testung eines Kühlkathetersystems für eine Kombination von Rekanalisation und Hypothermie erfolgen (Sicherheits- und Machbarkeitsstudie).

**Material und Methoden:** Für den Überblick über den Einsatz von Großtieren in der neurointerventionellen Forschung wurde ein systematisches Review angefertigt. Durch die Suche in zwei Datenbanken wurden 5250 Publikationen identifiziert und anhand der Abstracts deren Inhalt überprüft. 540 Arbeiten wurden einer Volltextauswertung unterzogen

## Zusammenfassung

---

und 334 Paper letztendlich eingeschlossen. In der Etablierungsstudie zur Evaluierung eines Schlaganfallmodells wurde bei zehn Schafen ein Schlaganfall induziert. Danach wurden eine digitale Subtraktionsangiographie (DSA), eine Magnetresonanztomografie (MRT), eine Magnetresonanzangiographie (MRA), sowie eine Computertomografie (CT) einschließlich -perfusion und -angiographie durchgeführt. In der darauffolgenden Sicherheits- und Machbarkeitsstudie wurde bei 20 Schafen ein Schlaganfall induziert. Primäre Endpunkte waren die Sicherheit und Machbarkeit des neuen Kühlkatheters. Als sekundärer Endpunkt wurde unter anderem die Beurteilung der neurologischen Funktion gewählt.

**Ergebnisse:** Das Review zeigt den vielfältigen Einsatz von Großtiermodellen und deren klinische Relevanz. Das Review zeigt auch auf, dass bei Studien mit Großtieren noch die Notwendigkeit für Verbesserungen besteht, allen voran Randomisierung und Verblindung. In der Etablierungsstudie konnte die DSA den Gefäßverschluss nicht zuverlässig nachweisen. Die CT-Perfusion hingegen war gut geeignet, um den Gefäßverschluss über die Hirnminderperfusion zu belegen. Die Time-of-Flight-MRA hat sich zur Darstellung eines permanenten Gefäßverschlusses als zuverlässig erwiesen. Die diffusionsgewichtete Bildgebung im MRT ist geeignet, die endgültige Infarktgröße zu bestimmen. Die Sicherheit und Machbarkeit des Kühlkatheters konnte nachgewiesen werden, da keine Gefäßschäden durch histologische Untersuchungen zu finden waren und eine ausreichend schnelle und tiefe Kühlung des Gehirns erreicht werden konnte. Die klinisch-neurologische Bewertung der Tiere ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

**Schlussfolgerungen:** Insgesamt lässt sich der Schluss ziehen, dass die Erforschung von therapeutischen Alternativen für den Schlaganfall enorm wichtig und der Einsatz von Großtieren unerlässlich ist. Das Schaf eignet sich gut für diesen Einsatz. Der getestete Kühlkatheter ist komplikationsfrei und ohne medizinische Sicherheitsbedenken einsetzbar. Die Wirksamkeit sollte nun in einer verblindeten, randomisierten Studie mit ausreichender Gruppengröße getestet werden.

### 6 Summary

**Andrea Maria Herrmann**

**Large animal models in neurointerventional research: systematic overview of methods and application example**

Institute of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Department of Neuroradiology, Faculty of Medicine, Medical Center – University of Freiburg

Submitted in July 2020

(73 pages, 16 figures, 7 tables, 263 references, 16 pages appendices)

*Keywords: large animal model, neurointervention, endovascular, sheep, stroke, imaging, recanalization, hypothermia*

**Introduction:** Stroke is the second leading cause of death worldwide. Currently, only one proven method is available for the therapy of ischemic stroke, recanalization by thrombectomy or fibrinolysis with recombinant tissue plasminogen activator. However, a narrow therapeutic time window and contraindications mean that less than 10 % of patients can benefit from it. The search for alternative therapeutic strategies is imperative. A promising alternative is neuroprotection by hypothermia, which could be well combined with recanalization. Preclinical studies are necessary to research new therapeutic strategies. Since rodent models are only of limited use for research into neurointerventional therapies, the use of large animals is essential here. Sheep are suitable for stroke models due to some advantages. In recanalization studies, it is necessary to be able to detect the temporary occlusion of a cerebral vessel.

**Objectives of the investigations:** On the one hand the aim of this thesis was to present the advantages and disadvantages and the use of large animals in neurointerventional research. Further objectives of this work were the evaluation of a sheep stroke model and the testing of a suitable method for the reliable representation of a temporary vascular occlusion (establishment study). In addition, testing of a cooling catheter system for combined mechanical thrombectomy and selective therapeutic hypothermia should be carried out (safety and feasibility study).

**Materials and methods:** A systematic review of the use of large animals in neurointerventional research was carried out. By searching in two databases 5250 publications were identified and their content was checked by means of the abstracts. 540

## Summary

---

papers were subjected to a full-text evaluation and 334 papers were finally included. In the establishment study for the evaluation of a stroke model stroke was induced in ten sheep. Subsequently, digital subtraction angiography (DSA), magnetic resonance imaging (MRI), magnetic resonance angiography (MRA), and computed tomography (CT) including perfusion and angiography were performed. In the subsequent safety and feasibility study, stroke was induced in 20 sheep. Primary endpoints were safety and feasibility of the new cooling catheter. The secondary endpoint included the assessment of neurological function.

**Results:** The review shows the diverse use of large animal models and their clinical relevance. The review also shows that there is still a need for improvements in studies involving large animals, in particular randomisation and blinding. In the establishment study, DSA was unable to reliably detect vascular occlusion. CT perfusion, on the other hand, was well suited to prove vascular occlusion via brain hypoperfusion. Time-of-flight MRA has proven to be reliable to demonstrate permanent vascular occlusion. Diffusion-weighted imaging in MRI is suitable for determining the final infarct size. The safety and feasibility of the cooling catheter could be proven, since no vessel damage was found by histological examinations and a sufficiently fast and deep cooling of the brain could be achieved. However, the clinical-neurological evaluation of the animals showed no significant difference between the groups.

**Conclusion:** In conclusion, research into therapeutic alternatives for stroke is enormously important and the use of large animals is indispensable. Sheep is well suited for this use. The tested cooling catheter can be used without complications and without medical safety concerns. The efficacy should now be tested in a blinded, randomized study with sufficient group size.

## 7 References

- Adibi A, Eesa M, Wong JH, Sen A, Mitha AP. Combined endovascular coiling and intraneurysmal allogeneic mesenchymal stromal cell therapy for intracranial aneurysms in a rabbit model: a proof-of-concept study. *J Neurointerv Surg.* 2017;9(7):707–12.
- Albers GW, Marks MP, Kemp S, Christensen S, Tsai JP, Ortega-Gutierrez S, et al. Thrombectomy for Stroke at 6 to 16 Hours with Selection by Perfusion Imaging. *N Engl J Med.* 2018;378(8):708–18.
- Alfke K, Jensen U, Pool C, Rohr A, Brüning R, Weber J, et al. Contrast-enhanced magnetic resonance angiography in stroke diagnostics: additional information compared with time-of-flight magnetic resonance angiography? *Clin Neuroradiol.* 2011;21(1):5–10.
- Al-Senani FM, Graffagnino C, Grotta JC, Saiki R, Wood D, Chung W, et al. A prospective, multicenter pilot study to evaluate the feasibility and safety of using the CoolGard System and Icy catheter following cardiac arrest. *Resuscitation.* 2004;62(2):143–50.
- Altes TA, Cloft HJ, Short JG, DeGast A, Do HM, Helm GA, Kallmes DF. 1999 ARRS Executive Council Award. Creation of saccular aneurysms in the rabbit: a model suitable for testing endovascular devices. *American Roentgen Ray Society. AJR Am J Roentgenol.* 2000;174(2):349–54.
- Amantea D, Nappi G, Bernardi G, Bagetta G, Corasaniti MT. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS J.* 2009;276(1):13–26.
- Andresen M, Gazmuri JT, Marín A, Regueira T, Rovegno M. Therapeutic hypothermia for acute brain injuries. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2015;23:42.
- Aspey BS, Taylor FL, Terruli M, Harrison MJ. Temporary middle cerebral artery occlusion in the rat: consistent protocol for a model of stroke and reperfusion. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2000;26(3):232–42.
- Atchaneeyasakul K, Guada L, Ramdas K, Watanabe M, Bhattacharya P, Raval AP, Yavagal DR. Large animal canine endovascular ischemic stroke models: A review. *Brain Res Bull.* 2016;127:134–40.
- Badea CT, Drangova M, Holdsworth DW, Johnson GA. In vivo small-animal imaging using micro-CT and digital subtraction angiography. *Phys Med Biol.* 2008;53(19):R319-50.

## References

---

- Bebarta V, Luyten D, Heard K. Emergency medicine animal research: does use of randomization and blinding affect the results? *Acad Emerg Med*. 2003;10(6):684–7.
- Benes V, Zabramski JM, Boston M, Puca A, Spetzler RF. Effect of intra-arterial tissue plasminogen activator and urokinase on autologous arterial emboli in the cerebral circulation of rabbits corrected. *Stroke*. 1990;21(11):1594–9.
- Berger C, Schabitz WR, Wolf M, Mueller H, Sommer C, Schwab S. Hypothermia and brain-derived neurotrophic factor reduce glutamate synergistically in acute stroke. *Exp Neurol*. 2004;185(2):305–12.
- Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2015;372(1):11–20.
- Bernard SA, Gray TW, Buist MD. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *ACC Current Journal Review*. 2002;11(4):82–3.
- Beuing O, Boese A, Kyriakou Y, Deuerling-Zengh Y, Jöllenbeck B, Scherlach C, et al. A novel technique for the measurement of CBF and CBV with robot-arm-mounted flat panel CT in a large-animal model. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2014;35(9):1740–5.
- Bhaskar S, Stanwell P, Cordato D, Attia J, Levi C. Reperfusion therapy in acute ischemic stroke: dawn of a new era? *BMC Neurol*. 2018;18(1):8.
- Boltze J, Forschler A, Nitzsche B, Waldmin D, Hoffmann A, Boltze CM, et al. Permanent middle cerebral artery occlusion in sheep: a novel large animal model of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008;28(12):1951–64.
- Boltze J, Nitzsche F, Jolkkonen J, Weise G, Pösel C, Nitzsche B, Wagner D-C. Concise Review: Increasing the Validity of Cerebrovascular Disease Models and Experimental Methods for Translational Stem Cell Research. *Stem Cells*. 2017;35(5):1141–53.
- Bostedt H, Dedié K. Schaf- und Ziegenkrankheiten: 92 Tabellen. 2nd ed. Stuttgart: Ulmer; 1996.
- Bouzehrane F, Naggara O, Kallmes DF, Berenstein A, Raymond J. In vivo experimental intracranial aneurysm models: a systematic review. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2010;31(3):418–23.
- Breckenfeld C, Schroth G, El-Koussy M, Nedeltchev K, Reinert M, Slotboom J, Gralla J. Mechanical thromboembolectomy for acute ischemic stroke: comparison of the catch thrombectomy device and the Merci Retriever in vivo. *Stroke*. 2008;39(4):1213–9.

