Aus der Klinik für Pädiatrische Kardiologie und Intensivmedizin (Prof. Dr. med. T. Paul) der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# Auswirkungen der doppelten Kryoenergieapplikation am wachsenden Schweinemyokard: Läsionsgrößen, Koronaraffektion

## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von Nehle Ehritt, geb. Gröne aus

Göttingen 2021

Düsseldorf

Dekan:Prof. Dr. med. W. BrückReferent/in:PD Dr. med. H. SchneiderKoreferent/in:Prof. Dr. Markus ZabelPromotor/in:Prof. Dr. Ralf DresselDatum der mündlicher Prüfung:09,08.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Auswirkungen der doppelten Kryoenergieapplikation am wachsenden Schweinemyokard: Läsionsgrößen, Koronaraffektion" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Schneider H, Stahl M, Schillinger W, Müller M, Backhoff D, Schill M, **Groene N**, Krause U, Sigler M, Paul T (2019): Double cryoenergy application (freeze-thaw-freeze) at growing myocardium: Lesion volume and effects on coronary arteries late after energy application. Implications for efficacy and safety in pediatric patients. J Cardiovasc Electrophysiol <u>7</u>, 1127-1134

# INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Definition und Einteilung der supraventrikulären Tachykardien	2
1.3 Atrioventrikuläre Reenty-Tachykardie und Wolff-Parkinson-White-Syndr	3
1.4 Klinik	4
1.5 Therapieoptionen	5
1.5.1 Medikamentöse Therapie	5
1.5.2 Operative Techniken	6
1.5.3 Katheterablation	7
1.6 Katheterablation – Grundlagen	7
1.6.1 Mapping	7
1.6.2 Hochfrequenzstromablation	9
1.6.3 Kryoablation	10
1.6.4 Doppelte Kryoablation	10
1.6.5 Nebenwirkungen der Ablationsbehandlung	11
1.6.6 Vorteile der Kryoablation als alternative Methode zur Hochfrequenzst	romablation
1.7. Fragestellung und Zielsetzung der Dissertation	
2 Material und Methoden	14
2.1 Versuchstiere	14
2.2 Technische Instrumente	15
2.3 Experimenteller Teil	15
2.3.1 Vorbereitung	15
2.3.2 Narkose	15
2.3.3 Medikamente	16
2.3.4 Angiographie und intrakoronarer Ultraschall	18

#### Inhaltsverzeichnis

2.3.5 Kryoapplikation	19
2.3.6 Nachsorge	20
2.3.7 Nachuntersuchung	21
2.4 Aufbereitung und histologische Untersuchung	22
2.4.1 Makroskopische Dokumentation	22
2.4.2 Histologie	23
2.5 Planimetrie und Volumetrie	28
2.6 Statistische Auswertung	29
3 Ergebnisse	30
3.1 Kryoapplikation und bildgebende Verfahren	30
3.1.1 Koronarangiographie	30
3.1.2 Intrakoronare Ultraschalluntersuchung	32
3.2 Makroskopie der Kryoläsionen	33
3.3 Mikroskopie	34
3.3.1 Histologische Auffälligkeiten	34
3.3.2 Volumetrie	46
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	53
4 Diskussion	54
4.1 Unerwünschte Nebenwirkungen nach Katheterablation	54
4.1.1 Koronararterielle Veränderungen	54
4.1.2 Thrombusformation	56
4.2 Morphometrische Analyse	57
4.2.1. Läsionsvolumina im Vergleich der unterschiedlichen Energiemodalitäten	57
4.2.2 Tiefenausdehnung von Kryoapplikationsläsionen	59
4.3 Läsionsmorphologie	61
4.4 Effektivität der Ablationsbehandlungen	62
4.5 Schlussfolgerung	62
4.6 Limitationen	64
5 Zusammenfassung	65
6 Literaturverzeichnis	67