## References

---

- Brunser AM, Hoppe A, Illanes S, Díaz V, Muñoz P, Cárcamo D, et al. Accuracy of diffusion-weighted imaging in the diagnosis of stroke in patients with suspected cerebral infarct. *Stroke*. 2013;44(4):1169–71.
- Byrne JA. Improving the peer review of narrative literature reviews. *Res Integr Peer Rev*. 2016;1:12.
- Cai B, Wang N. Large Animal Stroke Models vs. Rodent Stroke Models, Pros and Cons, and Combination? *Acta Neurochir Suppl*. 2016;121:77–81.
- Cairó O. External measures of cognition. *Front Hum Neurosci*. 2011;5:108.
- Campbell BCV, Donnan GA, Lees KR, Hacke W, Khatri P, Hill MD, et al. Endovascular stent thrombectomy: the new standard of care for large vessel ischaemic stroke. *Lancet Neurol*. 2015;14(8):846–54.
- Campbell BCV, Hill MD, Rubiera M, Menon BK, Demchuk A, Donnan GA, et al. Safety and Efficacy of Solitaire Stent Thrombectomy: Individual Patient Data Meta-Analysis of Randomized Trials. *Stroke*. 2016;47(3):798–806.
- Cao Z, Balasubramanian A, Pedersen SE, Romero J, Pautler RG, Marrelli SP. TRPV1-mediated Pharmacological Hypothermia Promotes Improved Functional Recovery Following Ischemic Stroke. *Sci Rep*. 2017;7(1):17685.
- Carniato S, Mehra M, King RM, Wakhloo AK, Gounis MJ. Porcine brachial artery tortuosity for in vivo evaluation of neuroendovascular devices. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2013;34(4):E36-8.
- Cattaneo G, Schumacher M, Wolfertz J, Jost T, Meckel S. Combined Selective Cerebral Hypothermia and Mechanical Artery Recanalization in Acute Ischemic Stroke: In Vitro Study of Cooling Performance. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015;36(11):2114–20.
- Cattaneo G, Schumacher M, Maurer C, Wolfertz J, Jost T, Buchert M, et al. Endovascular Cooling Catheter for Selective Brain Hypothermia: An Animal Feasibility Study of Cooling Performance. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016;37(5):885–91.
- Cha S-H, Han MH, Choi YH, Yoon CJ, Baik SK, Kim SJ, Chang K-H. Vascular responses in normal canine carotid arteries: comparison between various self-expanding stents of the same unconstrained size. *Invest Radiol*. 2003;38(2):95–101.
- Chaloupka JC, Viñuela F, Robert J, Duckwiler GR. An in vivo arteriovenous malformation model in swine: preliminary feasibility and natural history study. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1994;15(5):945–50.

## References

---

- Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol.* 2016;15(8):869–81.
- Charriaut-Marlangue C, Margaille I, Represa A, Popovici T, Plotkine M, Ben-Ari Y. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16(2):186–94.
- Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med.* 2005;39(7):841–52.
- Chueh J-Y, Kühn AL, Puri AS, Wilson SD, Wakhloo AK, Gounis MJ. Reduction in distal emboli with proximal flow control during mechanical thrombectomy: a quantitative in vitro study. *Stroke.* 2013;44(5):1396–401.
- Chueh J-Y, Puri AS, Wakhloo AK, Gounis MJ. Risk of distal embolization with stent retriever thrombectomy and ADAPT. *J Neurointerv Surg.* 2016;8(2):197–202.
- Chueh JY, Wakhloo AK, Gounis MJ. Effectiveness of mechanical endovascular thrombectomy in a model system of cerebrovascular occlusion. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2012;33(10):1998–2003.
- Chung D-J, Choi C-B, Lee S-H, Kang E-H, Lee J-H, Hwang S-H, et al. Intraarterially delivered human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in canine cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* 2009;87(16):3554–67.
- Clark DL, Penner M, Orellana-Jordan IM, Colbourne F. Comparison of 12, 24 and 48 h of systemic hypothermia on outcome after permanent focal ischemia in rat. *Exp Neurol.* 2008;212(2):386–92.
- Covaciu L, Allers M, Enblad P, Lunderquist A, Wieloch T, Rubertsson S. Intranasal selective brain cooling in pigs. *Resuscitation.* 2008;76(1):83–8.
- Dai D, Ding YH, Kadirvel R, Rad AE, Lewis DA, Kallmes DF. Patency of branches after coverage with multiple telescoping flow-diverter devices: an in vivo study in rabbits. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2012;33(1):171–4.
- Deng H, Han HS, Cheng D, Sun GH, Yenari MA. Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation. *Stroke.* 2003;34(10):2495–501.
- Diaz FG, Mastro AR, Ausman JI, Chou SN. Acute cerebral revascularization: part I. Cerebral ischemia experimental animal model. *Surg Neurol.* 1979;12(5):353–62.
- Ding Y, Dai D, Kadirvel R, Lewis DA, Kallmes DF. Creation of large elastase-induced aneurysms: presurgical arterial remodeling using arteriovenous fistulas. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2010;31(10):1935–7.

## References

---

- Ding Y, Dai D, Kallmes DF, Schroeder D, Kealey CP, Gupta V, et al. Preclinical Testing of a Novel Thin Film Nitinol Flow-Diversion Stent in a Rabbit Elastase Aneurysm Model. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016;37(3):497–501.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. 1999;22(9):391–7.
- Dorr A, Sled JG, Kabani N. Three-dimensional cerebral vasculature of the CBA mouse brain: a magnetic resonance imaging and micro computed tomography study. *Neuroimage*. 2007;35(4):1409–23.
- Edwards P, Clarke M, DiGiuseppi C, Pratap S, Roberts I, Wentz R. Identification of randomized controlled trials in systematic reviews: accuracy and reliability of screening records. *Stat Med*. 2002;21(11):1635–40.
- Eich T, Eriksson O, Sundin A, Estrada S, Brandhorst D, Brandhorst H, et al. Positron emission tomography: a real-time tool to quantify early islet engraftment in a preclinical large animal model. *Transplantation*. 2007;84(7):893–8.
- English JD, Hetts SW, El-Ali A, Kolli P, Do L, Wilson MW, Saeed M. A novel model of large vessel ischemic stroke in rabbits: microcatheter occlusion of the posterior cerebral artery. *J Neurointerv Surg*. 2015;7(5):363–6.
- Fahed R, Raymond J, Ducroux C, Gentric J-C, Salazkin I, Ziegler D, et al. Testing flow diversion in animal models: a systematic review. *Neuroradiology*. 2016;58(4):375–82.
- Falcao ALE, Reutens DC, Markus R, Koga M, Read SJ, Tochon-Danguy H, et al. The resistance to ischemia of white and gray matter after stroke. *Ann Neurol*. 2004;56(5):695–701.
- Feigin VL, Norrving B, Mensah GA. Global Burden of Stroke. *Circ Res*. 2017;120(3):439–48.
- Feng L, Liu J, Chen J, Pan L, Feng G. Establishing a model of middle cerebral artery occlusion in rabbits using endovascular interventional techniques. *Exp Ther Med*. 2013;6(4):947–52.
- Feng L, Liu J, Liu Y, Chen J, Su C, Lv C, Wei Y. Tirofiban combined with urokinase selective intra-arterial thrombolysis for the treatment of middle cerebral artery occlusion. *Exp Ther Med*. 2016;11(3):1011–6.
- Fennell VS, Setlur Nagesh SV, Meess KM, Gutierrez L, James RH, Springer ME, Siddiqui AH. What to do about fibrin rich 'tough clots'? Comparing the Solitaire stent retriever with a novel geometric clot extractor in an in vitro stroke model. *J Neurointerv Surg*. 2018;10(9):907–10.

## References

---

- Feuerstein D, Backes H, Gramer M, Takagaki M, Gabel P, Kumagai T, Graf R. Regulation of cerebral metabolism during cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36(11):1965–77.
- Fisher M, Saver JL. Future directions of acute ischaemic stroke therapy. *Lancet Neurol.* 2015;14(7):758–67.
- Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, Lo EH. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke.* 2009;40(6):2244–50.
- Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:3445–54.
- Forrest MD, O'Reilly GV. Production of experimental aneurysms at a surgically created arterial bifurcation. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1989;10(2):400–2.
- Förschler A, Boltze J, Waldmin D, Gille U, Zimmer C. MR-Bildgebung eines experimentellen Schlaganfallmodells beim Schaf. *Rofo.* 2007;179(5):516–24.
- Frackowiak H, Godynicki S. Brain basal arteries in various species of Felidae. *Pol J Vet Sci.* 2003;6(3):195–200.
- Fujii M, Hara H, Meng W, Vonsattel JP, Huang Z, Moskowitz MA. Strain-related differences in susceptibility to transient forebrain ischemia in SV-129 and C57black/6 mice. *Stroke.* 1997;28(9):1805-10; discussion 1811.
- Fukuyama N, Tsukamoto Y, Takizawa S, Ikeya Y, Fujii T, Shinozaki Y, et al. Altered blood flow in cerebral perforating arteries of rat models of diabetes: A synchrotron radiation microangiographic study toward clinical evaluation of white matter hyperintensities. *Geriatr Gerontol Int.* 2015;15 Suppl 1:74–80.
- Garcia-Bonilla L, Moore JM, Racchumi G, Zhou P, Butler JM, Iadecola C, Anrather J. Inducible nitric oxide synthase in neutrophils and endothelium contributes to ischemic brain injury in mice. *J Immunol.* 2014;193(5):2531–7.
- Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, Velden J, Arunachalam P, Steinbach K, et al. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood.* 2012;120(18):3793–802.
- Georganos SA, Guilbert F, Salazkin I, Gévry G, Raymond J. Surgical construction of an in vivo carotid siphon model to test neurovascular devices. *NEUROSURGERY.* 2004;54(5):1239-43; discussion 1243.
- Geremia G, Bakon M, Brennecke L, Haklin M. Experimental arteriovenous fistulas: treatment with porous metallic stents. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1995;16(10):1965–73.

## References

---

- GERMAN WJ, BLACK SP. Experimental production of carotid aneurysms. *N Engl J Med.* 1954;250(3):104–6.
- Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke.* 1989;20(12):1627–42.
- Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology.* 2008;55(3):363–89.
- Giuliani E, Magnoni S, Fei M, Addis A, Zanasi R, Stocchetti N, Barbieri A. A Novel Cooling Device for Targeted Brain Temperature Control and Therapeutic Hypothermia: Feasibility Study in an Animal Model. *Neurocrit Care.* 2016;25(3):464–72.
- Gory B, Bresson D, Kessler I, Perrin ML, Guillaudeau A, Durand K, et al. Histopathologic evaluation of arterial wall response to 5 neurovascular mechanical thrombectomy devices in a swine model. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2013;34(11):2192–8.
- Gounis MJ, Lieber BB, Wakhloo AK, Siekmann R, Hopkins LN. Effect of glacial acetic acid and ethiodized oil concentration on embolization with N-butyl 2-cyanoacrylate: an in vivo investigation. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2002;23(6):938–44.
- Gounis MJ, Nogueira RG, Mehra M, Chueh J, Wakhloo AK. A thromboembolic model for the efficacy and safety evaluation of combined mechanical and pharmacologic revascularization strategies. *J Neurointerv Surg.* 2013;5 Suppl 1:i85-9.
- Gounis MJ, Wakhloo AK, Chueh J-Y. Preclinical investigations for thrombectomy devices--does it translate to humans? *Stroke.* 2013;44(6 Suppl 1):S7-S10.
- Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, Thornton J, et al. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2015;372(11):1019–30.
- Goyal M, Menon BK, van Zwam WH, Dippel DWJ, Mitchell PJ, Demchuk AM, et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *The Lancet.* 2016;387(10029):1723–31.
- Grad Y, Sievert H, Nishri B, Stone GW, Katzen BT, Yodfat O, et al. A novel endovascular device for emboli rerouting: part I: evaluation in a Swine model. *Stroke.* 2008;39(10):2860–6.
- Gralla J, Schroth G, Remonda L, Fleischmann A, Fandino J, Slotboom J, Brekenfeld C. A dedicated animal model for mechanical thrombectomy in acute stroke. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2006;27(6):1357–61.