## **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Versuchsschwein während der Behandlung16
Abbildung 2: Katheternavigation mittels LocaLisa <sup>®</sup> 19
Abbildung 3: Schemazeichnung der Läsionslokalisationen20
Abbildung 4 a-c: Makroskopische Aufnahmen einer atrialen Kryoläsion
Abbildung 5: Elastica-van-Gieson-Färbung eines Myokardschnittes mit Kryoläsion24
Abbildung 6: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Myokardschnittes mit Kryoläsion25
Abbildung 7: Desmin-Färbung eines Myokardschnittes mit Kryoläsion
Abbildung 8 a,b: Koronarangiographie der linken Koronararterie
Abbildung 9 a,b: Koronarangiographie der rechten Koronararterie
Abbildung 10: Darstellung der rechten Koronararterie sechs Monate nach doppelter
Kryoapplikation durch ICUS im Querschnitt
Abbildung 11 a-c: Läsionsmorphologie
Abbildung 12 a,b: Präparat einer transmuralen atrialen Kryoläsion
Abbildung 13: Atriale Kryoläsion mit unauffälliger Koronararterie
Abbildung 14: Vergrößerung der Koronararterie aus Abbildung 1335
Abbildung 15: Ventrikuläre Kryoläsion mit unauffälliger Koronararterie
Abbildung 16: Vergrößerung der Koronararterie aus Abbildung 15
Abbildung 17: Ventrikuläre Kryoläsion mit Koronararterienveränderung
Abbildung 18: Vergrößerung der Koronararterie aus Abbildung 17
Abbildung 19: Koronararterie mit Verdickung von zwei Wandschichten
Abbildung 20 a,b: Vergrößerung der Koronararterie aus Abbildung 19
Abbildung 21: Atriale Kryoläsion mit Verdickung aller drei Arterienwandschichten40
Abbildung 22 a,b: Vergrößerung der Koronararterie aus Abbildung 2140
Abbildung 23: Ventrikulären Kryoläsion mit intrakoronarem Thrombus41
Abbildung 24 a,b: Vergrößerung der Koronararterie aus Abbildung 2341
Abbildung 25: Ventrikuläre Kryoläsion mit muskulärem Gewebseinschluss42
Abbildung 26: Vergrößerung der Kryoläsion aus Abbildung 2542
Abbildung 27: Knorpelformation innerhalb einer ventrikulären Kryoläsion
Abbildung 28: Vergrößerung des Läsionsbereiches aus Abbildung 2743
Abbildung 29: Gefäßproliferation innerhalb einer atrialen Kryoläsion44
Abbildung 30: Vergrößerung des Läsionsbereiches aus Abbildung 2944

Abbildung	31:	Boxplott-Darstellung	der	Volumina	sechs	Monate	nach	doppelter
Kryoapplika	ation			•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••				50
Abbildung	32: B	oxplott-Darstellung de	r Tie	fenausdehn	ung sec	hs Monat	e nach	doppelter
Kryoapplika	ation							50

# **TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Applizierte Medikamente
Tabelle 2: Arbeitsschritte der Alkoholfixierung
Tabelle 3: Färbeprotokoll der Elastica-van-Gieson-Färbung
Tabelle 4: Färbeprotokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung    25
Tabelle 5: Färbeprotokoll der Desmin-Färbung
Tabelle 6: Häufigkeit und Lokalisation der morphologischen Auffälligkeiten
Tabelle 7: Läsionsausdehnung der atrialen Kryoläsionen
Tabelle 8: Statistische Auswertung der Ausdehnung der atrialen Kryoläsionen47
Tabelle 9: Statistische Auswertung der Ausdehnung der ventrikulären Kryoläsionen49
Tabelle 10: Statistischer Vergleich der Läsionsausdehnungen sechs Monate nach
Kryoapplikation51
Tabelle 11: Vergleich der Läsionsausdehnung 48 Stunden und sechs Monate nach doppelter
Kryoapplikation
Tabelle 12: Vergleich der Läsionsvolumina 48 Stunden und sechs Monate nach
Hochfrequenzstromapplikation, einfacher Kryoapplikation und doppelter Kryoapplikation

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

А	Atrium
A. dest.	destilliertes Wasser
AV	Atrioventrikular
EKG	Elektrokardiogramm
E.v.G.	Elastica-van-Gieson
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
ICUS	intrakoronarer Ultraschall
LAO	links anteriore oblique Projektion
LCA	linke Koronararterie
RAO	rechts anteriore oblique Projektion
RCA	rechte Koronararterie
RCX	Ramus circumflexus
RIVA	Ramus interventricularis anterior
TK	Trikuspidalklappe
TTBS	Tris-Puffer-Lösung
V	Ventrikel
Verd.	Verdünnung
WPW	Wolff-Parkinson-White

## **1 EINLEITUNG**

#### **1.1 Einführung**

Jedes hundertste Kind leidet unter Herzrhythmusstörungen. Den größten Teil davon machen angeborene Fehlanlagen aus, wie beispielsweise akzessorische atrioventrikuläre Leitungsbahnen im Herzen (Ulmer 2003).

Bei der physiologischen Reizleitung des Herzens wird der elektrische Impuls vom Sinusknoten auf den AV-Knoten (Atrioventrikularknoten) übertragen, welcher ihn an das Kammerreizleitungssystem weitergibt. Die Vorhöfe sind hierbei durch das Herzskelett elektrisch von den Kammern isoliert und eine Reizweiterleitung ist nur über den AV-Knoten möglich. Supraventrikuläre Tachykardien gründen in einer Störung dieses Reizleitungssystems oberhalb des HIS-Bündels. Sie stellen bei Kindern mit einer Inzidenz von 0,1-0,4% den größten Teil der tachykarden Herzrhythmusstörungen dar (Berger et al. 2015). Supraventrikuläre Tachykardien durch akzessorische atrioventrikuläre Leitungsbahnen führen zu einer kreisenden Erregung mit daraus resultierenden Herzfrequenzen von typischerweise 180-250 Schlägen pro Minute (Haas und Kleideiter 2011).

Als Therapieoption ist neben der medikamentösen Therapie die Ablation der pathologischen Leitungsbahn möglich. Die gebräuchlichste Form hierbei ist die Hochfrequenzstromablation. In den letzten Jahren hat sich die Kryoablation als alternative Methode immer mehr bewährt (Schneider 2005).

Diese Arbeit ist Teil einer Versuchsreihe an der Pädiatrie der Universitätsklinik Göttingen, bei der die Effektivität und das Nebenwirkungsprinzip der verschiedenen Ablationsarten verglichen werden. Sie befasst sich insbesondere mit den Auswirkungen einer doppelten Kryoapplikation auf das wachsende Myokard.

### 1.2 Definition und Einteilung der supraventrikulären Tachykardien

Supraventrikuläre Tachykardien werden dadurch definiert, dass oberhalb der Bifurkation des HIS-Bündels liegende anatomische Strukturen wesentlich an der Entstehung der Tachykardie beteiligt sind und  $\geq$  3 konsekutive Tachykardieimpulse bestehen (Leitlinie tachykarde Herzrhythmusstörungen 2018).

Die häufigste Form der supraventrikulären Tachykardien im Kindesalter ist die Atrioventrikuläre-Reentrytachykardie (Kiess et al. 2007). Ursächlich ist hierbei eine kreisende Erregung zwischen Vorhof und Ventrikel über eine akzessorische Leitungsbahn (Schumacher et al. 2008).

Die zweithäufigste Form der supraventrikulären Tachykardien bei Kindern ist die AV-Knoten-Reentry-Tachykardie (Reinhardt et al. 2014). Hierbei liegt die Ursache in einem funktionell längsdissoziierten AV-Knoten mit zwei anatomisch separaten Leitungsbahnen, wovon ein Schenkel eine langsame und der andere eine schnelle Leitungsqualität besitzt (Leitlinie tachykarde Herzrhythmusstörungen 2018).

Die selteneren Formen der supraventrikulären Tachykardien sind die chronischpermanenten supraventrikulären Tachykardien, die junktionale ektope Tachykardie, die intraatrialen Tachykardien, das Vorhofflattern und das Vorhofflimmern.

Zu den chronisch-permanenten supraventrikulären Tachykardien gehören die permanente Form der junktionalen Reentry-Tachykardie und die fokale atriale Tachykardie. Ursächlich für die fokale atriale Tachykardie ist ein im Vorhof lokalisiertes Erregungszentrum außerhalb des Sinusknotens, welches zu einer abnormen Reizbildung führt (Schumacher et al. 2008). Die permanente junktionale Reentry-Tachykardie wird durch eine akzessorische Leitungsbahn mit decrementalen Reizleitungseigenschaften und ausschließlich retrograder Leitung bedingt (Leitlinie tachykarde Herzrhythmusstörungen 2018).