## References

---

- Guglielmi G, Ji C, Massoud TF, Kurata A, Lownie SP, Viñuela F, Robert J. Experimental saccular aneurysms. II. A new model in swine. *Neuroradiology*. 1994;36(7):547–50.
- Gumbinger C, Reuter B, Stock C, Sauer T, Wiethölter H, Bruder I, et al. Time to treatment with recombinant tissue plasminogen activator and outcome of stroke in clinical practice: retrospective analysis of hospital quality assurance data with comparison with results from randomised clinical trials. *BMJ*. 2014;348:g3429.
- Hagen MW, Girdhar G, Wainwright J, Hinds MT. Thrombogenicity of flow diverters in an ex vivo shunt model: effect of phosphorylcholine surface modification. *J Neurointerv Surg*. 2017;9(10):1006–11.
- Haider T, Plasenzotti R, Bergmeister H, Mach G, Kleinpeter G, Aguilar-Perez M, Sherif C. New mechanical thrombectomy model in the rabbit: A feasibility study. *J Neurosci Methods*. 2016;271:139–42.
- Hansen AJ, Lauritzen M. The role of spreading depression in acute brain disorders. *An Acad Bras Cienc*. 1984;56(4):457–79.
- Härtig W, Mages B, Aleithe S, Nitzsche B, Altmann S, Barthel H, et al. Damaged Neocortical Perineuronal Nets Due to Experimental Focal Cerebral Ischemia in Mice, Rats and Sheep. *Front Integr Neurosci*. 2017;11:15.
- Hartings JA, Rolli ML, Lu X-CM, Tortella FC. Delayed secondary phase of peri-infarct depolarizations after focal cerebral ischemia: relation to infarct growth and neuroprotection. *J Neurosci*. 2003;23(37):11602–10.
- Hayakawa T, Waltz AG. Intracranial pressure, blood pressure, and pulse rate after occlusion of a middle cerebral artery in cats. *J Neurosurg*. 1975;43(4):399–407.
- Heiss W-D, Zaro-Weber O. Validation of MRI Determination of the Penumbra by PET Measurements in Ischemic Stroke. *J Nucl Med*. 2017;58(2):187–93.
- Hemmen TM, Raman R, Guluma KZ, Meyer BC, Gomes JA, Cruz-Flores S, et al. Intravenous thrombolysis plus hypothermia for acute treatment of ischemic stroke (ICTuS-L): final results. *Stroke*. 2010;41(10):2265–70.
- Herrmann AM, Meckel S, Gounis MJ, Kringe L, Motschall E, Mülling C, Boltze J. Large animals in neurointerventional research: A systematic review on models, techniques and their application in endovascular procedures for stroke, aneurysms and vascular malformations. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2019;39(3):375–94.
- Herrmann AM, Cattaneo GFM, Eiden SA, Wieser M, Kellner E, Maurer C, et al. Development of a Routinely Applicable Imaging Protocol for Fast and Precise Middle

## References

---

- Cerebral Artery Occlusion Assessment and Perfusion Deficit Measure in an Ovine Stroke Model: A Case Study. *Front Neurol.* 2019;10:1113.
- Hong JM, Lee JS, Song H-J, Jeong HS, Jung H-S, Choi HA, Lee K. Therapeutic hypothermia after recanalization in patients with acute ischemic stroke. *Stroke.* 2014;45(1):134–40.
- Hopwood SE, Parkin MC, Bezzina EL, Boutelle MG, Strong AJ. Transient changes in cortical glucose and lactate levels associated with peri-infarct depolarisations, studied with rapid-sampling microdialysis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25(3):391–401.
- Horn J, Haan RJ de, Vermeulen M, Limburg M. Very Early Nimodipine Use in Stroke (VENUS): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Stroke.* 2001;32(2):461–5.
- Huang J, Mocco J, Choudhri TF, Poisik A, Popilskis SJ, Emerson R, et al. A modified transorbital baboon model of reperfused stroke. *Stroke.* 2000;31(12):3054–63.
- Huang X-C, Xu W, Jiang J-Y. Effect of resuscitation after selective cerebral ultraprofound hypothermia on expressions of nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factor in the brain of monkey. *Neurosci Bull.* 2008;24(3):150–4.
- Hudgins WR, Garcia JH. Transorbital approach to the middle cerebral artery of the squirrel monkey: a technique for experimental cerebral infarction applicable to ultrastructural studies. *Stroke.* 1970;1(2):107–11.
- Imai H, Konno K, Nakamura M, Shimizu T, Kubota C, Seki K, et al. A new model of focal cerebral ischemia in the miniature pig. *J Neurosurg.* 2006;104(2 Suppl):123–32.
- Jahan R, Stewart D, Vinters HV, Yong W, Vinuela F, Vandeberg P, Marder VJ. Middle cerebral artery occlusion in the rabbit using selective angiography: application for assessment of thrombolysis. *Stroke.* 2008;39(5):1613–5.
- Jahan R. Solitaire flow-restoration device for treatment of acute ischemic stroke: safety and recanalization efficacy study in a swine vessel occlusion model. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2010;31(10):1938–43.
- Jauch EC, Saver JL, Adams HP, Bruno A, Connors JJB, Demaerschalk BM, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2013;44(3):870–947.
- Jiang Y, Li Y, Xu X, Yu Y, Liu W, Liu X. An in vitro porcine model evaluating a novel stent retriever for thrombectomy of the common carotid artery. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2016;87(3):457–64.

## References

---

- Jin R, Liu L, Zhang S, Nanda A, Li G. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013;6(5):834–51.
- Johansen FF, Hasseldam H, Nybro Smith M, Rasmussen RS. Drug-induced hypothermia by 5HT1A agonists provide neuroprotection in experimental stroke: new perspectives for acute patient treatment. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014;23(10):2879–87.
- Jovin TG, Albers GW, Liebeskind DS. Stroke Treatment Academic Industry Roundtable: The Next Generation of Endovascular Trials. *Stroke*. 2016;47(10):2656–65.
- Jung SC, Yoon B-R, Oh JS, Choi SH, Han MH, Lee JY, et al. Development of endovascular vibrating polymer actuator probe for mechanical thrombolysis: in vivo study. *ASAIO J*. 2012;58(5):503–8.
- Kadir RRA, Bayraktutan U. Urokinase Plasminogen Activator: A Potential Thrombolytic Agent for Ischaemic Stroke. *Cell Mol Neurobiol* 2019.
- Kallmes DF, Ding YH, Dai D, Kadirvel R, Lewis DA, Cloft HJ. A new endoluminal, flow-disrupting device for treatment of saccular aneurysms. *Stroke*. 2007;38(8):2346–52.
- Kallmes DF, Hanel R, Lopes D, Boccardi E, Bonafé A, Cekirge S, et al. International retrospective study of the pipeline embolization device: a multicenter aneurysm treatment study. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015;36(1):108–15.
- Kang B-T, Jang D-P, Gu S-H, Kim Y-B, Lim C-Y, Lee J-H, et al. Three-dimensional time-of-flight magnetic resonance angiography of intracranial vessels in a canine model of ischemic stroke with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Comp Med*. 2009;59(1):72–7.
- Kapoor K, Kak VK, Singh B. Morphology and comparative anatomy of circulus arteriosus cerebri in mammals. *Anat Histol Embryol*. 2003;32(6):347–55.
- Kaufmann AM, Firlik AD, Fukui MB, Wechsler LR, Jungries CA, Yonas H. Ischemic core and penumbra in human stroke. *Stroke*. 1999;30(1):93–9.
- Kawabori M, Kacimi R, Kauppinen T, Calosing C, Kim JY, Hsieh CL, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) deficiency attenuates phagocytic activities of microglia and exacerbates ischemic damage in experimental stroke. *J Neurosci*. 2015;35(8):3384–96.
- Khoshnam SE, Winlow W, Farzaneh M, Farbood Y, Moghaddam HF. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol Sci*. 2017;38(7):1167–86.
- Killer M, Kallmes DF, McCoy MR, Ding Y-H, Shum JC, Cruise GM. Angiographic and histologic comparison of experimental aneurysms embolized with hydrogel filaments. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2009;30(8):1488–95.

## References

---

- Kito G, Nishimura A, Susumu T, Nagata R, Kuge Y, Yokota C, Minematsu K. Experimental thromboembolic stroke in cynomolgus monkey. *J Neurosci Methods*. 2001;105(1):45–53.
- Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU, Marschall D, Emmert M, Baltzer N, Neundörfer B, et al. Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke*. 2006;37(5):1179–83.
- König HE, Liebich HG, editors. *Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. 4th ed. Schattauer; 2008.
- Kringe L, Sena ES, Motschall E, Bahor Z, Wang Q, Herrmann AM, et al. Quality and validity of large animal experiments in stroke: A systematic review. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2020:271678X20931062.
- Kuge Y, Yokota C, Tagaya M, Hasegawa Y, Nishimura A, Kito G, et al. Serial changes in cerebral blood flow and flow-metabolism uncoupling in primates with acute thromboembolic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21(3):202–10.
- Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip. *Cell*. 2009;138(5):838–54.
- Lalancette-Hébert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci*. 2007;27(10):2596–605.
- Lamb JA, Rajput PS, Lyden PD. Novel method for inducing rapid, controllable therapeutic hypothermia in rats using a perivascular implanted closed-loop cooling circuit. *J Neurosci Methods*. 2016;267:55–61.
- Lapchak PA, Araujo DM, Pakola S, Song D, Wei J, Zivin JA. Microplasmin: a novel thrombolytic that improves behavioral outcome after embolic strokes in rabbits. *Stroke*. 2002;33(9):2279–84.
- Lauber K, Bohn E, Kröber SM, Xiao Y-j, Blumenthal SG, Lindemann RK, et al. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*. 2003;113(6):717–30.
- Lee KC, Joo JY, Huh JS, Kim TS. Effects of repeated short versus single long episodes of focal ischemia on somatosensory evoked potentials and development of cerebral infarction in cats. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 1997;37(6):447-51; discussion 451-2.
- Lee JE, Yoon YJ, Moseley ME, Yenari MA. Reduction in levels of matrix metalloproteinases and increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2

## References

---

- in response to mild hypothermia therapy in experimental stroke. *J Neurosurg.* 2005;103(2):289–97.
- Lee RM. Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther.* 1995;66(1):149–73.
- Levy EI, Sauvageau E, Hanel RA, Parikh R, Hopkins LN. Self-expanding versus balloon-mounted stents for vessel recanalization following embolic occlusion in the canine model: technical feasibility study. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2006;27(10):2069–72.
- Li H, Wang D. Mild hypothermia improves ischemic brain function via attenuating neuronal apoptosis. *Brain Res.* 2011;1368:59–64.
- Li H, Yan J-Z, Chen Y-J, Kang W-B, Huang J-X. Non-invasive quantification of age-related changes in the vertebral endplate in rats using in vivo DCE-MRI. *J Orthop Surg Res.* 2017;12(1):169.
- Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JPA, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *PLoS Med.* 2009;6(7):e1000100.
- Lin M de, Ning L, Badea CT, Mistry NN, Qi Y, Johnson GA. A high-precision contrast injector for small animal x-ray digital subtraction angiography. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2008;55(3):1082–91.
- Linfante I, Cipolla MJ. Improving Reperfusion Therapies in the Era of Mechanical Thrombectomy. *Transl Stroke Res.* 2016;7(4):294–302.
- Liu XG, Branston NM, Kawauchi M, Symon L. A model of acute focal ischemia in the territory of the anterior cerebral artery in baboons. *Stroke.* 1992;23(1):40–4.
- Lu S-S, Liu S, Zu Q-Q, Xu X-Q, Yu J, Wang J-W, et al. In vivo MR imaging of intraarterially delivered magnetically labeled mesenchymal stem cells in a canine stroke model. *PLoS One.* 2013;8(2):e54963.
- Lu S-S, Zhang X, Xu X-Q, Cao Y-Z, Zhao LB, Liu Q-H, et al. Comparison of CT angiography collaterals for predicting target perfusion profile and clinical outcome in patients with acute ischemic stroke. *Eur Radiol.* 2019;29(9):4922–9.
- Lylyk P, Viñuela F, Vinters HV, Dion J, Bentson J, Duckwiler G, Lin T. Use of a new mixture for embolization of intracranial vascular malformations. Preliminary experimental experience. *Neuroradiology.* 1990;32(4):304–10.
- Ma L-L, Song L, Yu X-D, Yu T-X, Liang H, Qiu J-X. The clinical study on the treatment for acute cerebral infarction by intra-arterial thrombolysis combined with mild hypothermia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(8):1999–2006.