Den intraatrialen Tachykardien liegt ein Makro-Reentry-Mechanismus im Vorhof zugrunde. Dieser wird meist durch Operationsnarben verursacht. Beim Vorhofflattern kreist die Erregung um die Trikuspidalklappe durch den cavotrikuspidalen Isthmus. Das Vorhofflimmern beruht auf multiplen Mikro-Reentry-Kreisen in den Vorhöfen, was einen funktionellen Vorhofstillstand und eine ungeordnete Erregungsüberleitung auf die Kammern zur Folge hat (Haas und Kleideiter 2011).

# **1.3 Atrioventrikuläre Reenty-Tachykardie und Wolff-Parkinson-**White-Syndrom

Die atrioventrikulären Reentry-Tachykardien machen den größten Teil der supraventrikulären Tachykardien im Kindesalter aus (Kiess et al. 2007).

Der Pathomechanismus beruht auf einer kreisenden Erregung zwischen Vorhof und Ventrikel über eine akzessorische Leitungsbahn.

Hierbei unterscheidet man zwischen orthodromer und antidromer Erregungsleitung. Bei der orthodromen Erregungsleitung erfolgt die antegrade Reizleitung während der tachykarden Episode über den AV-Knoten und die retrograde Leitung über die akzessorische Bahn. Bei der antidromen Erregungsleitung ist dies andersherum. Da der AV-Knoten in der Regel eine bessere antegrade Leitungsfähigkeit hat als die akzessorische Bahn, kommt die orthodrome Erregungsleitung wesentlich häufiger vor (Schumacher et al. 2008).

Ein WPW-Syndrom (Wolff-Parkinson-White) besteht aus einer Kombination einer supraventrikulären Tachykardie mit einer Delta-Welle mit verkürzter PQ-Zeit im Oberflächen-EKG (Elektrokardiogramm) (Leitlinie tachykarde Herzrhythmusstörungen 2018).

Die Delta-Welle spiegelt eine vorzeitige Kammererregung durch die akzessorische Bahn wider (Präexzitation). Dies ist der Fall, wenn die akzessorische Bahn zusätzlich zum AV-Knoten auch im Sinusrhythmus die Erregung vom Vorhof zum Ventrikel leitet. Meist wird die tachykarde Episode durch eine supraventrikuläre Extrasystole ausgelöst. Es kommt zu einer vorzeitigen Erregung im Vorhof, wobei die akzessorische Leitungsbahn noch unidirektional blockiert ist. Der AV-Knoten leitet die Erregung allein auf den Ventrikel über und die Erregung läuft über die inzwischen nicht mehr refraktäre akzessorische Leitungsbahn in den Vorhof zurück (Berger et al. 2015).

#### 1.4 Klinik

Die Klinik der supraventrikulären Tachykardien kann sehr unterschiedlich ausfallen. In einigen Fällen gehen sie völlig ohne Symptomatik einher und die Diagnose wird nur als Zufallsbefund im EKG gestellt, andererseits kann die Symptomatik über schwere hämodynamische Dysfunktion bis zum plötzlichen Herztod reichen (Leitlinie Tachykarde Herzrhythmusstörungen 2018).

Die Klinik richtet sich vor allem nach dem Alter des Kindes, der kardialen Anatomie, dem Typ der vorliegenden Tachykardie, sowie der Herzfrequenz und der Dauer der tachykarden Episode (Haas und Kleideiter 2011, Berger et al. 2015).

Bei Säuglingen sind die Symptome anfangs oft schwer zu erkennen. Nach längeren unbemerkten Tachykardien können sie Zeichen einer Herzinsuffizienz (vermehrtes Schwitzen, Blässe, Trinkschwäche, Stauungszeichen) bis zur kardialen Dekompensation zeigen (Berger et al. 2015). Typische Erscheinungen bei Kindern und Jugendlichen sind Palpitationen und Angstzustände, aber auch Dyspnoe, Schwäche, Blässe, Schwindel und je nach Dauer der Tachykardie sogar pektanginöse Beschwerden. Selten kann es hierbei auch zu Synkopen kommen.

Das Präexzitationssyndrom ist mit verschiedenen Arten von Tachyarrhythmien assoziiert. Durch eine potenziell hochfrequente Überleitung primär atrialer Tachykardien ist die Inzidenz von Kammerflimmern und somit auch die des plötzlichen Herztodes erhöht (Leitlinie Tachykarde Herzrhythmusstörungen 2018). Bei länger anhaltenden und häufig rezidivierenden Tachykardien, und somit besonders auch bei der permanenten Form der junktionalen Reentry-Tachykardie, können die Patienten im Langzeitverlauf eine sekundäre dilatative Kardiomyopathie mit entsprechenden Folgen entwickeln (Leitlinie Tachykarde Herzrhythmusstörungen 2018, Reinhardt et al. 2014).

#### **1.5 Therapieoptionen**

Eine Behandlung der supraventrikulären Tachykardien ist generell dann indiziert, wenn diese entweder symptomatisch werden oder potenziell eine gesundheitliche Bedrohung darstellen (Leitlinie Tachykarde Herzrhythmusstörungen 2018). Hierbei lassen sich Behandlungen zur Terminierung einer akuten tachykarden Episode von denen zur Prävention eines erneuten Auftretens der Tachykardie unterscheiden.

Akute tachykarde Anfälle können selbstlimitierend sein. Therapieoptionen zu ihrer Beendigung stellen einerseits vagale Manöver, wie das Trinken von kaltem Wasser, Bauchpresse etc. dar. Ist dies nicht erfolgreich, kann andererseits eine medikamentöse Therapie eingeleitet werden (s.u.). Weitere Möglichkeiten bestehen in der transösophagealen bzw. endokardialen Stimulation und der externen und internen Kardioversion (Kiess et al. 2007).

Zur permanenten Therapie supraventrikulärer Tachykardien besteht zum einen die Möglichkeit einer antiarrhythmischen medikamentösen Dauertherapie. Als kurative Therapie besteht die Option einer Hochfrequenz- bzw. Kryoablation. Operative Eingriffe bei supraventrikulären Tachykardien sind heutzutage von der minimalinvasiven elektrophysiologischen Untersuchung abgelöst worden.

#### 1.5.1 Medikamentöse Therapie

Zur Akutbehandlung und zur Dauertherapie der akuten supraventrikulären Tachykardien stehen verschiedene Medikamente zur Verfügung. Die Indikation ist jedoch je nach Tachykardieform und Patientenalter sehr unterschiedlich zu stellen.

Mittel der Wahl zur Akuttherapie einer tachykarden Episode der AV-Knoten abhängigen supraventrikulären Tachykardien ist Adenosin.

Die Applikation von Adenosin hat das kurzfristige Anhalten des AV-Knotens zur Folge. Wenn es korrekt dosiert und appliziert wird hat es eine Erfolgsrate von > 95% (Reinhardt et al. 2014).

Alternativ können auch Flecainid oder Amiodaron und bei Kindern ab dem Schulkindalter Verapamil verabreicht werden. Aufgrund der Gefahr der elektromechanischen Entkopplung ist Verapamil bei Neugeborenen und Kleinkindern jedoch kontraindiziert (Reinhardt et al. 2014).

Bei der Dauertherapie ist es wichtig, zwischen Tachykardien mit und ohne Präexzitation

zu unterscheiden. Zur Behandlung beider Formen sind generell  $\beta$ -Blocker, Propafenon, Flecainid, dl-Sotalol und Amiodaron geeignet, bei nicht ausreichendem Therapieeffekt unter Umständen auch in Kombination.

Bei Säuglingen ist oft ausschließlich eine medikamentöse Therapie sinnvoll. Oft sistieren die Tachykardien im ersten Lebensjahr spontan, sodass danach keine Therapie mehr notwendig ist (Leitlinie tachykarde Herzrhythmusstörungen 2018).

#### **1.5.2 Operative Techniken**

Die operative Therapie von tachykarden Herzrhythmusstörungen ist in den vergangenen Jahren sehr in den Hintergrund gerückt. Während vormals chirurgische Verfahren mit Exzision der akzessorischen Bahnen angewandt wurden, sind diese nun von der Technik der minimalinvasiven interventionellen Ablation dieser Bahnen verdrängt worden.