## References

---

- Mack WJ, Huang J, Winfree C, Kim G, Oppermann M, Dobak J, et al. Ultrarapid, convection-enhanced intravascular hypothermia: a feasibility study in nonhuman primate stroke. *Stroke*. 2003;34(8):1994–9.
- Macleod MR, van der Worp HB, Sena ES, Howells DW, Dirnagl U, Donnan GA. Evidence for the efficacy of NXY-059 in experimental focal cerebral ischaemia is confounded by study quality. *Stroke*. 2008;39(10):2824–9.
- Marshall JW, Ridley RM. Assessment of functional impairment following permanent middle cerebral artery occlusion in a non-human primate species. *Neurodegeneration*. 1996;5(3):275–86.
- Marx WE, Cloft HJ, Helm GA, Short JG, Do HM, Jensen ME, Kallmes DE. Endovascular treatment of experimental aneurysms by use of biologically modified embolic devices: coil-mediated intraaneurysmal delivery of fibroblast tissue allografts. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2001;22(2):323–33.
- Massoud TF, Ji C, Viñuela F, Guglielmi G, Robert J, Duckwiler GR, Gobin YP. An experimental arteriovenous malformation model in swine: anatomic basis and construction technique. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1994;15(8):1537–45.
- Masuo O, Terada T, Walker G, Tsuura M, Matsumoto H, Tohya K, et al. Study of the patency of small arterial branches after stent placement with an experimental in vivo model. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2002;23(4):706–10.
- Mattingly TK, Denning LM, Siroen KL, Lehrbass B, Lopez-Ojeda P, Stitt L, et al. Catheter based selective hypothermia reduces stroke volume during focal cerebral ischemia in swine. *J Neurointerv Surg*. 2016;8(4):418–22.
- Maurer CJ, Egger K, Dempfle A-K, Reinhard M, Meckel S, Urbach H. Facing the Time Window in Acute Ischemic Stroke: The Infarct Core. *Clin Neuroradiol*. 2016;26(2):153–8.
- Mehra M, Henninger N, Hirsch JA, Chueh J, Wakhloo AK, Gounis MJ. Preclinical acute ischemic stroke modeling. *J Neurointerv Surg*. 2012;4(4):307–13.
- Metcalf A, Desfaits A-C, Salazkin I, Yahia L'H, Sokolowski WM, Raymond J. Cold hibernated elastic memory foams for endovascular interventions. *Biomaterials*. 2003;24(3):491–7.
- Meyer T, Nikoubashman O, Kabelitz L, Müller M, Othman A, Afat S, et al. Endovascular stentectomy using the snare over stent-retriever (SOS) technique: An experimental feasibility study. *PLoS One*. 2017;12(5):e0178197.

## References

---

- Miller EL, Murray L, Richards L, Zorowitz RD, Bakas T, Clark P, Billinger SA. Comprehensive overview of nursing and interdisciplinary rehabilitation care of the stroke patient: a scientific statement from the American Heart Association. *Stroke*. 2010;41(10):2402–48.
- Molinari GF. Experimental cerebral infarction. I. Selective segmental occlusion of intracranial arteries in the dog. *Stroke*. 1970;1(4):224–31.
- Molinari GF, Moseley JI, Laurent JP. Segmental middle cerebral artery occlusion in primates: an experimental method requiring minimal surgery and anesthesia. *Stroke*. 1974;5(3):334–9.
- Momeni A, Valliant EM, Brennan-Pierce EP, Shankar JJS, Abraham R, Colp P, Filiaggi MJ. Developing an in situ forming polyphosphate coacervate as a new liquid embolic agent: From experimental design to pilot animal study. *Acta Biomater*. 2016;32:286–97.
- Monson KL, Goldsmith W, Barbaro NM, Manley GT. Axial mechanical properties of fresh human cerebral blood vessels. *J Biomech Eng*. 2003;125(2):288–94.
- Moomiaie RM, Gould G, Solomon D, Simmons J, Kim J, Botta D, Elefteriades JA. Novel intracranial brain cooling catheter to mitigate brain injuries. *J Neurointerv Surg*. 2012;4(2):130–3.
- Mori E, del Zoppo GJ, Chambers JD, Copeland BR, Arfors KE. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons. *Stroke*. 1992;23(5):712–8.
- Mottu F, Rüfenacht DA, Laurent A, Doelker E. Iodine-containing cellulose mixed esters as radiopaque polymers for direct embolization of cerebral aneurysms and arteriovenous malformations. *Biomaterials*. 2002;23(1):121–31.
- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133(4):447–54.
- Mühlenbruch G, Nikoubashman O, Steffen B, Dadak M, Palmowski M, Wiesmann M. Endovascular broad-neck aneurysm creation in a porcine model using a vascular plug. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2013;36(1):239–44.
- Mullan JC, Korosue K, Heros RC. The use of somatosensory evoked potential monitoring to produce a canine model of uniform, moderately severe stroke with permanent arterial occlusion. *NEUROSURGERY*. 1993;32(6):967-73; discussion 973.

## References

---

- Murayama Y, Viñuela F, Tateshima S, Akiba Y. Endovascular treatment of experimental aneurysms by use of a combination of liquid embolic agents and protective devices. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2000;21(9):1726–35.
- Nakayama Y, Satow T, Funayama M, Moriwaki T, Tajikawa T, Furukoshi M, et al. Construction of 3 animal experimental models in the development of honeycomb microporous covered stents for the treatment of large wide-necked cerebral aneurysms. *J Artif Organs.* 2016;19(2):179–87.
- Namba K, Mashio K, Kawamura Y, Higaki A, Nemoto S. Swine hybrid aneurysm model for endovascular surgery training. *Interv Neuroradiol.* 2013;19(2):153–8.
- Nawka MT, Fiehler J, Spallek J, Buhk J-H, Frölich AM. Current status of training environments in neuro-interventional practice: are animal models still contemporary? *J Neurointerv Surg* 2018.
- Ng YS, Stein J, Ning M, Black-Schaffer RM. Comparison of clinical characteristics and functional outcomes of ischemic stroke in different vascular territories. *Stroke.* 2007;38(8):2309–14.
- Nikoubashman O, Pjontek R, Brockmann M-A, Tolba R, Wiesmann M. Retrieval of migrated coils with stent retrievers: an animal study. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015;36(6):1162–6.
- Nishi S, Nakayama Y, Hashimoto N, Matsuda T. Basic fibroblast growth factor impregnated hydrogel microspheres for embolization of cerebral arteriovenous malformations. *ASAIO J.* 1998;44(5):M405-10.
- Nitzsche B, Frey S, Collins LD, Seeger J, Lobsien D, Dreyer A, et al. A stereotaxic, population-averaged T1w ovine brain atlas including cerebral morphology and tissue volumes. *Front Neuroanat.* 2015;9:69.
- Nitzsche B, Boltze J, Ludewig E, Flegel T, Schmidt MJ, Seeger J, et al. A stereotaxic breed-averaged, symmetric T2w canine brain atlas including detailed morphological and volumetrical data sets. *Neuroimage* 2018.
- Nogueira RG, Levy EI, Gounis M, Siddiqui AH. The Trevo device: preclinical data of a novel stroke thrombectomy device in two different animal models of arterial thrombo-occlusive disease. *J Neurointerv Surg.* 2012;4(4):295–300.
- Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, Bonafe A, Budzik RF, Bhuva P, et al. Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *N Engl J Med.* 2018;378(1):11–21.

## References

---

- Nonn A, Kirschner S, Figueiredo G, Kramer M, Nikoubashman O, Pjontek R, et al. Feasibility, Safety, and Efficacy of Flow-Diverting Stent-Assisted Microsphere Embolization of Fusiform and Sidewall Aneurysms. *NEUROSURGERY*. 2015;77(1):126-35; discussion 135-6.
- Oechtering J, Kirkpatrick PJ, Ludolph AGK, Hans FJ, Sellhaus B, Spiegelberg A, Krings T. Magnetic microparticles for endovascular aneurysm treatment: in vitro and in vivo experimental results. *NEUROSURGERY*. 2011;68(5):1388-97; discussion 1397-8.
- Ovesen C, Brizzi M, Pott FC, Thorsen-Meyer HC, Karlsson T, Ersson A, et al. Feasibility of endovascular and surface cooling strategies in acute stroke. *Acta Neurol Scand*. 2013;127(6):399–405.
- Park S, Hwang SM, Song JS, Suh DC, Lee DH. Evaluation of the Solitaire system in a canine arterial thromboembolic occlusion model: is it safe for the endothelium? *Interv Neuroradiol*. 2013;19(4):417–24.
- Park K-E, Park C-H, Powell A, Martin J, Donovan DM, Telugu BP. Targeted Gene Knockin in Porcine Somatic Cells Using CRISPR/Cas Ribonucleoproteins. *Int J Mol Sci* 2016.
- Pietilä TA, Zabramski JM, Thèllier-Janko A, Duveneck K, Bichard WD, Brock M, Spetzler RF. Animal model for cerebral arteriovenous malformation. *Acta Neurochir (Wien)*. 2000;142(11):1231–40.
- Polderman KH, Herold I. Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods. *Crit Care Med*. 2009;37(3):1101–20.
- Poli S, Purrucker J, Priglinger M, Diedler J, Sykora M, Popp E, et al. Induction of cooling with a passive head and neck cooling device: effects on brain temperature after stroke. *Stroke*. 2013;44(3):708–13.
- Poli S, Purrucker J, Priglinger M, Sykora M, Diedler J, Rupp A, et al. Safety evaluation of nasopharyngeal cooling (RhinoChill®) in stroke patients: an observational study. *Neurocrit Care*. 2014;20(1):98–105.
- Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, et al. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2018;49(3):e46-e110.

## References

---

- Qian Z, Climent S, Maynar M, Usón-Garallo J, Lima-Rodrigues MA, Calles C, et al. A simplified arteriovenous malformation model in sheep: feasibility study. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1999;20(5):765–70.
- Qureshi AI, Boulos AS, Hanel RA, Suri MFK, Yahia AM, Alberico RA, Hopkins LN. Randomized comparison of intra-arterial and intravenous thrombolysis in a canine model of acute basilar artery thrombosis. *Neuroradiology*. 2004;46(12):988–95.
- Qureshi AI, Suri MFK, Ali Z, Ringer AJ, Boulos AS, Nakada MT, et al. Intraarterial reteplase and intravenous abciximab for treatment of acute ischemic stroke. A preliminary feasibility and safety study in a non-human primate model. *Neuroradiology*. 2005;47(11):845–54.
- Qureshi AI, Mendelow AD, Hanley DF. Intracerebral haemorrhage. *Lancet*. 2009;373(9675):1632–44.
- Rai AT, Hogg JP, Cline B, Hobbs G. Cerebrovascular geometry in the anterior circulation: an analysis of diameter, length and the vessel taper. *J Neurointerv Surg*. 2013;5(4):371–5.
- Randall RD, Thayer SA. Glutamate-induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *J Neurosci*. 1992;12(5):1882–95.
- Raymond J, Salazkin I, Metcalfe A, Robledo O, Gevry G, Roy D, et al. Lingual artery bifurcation aneurysms for training and evaluation of neurovascular devices. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2004;25(8):1387–90.
- Rewell SSJ, Fernandez JA, Cox SF, Spratt NJ, Hogan L, Aleksoska E, et al. Inducing stroke in aged, hypertensive, diabetic rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30(4):729–33.
- Ridenour TR, Warner DS, Todd MM, McAllister AC. Mild hypothermia reduces infarct size resulting from temporary but not permanent focal ischemia in rats. *Stroke*. 1992;23(5):733–8.
- Riedel CH, Zimmermann P, Jensen-Kondering U, Stingele R, Deuschl G, Jansen O. The importance of size: successful recanalization by intravenous thrombolysis in acute anterior stroke depends on thrombus length. *Stroke*. 2011;42(6):1775–7.
- Ringelstein EB, Nabavi DG. *Der ischämische Schlaganfall: Eine praxisorientierte Darstellung von Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie*. 1st ed. Stuttgart: Kohlhammer; 2007.

## References

---

- Ringer AJ, Guterman LR, Hopkins LN. Site-specific thromboembolism: a novel animal model for stroke. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2004;25(2):329–32.
- Ringleb PA, Veltkamp R. Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls- Ergänzungen 2015- Rekanalisierende Therapie- Leitlinien für Diagnostik & Therapie in der Neurologie. 2015. <https://www.dgn.org/leitlinien/3198-030-140-rekanalisierende-therapie-ergaenzung-akuttherapie-schlaganfall>.
- Rink C, Christoforidis G, Abduljalil A, Kontzialis M, Bergdall V, Roy S, et al. Minimally invasive neuroradiologic model of preclinical transient middle cerebral artery occlusion in canines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(37):14100–5.
- Roth G, Dicke U. Evolution of the brain and intelligence. *Trends Cogn Sci (Regul Ed)*. 2005;9(5):250–7.
- Roth C, Junk D, Papanagiotou P, Keuler A, Körner H, Schumacher M, Reith W. A comparison of 2 stroke devices: the new Aperiio clot-removal device and the solitaire AB/FR. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2012;33(7):1317–20.
- Sadato A, Taki W, Ikada Y, Nakahara I, Yamashita K, Matsumoto K, et al. Experimental study and clinical use of poly(vinyl acetate) emulsion as liquid embolisation material. *Neuroradiology*. 1994;36(8):634–41.
- Sadato A, Wakhloo AK, Hopkins LN. Effects of a mixture of a low concentration of n-butylcyanoacrylate and ethiodol on tissue reactions and the permanence of arterial occlusion after embolization. *NEUROSURGERY*. 2000;47(5):1197-203; discussion 1204-5.
- Saver JL, Jahan R, Levy EI, Jovin TG, Baxter B, Nogueira RG, et al. Solitaire flow restoration device versus the Merci Retriever in patients with acute ischaemic stroke (SWIFT): A randomised, parallel-group, non-inferiority trial. *The Lancet*. 2012;380(9849):1241–9.
- Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener H-C, Levy EI, Pereira VM, et al. Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med*. 2015;372(24):2285–95.
- Savitz SI, Baron J-C, Yenari MA, Sanossian N, Fisher M. Reconsidering Neuroprotection in the Reperfusion Era. *Stroke*. 2017;48(12):3413–9.
- Schuldenzucker V, Schubert R, Muratori LM, Freisfeld F, Rieke L, Matheis T, et al. Behavioral testing of minipigs transgenic for the Huntington gene-A three-year observational study. *PLoS One*. 2017;12(10):e0185970.

## References

---

- Schwartz AE, Stone JG, Finck AD, Sandhu AA, Mongero LB, Adams DC, et al. Isolated cerebral hypothermia by single carotid artery perfusion of extracorporeally cooled blood in baboons. *NEUROSURGERY*. 1996;39(3):577-81; discussion 581-2.
- Schwartz AE, Pile-Spellman J. New model of reperfused stroke by occlusion of the anterior cerebral artery in baboons. *Acta Neurochir (Wien)*. 2011;153(2):327-31.
- Scott BB, McGillicuddy JE, Seeger JF, Kindt GW, Giannotta SL. Vascular dynamics of an experimental cerebral arteriovenous shunt in the primate. *Surg Neurol*. 1978;10(1):34-8.
- Seita Y, Tsukiyama T, Iwatani C, Tsuchiya H, Matsushita J, Azami T, et al. Generation of transgenic cynomolgus monkeys that express green fluorescent protein throughout the whole body. *Sci Rep*. 2016;6:24868.
- Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med*. 2005;353(15):1574-84.
- Shea BJ, Grimshaw JM, Wells GA, Boers M, Andersson N, Hamel C, et al. Development of AMSTAR: a measurement tool to assess the methodological quality of systematic reviews. *BMC Med Res Methodol*. 2007;7:10.
- Shi W-Y, Li M-H, Yan L, Zhu Y-Q. Creation of Carotid Fusiform Aneurysm in a Canine Model. *Neurosurgery Quarterly*. 2012;22(4):255-60.
- Shi M, Cao L, Cao X, Zhu M, Zhang X, Wu Z, et al. DR-region of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase is a target to treat excitotoxicity and stroke. *Cell Death Dis*. 2018;10(1):6.
- Shin HK, Dunn AK, Jones PB, Boas DA, Moskowitz MA, Ayata C. Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26(8):1018-30.
- Sinharay S, Lee D, Shah S, Muthusamy S, Papadakis GZ, Zhang X, et al. Cross-sectional and longitudinal small animal PET shows pre and post-synaptic striatal dopaminergic deficits in an animal model of HIV. *Nucl Med Biol*. 2017;55:27-33.
- Slotboom J, Kiefer C, Brekenfeld C, Ozdoba C, Remonda L, Nedeltchev K, et al. Locally induced hypothermia for treatment of acute ischaemic stroke: a physical feasibility study. *Neuroradiology*. 2004;46(11):923-34.
- Sommer CJ. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017;133(2):245-61.

## References

---

- Sorby-Adams AJ, Vink R, Turner RJ. Large animal models of stroke and traumatic brain injury as translational tools. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2018;315(2):R165-R190.
- Spetzler RF, Wilson CB, Weinstein P, Mehdorn M, Townsend J, Telles D. Normal perfusion pressure breakthrough theory. *Clin Neurosurg*. 1978;25:651–72.
- Spetzler RF, Selman WR, Weinstein P, Townsend J, Mehdorn M, Telles D, et al. Chronic reversible cerebral ischemia: evaluation of a new baboon model. *NEUROSURGERY*. 1980;7(3):257–61.
- STAIR. Recommendations for Standards Regarding Preclinical Neuroprotective and Restorative Drug Development. *Stroke*. 1999;30(12):2752–8.
- Stehbens WE. Pathology of the cerebral blood vessels. Saint Louis: Mosby; 1972.
- Stehbens WE. Histological changes in chronic experimental aneurysms surgically fashioned in sheep. *Pathology*. 1997;29(4):374–9.
- Steiger HJ, van Loon JJ. Virtues and drawbacks of titanium alloy aneurysm clips. *Acta Neurochir Suppl*. 1999;72:81–8.
- Stokum JA, Gerzanich V, Simard JM. Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36(3):513–38.
- Straka M, Albers GW, Bammer R. Real-time diffusion-perfusion mismatch analysis in acute stroke. *J Magn Reson Imaging*. 2010;32(5):1024–37.
- Susumu T, Yoshikawa T, Akiyoshi Y, Nagata R, Fujiwara M, Kito G. Effects of intra-arterial urokinase on a non-human primate thromboembolic stroke model. *J Pharmacol Sci*. 2006;100(4):278–84.
- Takao H, Murayama Y, Ebara M, Ishibashi T, Saguchi T, Irie K, et al. New thermoreversible liquid embolic agent for embolotherapy: technical report. *Neuroradiology*. 2009;51(2):95–8.
- Tan H-Q, Li M-H, Zhu Y-Q, Fang C, Wu C-G, Cheng Y-S, et al. Surgical construction of a novel simulated carotid siphon in dogs. *J Neurosurg*. 2008;109(6):1173–8.
- Tanaka Y, Imai H, Konno K, Miyagishima T, Kubota C, Puentes S, et al. Experimental model of lacunar infarction in the gyrencephalic brain of the miniature pig: neurological assessment and histological, immunohistochemical, and physiological evaluation of dynamic corticospinal tract deformation. *Stroke*. 2008;39(1):205–12.
- Tenjin H, Ueda S, Fushiki S, Ohmori Y, Nakahara Y, Masaki H, Matsuo T. Experimental production of carotid artery aneurysms in Japanese monkey. *J. Kyoto Pref. Univ. Med*. 1994(103):715–20.

## References

---

- Terpolilli NA, Kim S-W, Thal SC, Kataoka H, Zeisig V, Nitzsche B, et al. Inhalation of nitric oxide prevents ischemic brain damage in experimental stroke by selective dilatation of collateral arterioles. *Circ Res.* 2012;110(5):727–38.
- Thomsen BB, Gredal H, Wirenfeldt M, Kristensen BW, Clausen BH, Larsen AE, et al. Spontaneous ischaemic stroke lesions in a dog brain: neuropathological characterisation and comparison to human ischaemic stroke. *Acta Vet Scand.* 2017;59(1):7.
- Toews LC. Compliance of systematic reviews in veterinary journals with Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) literature search reporting guidelines. *J Med Libr Assoc.* 2017;105(3):233–9.
- Tokiwa K, Miyasaka Y, Irikura K, Tanaka R, Yamada M. The effects of a carotid-jugular fistula on cerebral blood flow in the cat: an experimental study in the chronic period. *Neurol Res.* 1995;17(4):297–300.
- Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR Journal.* 2003;44(2):85–95.
- Vagal A, Menon BK, Foster LD, Livorine A, Yeatts SD, Qazi E, et al. Association Between CT Angiogram Collaterals and CT Perfusion in the Interventional Management of Stroke III Trial. *Stroke.* 2016;47(2):535–8.
- van der Bom IMJ, Mehra M, Walvick RP, Chueh J-Y, Gounis MJ. Quantitative evaluation of C-arm CT cerebral blood volume in a canine model of ischemic stroke. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2012;33(2):353–8.
- van der Worp HB, Macleod MR, Kollmar R. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: ready to start large randomized trials? *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30(6):1079–93.
- van Seeters T, Biessels GJ, van der Schaaf IC, Dankbaar JW, Horsch AD, Luitse MJA, et al. Prediction of outcome in patients with suspected acute ischaemic stroke with CT perfusion and CT angiography: the Dutch acute stroke trial (DUST) study protocol. *BMC Neurol.* 2014;14:37.
- Vink R. Large animal models of traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 2017.
- Wainwright JM, Jahan R, Solitaire FR revascularization device 4×40: safety study and effectiveness in preclinical models. *J Neurointerv Surg.* 2016;8(7):710–3.
- Walters MR, Kaste M, Lees KR, Diener HC, Hommel M, Keyser J de, et al. The AMPA antagonist ZK 200775 in patients with acute ischaemic stroke: a double-blind,

## References

---

- multicentre, placebo-controlled safety and tolerability study. *Cerebrovasc Dis.* 2005;20(5):304–9.
- Wei N, Xiao L, Xue R, Zhang D, Zhou J, Ren H, et al. MicroRNA-9 Mediates the Cell Apoptosis by Targeting Bcl2l1 in Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol.* 2016;53(10):6809–17.
- Wellman BJ, Loftus CM, Noh D, Barnhart WH, Howard MA. A combined surgical-endovascular device concept for giant aneurysm neck occlusion. *NEUROSURGERY.* 1998;42(6):1364-8; discussion 1368-9.
- Wells AJ, Vink R, Blumbergs PC, Brophy BP, Helps SC, Knox SJ, Turner RJ. A surgical model of permanent and transient middle cerebral artery stroke in the sheep. *PLoS One.* 2012;7(7):e42157.
- Wells AJ, Vink R, Helps SC, Knox SJ, Blumbergs PC, Turner RJ. Elevated Intracranial Pressure and Cerebral Edema following Permanent MCA Occlusion in an Ovine Model. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130512.
- Werner P, Saur D, Zeisig V, Ettrich B, Patt M, Sattler B, et al. Simultaneous PET/MRI in stroke: a case series. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015;35(9):1421–5.
- Wey H-Y, Kroma GM, Li J, Leland MM, Jones L, Duong TQ. MRI of perfusion-diffusion mismatch in non-human primate (baboon) stroke: a preliminary report. *Open Neuroimag J.* 2011;5:147–52.
- Wheeler HM, Mlynash M, Inoue M, Tipiririni A, Liggins J, Bammer R, et al. The growth rate of early DWI lesions is highly variable and associated with penumbral salvage and clinical outcomes following endovascular reperfusion. *Int J Stroke.* 2015;10(5):723–9.
- Wright EA, d'Este CD, Morrison LB, Cockburn N, Kovacs M, Lee T-Y. Absolute Cerebral Blood Flow Infarction Threshold for 3-Hour Ischemia Time Determined with CT Perfusion and 18F-FFMZ-PET Imaging in a Porcine Model of Cerebral Ischemia. *PLoS One.* 2016;11(6):e0158157.
- Wu T-C, Grotta JC. Hypothermia for acute ischaemic stroke. *Lancet Neurol.* 2013;12(3):275–84.
- Xie J, Li M-H, Tan H-Q, Zhu Y-Q, Li Y-D, Fan C-H, et al. Establishment of an experimental intracranial internal carotid artery model and the application in covered-stent navigability testing. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009;30(5):1041–5.
- Xu X-Q, Cheng Q-G, Zu Q-Q, Lu S-S, Yu J, Sheng Y, et al. Comparative study of the relative signal intensity on DWI, FLAIR, and T2 images in identifying the onset time of stroke in an embolic canine model. *Neurol Sci.* 2014;35(7):1059–65.

## References

---

- Xu M, Xu H, Qin Z. Animal Models in Studying Cerebral Arteriovenous Malformation. *Biomed Res Int.* 2015;2015:178407.
- Yamada M, Miyasaka Y, Irikura K, Nagai S, Tanaka R. A canine model of intracranial arteriovenous shunt with acute cerebral venous hypertension. *Neurol Res.* 1998;20(1):73–8.
- Yamori Y, Horie R, Handa H, Sato M, Fukase M. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke.* 1976;7(1):46–53.
- Yang J-P, Liu H-J, Liu R-C. A modified rabbit model of stroke: evaluation using clinical MRI scanner. *Neurol Res.* 2009;31(10):1092–6.
- Yenari M, Kitagawa K, Lyden P, Perez-Pinzon M. Metabolic downregulation: a key to successful neuroprotection? *Stroke.* 2008;39(10):2910–7.
- Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(4):267–78.
- Yuki I, Kan I, Vinters HV, Kim RH, Golshan A, Vinuela FA, et al. The impact of thromboemboli histology on the performance of a mechanical thrombectomy device. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2012;33(4):643–8.
- Yuki I, Kan I, Golshan A, Sohn J, Murayama Y, Vinters HV, Viñuela F. A swine model to analyze arterial structural changes induced by mechanical thrombectomy. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2013;34(8):E87-90.
- Zaninovich OA, Ramey WL, Walter CM, Dumont TM. Completion of the Circle of Willis Varies by Gender, Age, and Indication for Computed Tomography Angiography. *World Neurosurg.* 2017;106:953–63.
- Zhang K, Sejnowski TJ. A universal scaling law between gray matter and white matter of cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(10):5621–6.
- Zhu L, Shao Q, Li T, Saver JL, Li L, Li D, et al. Evaluation of the JRecan device for thrombus retrieval: efficacy and safety in a swine model of acute arterial occlusion. *J Neurointerv Surg.* 2016;8(5):526–30.
- Zweifler RM, Voorhees ME, Mahmood MA, Alday DD. Induction and maintenance of mild hypothermia by surface cooling in non-intubated subjects. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2003;12(5):237–43.

## 8 Anhang

### 8.1 Search Strategy in Medline (Wolters Kluwer, Ovid)

MEDLINE 1990 to November Week 3 2017,

MEDLINE Daily Update November 22, 2017

Search date (yyyy-mm-dd): 2017-11-24

#	Searches	Results	Annotations
1	haplorhini/	49334	#1 - #26: Large animal (MeSH and textual words), engl., german
2	catarrhini/	86	
3	exp cercopithecidae/	124063	
4	hominidae/	8135	
5	gorilla gorilla/	1997	
6	pan paniscus/	530	
7	pan troglodytes/	9675	
8	exp pongo/	1341	
9	exp hylobatidae/	1001	
10	exp platyrrhini/	14302	
11	exp tarsii/	73	
12	exp swine/	215422	
13	exp sheep/	119206	
14	cats/	141501	
15	dogs/	333727	
16	rabbits/	355078	
17	exp goats/	30832	
18	horses/	67796	
19	cattle/	348808	
20	ferrets/	5813	
21	guinea pigs/	148328	
22	(large animal* or large mammal* or baboon* or beagle* or bovine* or cat or cats or canine* or	1427622	

## Anhang

	cattle* or cavy or cavia or cow or cows or cynomolgus or dog or dogs or equine* or feline* or goat* or gyrencephalic or hare or horse* or macaca* or macaque* or marmoset* or monkey* or papio* or primate* or NHP or ovine* or pig or pigs or porcine* or rabbit* or sheep* or swine*).ti,ab,kf.		
23	(Alouattinae or Alouatta? or Aotidae or Aotinae or Aotus or Atelidae or Atelinae or Barbary Ape? or Black Ape? or Bonobo? or Cacajao? or calliceb* or Callimico* or Callithrix or Callitrichinae or Catarrhina? or Cebidae or Cebinae or Cebus or Cebuella? or Celebes* ape? or Cercocebus or Cercopithec* or Chimpanzee? or Chiropote? or Colobinae or Colobus or Douroucouli or Erythrocebus or Gelada? or Gibbon? or Hamadrya? or Hapale? or Hylobat? or Langur? or Leontideus or Leontopithecus or Lophocebus or Mangabey? or Mandrillus or Miopithecus Talapoin? or Pan Paniscus or Pan Troglodytes or Pongidae or Pongo? or Presbyti? or Pygathri* or Platyrrhin* or Tamarin? or Saguinus or Saimir* or Siamang? or Pitheciidae or Pitheciin* or Pithecin* or Pithecia? or Tarsier? or Tarsii* or Tarsius or Theropithec*).ti,ab,kf.	25338	
24	or/1-23	1998420	
25	(eng or ger).la.	22548777	
26	24 and 25	1805520	
27	Mechanical Thrombolysis/	703	

## Anhang

28	(mechanical thrombectom* or mechanical recanal* or endovascular thrombectom* or endo-vascular thrombectom*).ti,ab,kf.	1616	#27 - #64: intervention (MeSH and textual words)
29	(clot? adj5 (retriev* or disrupt* or remov* or mechanical)).ti,ab,kf.	1409	
30	merci.ti,ab,kf.	203	
31	((intracranial and stent*) or (intra-cranial and stent*) or (stent* and retriev*) or stentretriev* or (caroti* and stent*) or (cerebral and stent*) or (brain and stent*) or flow divert* or flowdivert*).ti,ab,kf.	12033	
32	(TREVO or SOLITAIRE or APERIO or PIPELINE or FRED or DERIVO or ((SILK or WINGSPAN or WALLSTENT or LEO or ENTERPRISE or NEUROFORM) and stent*) or SURPASS or PENUMBRA).ti,ab,kf.	18479	
33	(SILK or WINGSPAN or WALLSTENT or LEO or ENTERPRISE or NEUROFORM).ti,ab,kf. and stent/	1292	
34	WEB.ti,ab,kf. and device?.mp.	1710	
35	WEB.ti,ab,kf. and aneurysm?.mp.	205	
36	WEB.ti,ab,kf. and exp aneurysm/	168	
37	((endovascular adj3 device?) or (endo-vascular adj3 device?)).ti,ab,kf.	813	
38	((cerebral and recanali#ation) or (cerebral and revasculari#ation) or (brain and recanali#ation) or (brain and revasculari#ation) or (stroke? and recanali#ation) or (stroke? and revasculari#ation)).ti,ab,kf.	9814	

## Anhang

39	((cerebral and re-canalization) or (cerebral and re-vascularization) or (brain and re-canalization) or (brain and re-vascularization) or (stroke? and re-canalization) or (stroke? and re-vascularization)).ti,ab,kf.	43	
40	Cerebral Revascularization/	3572	
41	(thrombolysis or thrombo-aspiration).ti,ab,kf.	176	
42	(aspiration device* or aspiration catheter*).ti,ab,kf.	377	
43	((intracranial coil*) or (intra-cranial coil*).ti,ab,kf.	959	
44	((endovascular coil*) or (endo-vascular coil*) or (hydrocoil* or hydro-coil* or microcoil* or micro-coil*) or ((gdc or gdc) and (endovascular or endo-vascular or embolism* or coil*)) or (MATRIX coil*) or Guglielmi detachable coil*).ti,ab,kf.	3596	
45	((aneurysm* coil*) or (coil* embolism) or (coil* embolism)).ti,ab,kf.	7109	
46	(glue and (embolism or embolism)).ti,ab,kf.	603	
47	((arteriovenous malformation? or arterio-venous malformation?) and (embolism or embolism or endovascular or endo-vascular)).ti,ab,kf.	3362	
48	(AVM and (embolism or embolism or endovascular or endo-vascular or brain or cerebral)).ti,ab,kf.	2997	
49	(AVF and (embolism or embolism or endovascular or endo-vascular or brain or cerebral)).ti,ab,kf.	642	

## Anhang

50	(arterioveno* fistul* and (emboli#ation or emboli#ed or endovascular or endo-vascular or brain or cerebral)).ti,ab,kf.	3813	
51	(arterio-veno* fistul* and (emboli#ation or emboli#ed or endovascular or endo-vascular or brain or cerebral)).ti,ab,kf.	155	
52	(liquid embolic? or embolic agent? or thromb?embolic agent?).ti,ab,kf.	1046	
53	Onyx*.mp. [mp=title, abstract, original title, name of substance word, subject heading word, keyword heading word, protocol supplementary concept word, rare disease supplementary concept word, unique identifier]	1195	
54	(evoh or eval).mp.	361	
55	hist?acryl*.mp.	488	
56	((poly?vinyl alcohol* or poly vinyl alcohol* or PVA) and (emboli#ation or emboli#ed)).mp.	996	
57	IBCA.mp.	59	
58	nbca.mp.	396	
59	PHIL.mp.	389	
60	(SQUID and emboli*).mp.	2	
61	(intraarterial thromboly* or intra-arterial thromboly* or (intraarterial and stroke?) or (intra-arterial and stroke?)).ti,ab,kf.	2398	
62	reteplase.mp.	440	
63	((cooling or cold infusion? or hypotherm* or hypotherm*) and (endovascular* or endo-vascular or cerebral or brain)).ti,ab,kf.	10417	
64	or/27-63	74237	

## Anhang

65	26 and 64	4187	Large animal AND intervention
66	(comment or editorial or review).pt.	3322728	Exclusion of Publication Types Comment, Review
67	65 not 66	3989	
68	((systematic adj3 review) or (systematic adj3 overview) or meta-analy* or metaanaly*).ti.	111102	
69	meta-analysis.pt.	94641	Systematic Review or Meta-analysis
70	68 or 69	141879	
71	65 and 70	4	
72	67 or 71	3992	Large animal AND intervention AND (Systematic Review OR Meta-analysis)
73	remove duplicates from 72	3640	End result
74	limit 73 to yr="1990 -Current"	2960	End result, Publication year >= 1990

key:

/ = MeSH term

Exp = explode Mesh term

\* = truncation, Any number of characters

? = 0 or 1 character

# = 1 character

.ti,ab,kf. = title, abstract, keyword heading word

.ti. = title

.la. = Language

.mp. = title, abstract, original title, name of substance word, subject heading word, keyword heading word, protocol supplementary concept word, rare disease supplementary concept word, unique identifier

.pt. = publication type

.yr. = publication year

adjn = Search terms within n words in any order

## Anhang

MEDLINE In-Process & Other Non-Indexed Citations November 22, 2017,

MEDLINE Epub Ahead of Print November 22, 2017

Search Date (yyyy-mm-dd): 2017-11-24

#	Searches	Results	Annotations
1	(large animal* or large mammal* or baboon* or beagle* or bovine* or cat or cats or canine* or cattle* or cavy or cavia or cow or cows or cynomolgus or dog or dogs or equine* or feline* or goat* or gyrencephalic or hare or horse* or macaca* or macaque* or marmoset* or monkey* or papio* or primate* or NHP or ovine* or pig or pigs or porcine* or rabbit* or sheep* or swine*).ti,ab,kf.	78495	#1 - #5: Large animal (textual words), engl., german
2	(Alouattinae or Alouatta? or Aotidae or Aotinae or Aotus or Atelidae or Atelinae or Barbary Ape? or Black Ape? or Bonobo? or Cacajao? or calliceb* or Callimico* or Callithrix or Callitrichinae or Catarrhina? or Cebidae or Cebinae or Cebus or Cebuella? or Celebes* ape? or Cercocebus or Cercopithec* or Chimpanzee? or Chiropote? or Colobinae or Colobus or Douroucouli or Erythrocebus or Gelada? or Gibbon? or Hamadrya? or Hapale? or Hylobat? or Langur? or Leontideus or Leontopithecus or Lophocebus or Mangabey? or Mandrillus or Miopithecus Talapoin? or Pan Paniscus or Pan Troglodytes or Pongidae or Pongo? or Presbyti? or Pygathri* or Platyrrhin* or Tamarin? or Saguinus or Saimir* or Siamang? or Pitheciidae or Pitheciin* or Pithecin* or Pithecia? or Tarsier? or Tarsii* or Tarsius or Theropithec*).ti,ab,kf.	1657	

## Anhang

3	1 or 2	79174	
4	(eng or ger).la.	3354904	
5	3 and 4	78493	
6	(mechanical thrombectom* or mechanical recanal* or endovascular thrombectom* or endo-vascular thrombectom*).ti,ab,kf.	544	#6 - #41: intervention (textual words)
7	(clot? adj5 (retriev* or disrupt* or remov* or mechanical)).ti,ab,kf.	210	
8	merci.ti,ab,kf.	31	
9	((intracranial and stent*) or (intra-cranial and stent*) or (stent* and retriev*) or stentretriev* or (caroti* and stent*) or (cerebral and stent*) or (brain and stent*) or flow divert* or flowdivert*).ti,ab,kf.	2204	
10	(TREVO or SOLITAIRE or APERIO or PIPELINE or FRED or DERIVO or ((SILK or WINGSPAN or WALLSTENT or LEO or ENTERPRISE or NEUROFORM) and stent*) or SURPASS or PENUMBRA).ti,ab,kf.	4507	
11	(SILK or WINGSPAN or WALLSTENT or LEO or ENTERPRISE or NEUROFORM).ti,ab,kf. and stent/	0	
12	WEB.ti,ab,kf. and device?.mp.	522	
13	WEB.ti,ab,kf. and aneurysm?.mp.	50	
14	WEB.ti,ab,kf. and exp aneurysm/	0	
15	((endovascular adj3 device?) or (endo-vascular adj3 device?)).ti,ab,kf.	152	
16	((cerebral and recanali#ation) or (cerebral and revasculari#ation) or (brain and recanali#ation) or (brain and revasculari#ation) or (stroke? and	1545	

## Anhang

	recanali#ation) or (stroke? and revasculari#ation)).ti,ab,kf.		
17	((cerebral and re-canali#ation) or (cerebral and re-vasculari#ation) or (brain and re-canali#ation) or (brain and re-vasculari#ation) or (stroke? and re-canali#ation) or (stroke? and re-vasculari#ation)).ti,ab,kf.	7	
18	(thromb?aspiration or thrombo-aspiration).ti,ab,kf.	36	
19	(aspiration device* or aspiration catheter*).ti,ab,kf.	65	
20	((intracranial adj6 coil*) or (intra-cranial adj6 coil*)).ti,ab,kf.	209	
21	((endovascular adj6 coil*) or (endo-vascular adj6 coil*) or (hydrocoil* or hydro-coil* or microcoil* or micro-coil*) or ((gdc or gdc) and (endovascular or endo-vascular or emboli* or coil*)) or (MATRIX adj2 coil*) or Guglielmi detachable coil*).ti,ab,kf.	804	
22	((aneurysm* adj6 coil*) or (coil* adj6 emboli#ation) or (coil* adj6 emboli#ed)).ti,ab,kf.	1446	
23	(glue and (emboli#ation or emboli#ed)).ti,ab,kf.	131	
24	((arterioveno* malformation? or arterio-veno* malformation?) and (emboli#ation or emboli#ed or endovascular or endo-vascular)).ti,ab,kf.	590	
25	(AVM and (emboli#ation or emboli#ed or endovascular or endo-vascular or brain or cerebral)).ti,ab,kf.	492	
26	(AVF and (emboli#ation or emboli#ed or endovascular or endo-vascular or brain or cerebral)).ti,ab,kf.	113	

## Anhang

27	(arterioveno* fistul* and (emboli#ation or emboli#ed or endovascular or endo-vascular or brain or cerebral)).ti,ab,kf.	584	
28	(arterio-veno* fistul* and (emboli#ation or emboli#ed or endovascular or endo-vascular or brain or cerebral)).ti,ab,kf.	26	
29	(liquid embolic? or embolic agent? or thromb?embolic agent?).ti,ab,kf.	183	
30	Onyx*.mp. [mp=title, abstract, original title, name of substance word, subject heading word, keyword heading word, protocol supplementary concept word, rare disease supplementary concept word, unique identifier]	228	
31	(evoh or eval).mp.	61	
32	hist?acryl*.mp.	46	
33	((poly?vinyl alcohol* or poly vinyl alcohol* or PVA) and (emboli#ation or emboli#ed)).mp.	90	
34	IBCA.mp.	18	
35	nbca.mp.	98	
36	PHIL.mp.	81	
37	(SQUID and emboli*).mp.	5	
38	(intraarterial thromboly* or intra-arterial thromboly* or (intraarterial and stroke?) or (intra-arterial and stroke?)).ti,ab,kf.	298	
39	reteplase.mp.	39	
40	((cooling or cold infusion? or hypotherm* or hypotherm*) and (endovascular* or endo-vascular or cerebral or brain)).ti,ab,kf.	858	
41	or/6-40	12589	

## Anhang

42	5 and 41	322	Large animal AND intervention
43	(comment or editorial or review).pt.	198433	Exclusion of
44	42 not 43	308	Publication Types Comment, Review
45	((systematic adj3 review) or (systematic adj3 overview) or meta-analy* or metaanaly*).ti.	28928	Systematic Review or
46	meta-analysis.pt.	202	Meta-analysis
47	45 or 46	28945	
48	42 and 47	0	
49	44 or 48	308	End result non-indexed citations
50	limit 49 to yr="1990 -Current	303	End result non-indexed citations, Publication year >= 1990

## 8.2 Search Strategy Web of Science Core Collection

Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED):

2017 (Host: Clarivate Analytics):

1990 to present (2017-11-22 data last updated).

Search date: 2017-11-24

#	Searches and annotations	Results
38	#37 OR #36 Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	4,058
37	(#35 and ti=(systematic or metaanaly* or metanaly* or "meta-analy*")) AND <b>DOCUMENT TYPES:</b> (Review) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	3
36	#34 OR #33	4,055

## Anhang

	<p><b>Refined by:</b> [excluding] <b>DOCUMENT TYPES:</b> ( EDITORIAL MATERIAL OR ITEM ABOUT AN INDIVIDUAL OR DISCUSSION OR REVIEW OR NOTE OR REPRINT OR NEWS ITEM )</p> <p>Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017</p>	
35	<p>#34 OR #33</p> <p>Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017</p>	4,334
34	<p>(#31) <b>AND LANGUAGE:</b> (English OR German)</p> <p><b>Refined by: RESEARCH AREAS:</b> ( NEUROSCIENCES NEUROLOGY OR CARDIOVASCULAR SYSTEM CARDIOLOGY OR RADIOLOGY NUCLEAR MEDICINE MEDICAL IMAGING OR ENGINEERING OR VETERINARY SCIENCES OR MATERIALS SCIENCE OR SCIENCE TECHNOLOGY OTHER TOPICS OR RESEARCH EXPERIMENTAL MEDICINE OR BIOTECHNOLOGY APPLIED MICROBIOLOGY OR EMERGENCY MEDICINE OR LIFE SCIENCES BIOMEDICINE OTHER TOPICS )</p> <p>Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017</p>	4,083
33	<p>(#31) <b>AND LANGUAGE:</b> (English OR German)</p> <p><b>Refined by: WEB OF SCIENCE CATEGORIES:</b> ( CLINICAL NEUROLOGY OR RADIOLOGY NUCLEAR MEDICINE MEDICAL IMAGING OR CARDIAC CARDIOVASCULAR SYSTEMS OR NEUROSCIENCES OR NEUROIMAGING OR VETERINARY SCIENCES OR CRITICAL CARE MEDICINE OR ENGINEERING BIOMEDICAL OR BIOCHEMISTRY MOLECULAR BIOLOGY OR MEDICINE RESEARCH EXPERIMENTAL OR BIOTECHNOLOGY APPLIED MICROBIOLOGY OR EMERGENCY MEDICINE OR MATERIALS SCIENCE BIOMATERIALS OR ENGINEERING MECHANICAL )</p> <p>Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017</p>	3,719
32	<p>(#31) <b>AND LANGUAGE:</b> (English OR German)</p> <p>Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017</p>	5,878
31	<p>#30 AND #3</p>	5,960

## Anhang

	Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	
30	#29 OR #28 OR #27 OR #26 OR #25 OR #24 OR #23 OR #22 OR #21 OR #20 OR #19 OR #18 OR #17 OR #16 OR #15 OR #14 OR #13 OR #12 OR #11 OR #10 OR #9 OR #8 OR #7 OR #6 OR #5 OR #4 Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	132,304
29	ts=((cooling or “cold infusion*” or hypotherm* or “hypo-therm*”) and (endovascular* or “endo-vascular” or cerebral or brain)) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	12,995
28	ts=(“intraarterial thromboly*” or “intra-arterial thromboly*” or (intraarterial and stroke\$) or (“intra-arterial” and stroke\$)) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	3,510
27	ts=(SQUID and emboli*) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	8
26	ts=((“poly*viny alcohol*” or “poly vinyl alcohol*” or PVA) and (emboli?ation or emboli?ed)) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	833
25	ts=(Onyx* or evoh or eval or hist\$acryl* or IBCA or nbca or PHIL or reteplase) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	6,627
24	ts=(“liquid embolic*” or “embolic agent*” or “thromb*embolic agent*”) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	995
23	ts=(“arterio-veno* fistul*” and (emboli?ation or emboli?ed or endovascular or “endo-vascular” or brain or cerebral)) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	115
22	ts=(“arterioveno* fistul*” and (emboli?ation or emboli?ed or endovascular or “endo-vascular” or brain or cerebral)) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	4,053
21	ts=(AVF and (emboli?ation or emboli?ed or endovascular or “endo-vascular” or brain or cerebral)) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	601

## Anhang

20	ts=(AVM and (emboli?ation or emboli?ed or endovascular or “endo-vascular” or brain or cerebral)) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	2,678
19	ts=((“arterioveno* malformation*” or “arterio-veno* malformation*”) and (emboli?ation or emboli?ed or endovascular or “endo-vascular”)) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	4,006
18	ts=(glue and (emboli?ation or emboli?ed)) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	690
17	ts=((aneurysm* near/6 coil*) or (coil* near/6 emboli?ation) or (coil* near/6 emboli?ed)) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	7,772
16	ts=((endovascular near/6 coil*) or (“endo-vascular” near/6 coil*) or (hydrocoil* or “hydro-coil*” or microcoil* or “micro-coil*”) or ((gdc or gdc) and (endovascular or “endo-vascular” or emboli* or coil*)) or (MATRIX near/2 coil*) or “Guglielmi detachable coil*”) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	5,567
15	ts=((intracranial near/6 coil*) or (“intra-cranial” near/6 coil*)) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	1,135
14	ts=(“aspiration device*” or “aspiration catheter*”) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	324
13	ts=(thromb\$aspiration or “thrombo-aspiration”) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	171
12	ts=((cerebral and “re-canali?ation”) or (cerebral and “re-vasculari?ation”) or (brain and “re-canali?ation”) or (brain and “re-vasculari?ation”) or (stroke\$ and “re-canali?ation”) or (stroke\$ and “re-vasculari?ation”)) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	54
11	ts=((cerebral and recanali?ation) or (cerebral and revasculari?ation) or (brain and recanali?ation) or (brain and revasculari?ation) or (stroke\$ and recanali?ation) or (stroke\$ and revasculari?ation)) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	11,529

## Anhang

10	ts=((endovascular near/3 device\$) or ("endo-vascular" near/3 device\$)) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	886
9	ts=((WEB and device\$) or (WEB and aneurysm\$)) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	4,328
8	ts=(TREVO or SOLITAIRE or APERIO or PIPELINE or FRED or DERIVO or ((SILK or WINGSPAN or WALLSTENT or LEO or ENTERPRISE or NEUROFORM) and stent*) or SURPASS or PENUMBRA) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	65,829
7	ts=((intracranial and stent*) or ("intra-cranial" and stent*) or (stent* and retriev*) or stentretriev* or (caroti* and stent*) or (cerebral and stent*) or (brain and stent*) or "flow divert*" or flowdivert*) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	14,925
6	ts=merci Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	610
5	ts=((clot\$ near/5 retriev*) or (clot\$ near/5 disrupt*) or (clot\$ near/5 remov*) or (clot\$ near/5 mechanical)) Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	1,302
4	ts=("mechanical thrombectom*" or "mechanical recanal*" or "endovascular thrombectom*" or "endo-vascular thrombectom*") Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	2,234
3	#2 OR #1 Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017	1,391,214
2	ts=(Alouattinae or Alouatta\$ or Aotidae or Aotinae or Aotus or Atelidae or Atelinae or "Barbary Ape*" or "Black Ape*" or Bonobo\$ or Cacajao\$ or calliceb* or Callimico* or Callithrix or Callitrichinae or Catarrhina\$ or Cebidae or Cebinae or Cebus or Cebuella\$ or "Celebes* ape*" or Cercocebus or Cercopithec* or Chimpanzee\$ or Chiropote\$ or Colobinae or Colobus or Douroucouli or Erythrocebus or Gelada\$ or Gibbon\$ or Hamadrya\$ or Hapale\$ or Hylobat\$ or Langur\$ or Leontideus or Leontopithecus or Lophocebus or Mangabey\$ or Mandrillus or "Miopithecus Talapoin*" or "Pan Paniscus" or	35,176

## Anhang

	<p>“Pan Troglodytes” or Pongidae or Pongo\$ or Presbyti\$ or Pygathri* or          Platyrrhin* or Tamarin\$ or Saguinus or Saimir* or Siamang\$ or Pitheciidae or          Pitheciin* or Pithecin* or Pithecia\$ or Tarsier\$ or Tarsii* or Tarsius or          Theropithec*)</p> <p>Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017</p>	
1	<p>ts=(“large animal*” or “large mammal*” or baboon* or beagle* or bovine* or          cat or cats or canine* or cattle* or cavy or cavia or cow or cows or cynomolgus          or dog or dogs or equine* or feline* or goat* or gyrencephalic or hare or horse*          or macaca* or macaque* or marmoset* or monkey* or papio* or primate* or          NHP or ovine* or pig or pigs or porcine* or rabbit* or sheep* or swine*)</p> <p>Indexes=SCI-EXPANDED Timespan=1990-2017</p>	1,378,649

Key:

ts= topic (cover title, abstract, author keywords, keywords Plus®)

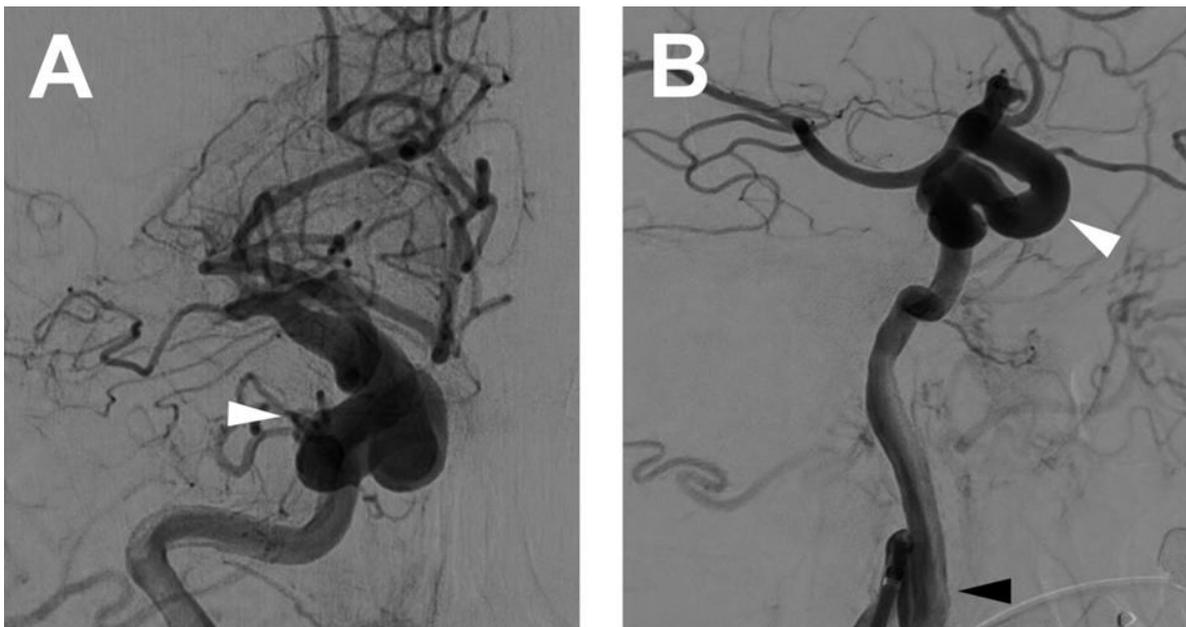
\* = Word stem with any ending

\$ = Placeholder for 0 or 1 character

? = Placeholder for exactly 1 character

near/x = Terms in any order within x words

### 8.3 Supplementary Figure 1: DSA carotid siphon



DSA from mechanical thrombectomy procedure in elderly patient with acute MCA occlusion showing an extremely elongated carotid siphon (white arrows) in AP and lateral

view. See additional tortuosity of cervical ICA (black arrow in B) making endovascular access challenging.

## 8.4 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Schemaabbildung der pathophysiologischen Mechanismen an und in einer Nervenzelle im Falle eines ischämischen Schlaganfalles .....</i>	<i>5</i>
<i>Abbildung 2: Illustration des ischämischen Kerns und der Penumbra .....</i>	<i>6</i>
<i>Abbildung 3: Stent- und Merci-Retriever .....</i>	<i>10</i>
<i>Abbildung 4: Schemaabbildung eines Kühlkathetersystems.....</i>	<i>14</i>
<i>Abbildung 5: Angriffspunkte der Hypothermie .....</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 6: Blutversorgung Schafgehirn .....</i>	<i>18</i>
<i>Abbildung 7: Temperaturabfall während der Kühlungsphase .....</i>	<i>57</i>

### 9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Professor Dr. Dr. Johannes Boltze danken. Sie haben mir diese Doktorarbeit ermöglicht und mich zu jeder Tages- und Nachtzeit fachlich unterstützt. Vielen Dank für Ihr stets offenes Ohr und Ihre Zeit. Sie haben mich über die ganze Zeit herausragend betreut und motiviert. Ich habe sehr viel von Ihnen gelernt!

Besonders danken möchte ich auch Professor Dr. Stephan Meckel. Du hast mich in dein Team aufgenommen und es mir ermöglicht, bei diesen interessanten Studien mitzuarbeiten. Es war eine spannende und lustige Zeit, auch weil du Stephan, das Team entspannt und freundschaftlich geleitet hast. Vielen Dank für deine Hilfe!

Ganz herzlich möchte ich Professor Dr. Christoph Mülling für die großartige Betreuung meiner Doktorarbeit und die immerwährende Unterstützung danken.

Danken möchte ich außerdem unserem ganzen Team der Universitätsklinik Freiburg. Vielen Dank für die fachliche Unterstützung von Professor Dr. Jörg Haberstroh und Dr. Heidi Cristina Schmitz. Ebenso vielen Dank an die Tierpfleger im Stall und in der Klinik. Ich wusste „meine“ Schafe in guten Händen und Hilfe war immer sofort zur Stelle. Herzlichen Dank an Frau Edith Motschall, Sie haben sich viel Zeit für mich genommen und tatkräftig unterstützt.

Den Dank an meine Eltern kann ich nicht in Worte fassen. Ihr lacht und weint mit mir, ihr seid immer für mich da. Ohne eure Motivation hätte ich diese Doktorarbeit schon längst aufgegeben.

Der größte Dank geht an meinen Mann und meine zwei Buben. Ihr seid meine größte Motivation, für alles. Endlich ist meine „Dottorarbeit“ fertig!