Früher war ein thoraxchirurgischer Eingriff zum Teil unter Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine gebräuchlich.

Obwohl das chirurgische Verfahren hierbei gute Ergebnisse mit sich gebracht hat, ist dieser Eingriff durch die modernen Kathetertechniken verdrängt worden (Ziemer und Haverich 2010).

#### 1.5.3 Katheterablation

Die Katheterablation ist auch bei Kindern inzwischen eine gängige Therapieoption zur kurativen Behandlung tachykarder Herzrhythmusstörungen.

Das Prinzip ist hierbei, durch eine Energieübertragung auf das Myokard an bestimmten Loci Narben zu setzen und somit den Fokus der abnormalen Erregungsleitung zu eliminieren. Dabei können unterschiedliche Energieformen zum Einsatz kommen.

Zuerst etablierte sich die Hochfrequenzstromablation als kathetergestütztes Verfahren zur Verödung pathologisch leitenden Myokards, durch eine Kombination von thermalen, elektrischen und mechanischen Einflüssen. Bald darauf folgte die Entwicklung anderer Energieformen zur Ablation wie Kryo-, Mikrowellen-, Laser-Energie oder chemischer Verfahren in Form von intrakoronarer Alkoholinfusion. Verbreitete klinische Verwendung finden davon heute insbesondere die Hochfrequenzablation und die Kryoablation (Schmitt et al. 2006).

#### **1.6 Katheterablation – Grundlagen**

#### 1.6.1 Mapping

Beim Mapping werden multiple intrakardiale Elektrogramme aufgenommen. Diese werden dann der Anatomie der entsprechenden Herzkammer zugeordnet, um daraus eine elektrophysiologische Karte zu erstellen. Durch dieses Verfahren kann die Lokalisation einer Herzrhythmusstörung genau bestimmt werden, was einen entscheidenden Teilschritt einer erfolgreichen Ablationstherapie darstellt.

Die konventionellen Mapping-Techniken erfolgen unter Durchleuchtung. Bei moderneren Verfahren ist ein Mapping auch ohne Durchleuchtung möglich. Bei den konventionellen Mapping-Methoden lassen sich allgemein drei Techniken unterscheiden, wobei die Auswahl der Technik sich vorwiegend nach der Art der Herzrhythmusstörung richtet: Das Aktivierungs-Mapping, das Pace-Mapping und das Entrainment-Mapping (Schneider 2005).

Beim Aktivierungs-Mapping wird das Endokard mithilfe eines Ablations-Katheters abgetastet, wobei von der jeweiligen Stelle Elektrokardiogramme geschrieben werden. Die zeitliche Differenz dieser Elektrokardiogramme zu einem bestimmten Referenzpunkt wird gemessen und somit kann die Lokalisation der frühsten Erregung detektiert und

#### 1 Einleitung

abladiert werden. Das Aktivierungs-Mapping wird normalerweise während einer stabilen Rhythmusstörung durchgeführt. Diese Art des Mappings eignet sich deshalb besonders für anhaltende Formen von Herzrhythmusstörungen. Ist ein Aktivierungs-Mapping während der Tachykardie nicht möglich, kann das Pace-Mapping angewandt werden. Hierbei werden die EKG Ableitungen des Endokards während der Stimulation mit denen während der Herzrhythmusstörung verglichen. Der Katheter befindet sich dann an dem Ort der pathologischen Erregung, wenn die Morphologie der Kammerkomplexe in allen Ableitungen gleich der Morphologie während der Tachykardie ist. Das Entrainment-Mapping wird bei Reentry-Tachykardien verwendet. Der Ablations-Katheter wird hierbei an der Stelle der langsam leitenden Region positioniert und während der Tachykardie werden Stimulationsimpulse über diesen Katheter abgegeben. Ist die Zeit zwischen der letzten Stimulation und dem Beginn des nächsten Vorhofpotentials gleich lang wie das Zeitintervall zwischen den Reentry-Erregungen, bedeutet dies, dass der Katheter sich innerhalb der kreisenden Erregung befindet (Schneider 2005).

In den letzten Jahren wurden in der Entwicklung neuer Mapping-Techniken große Fortschritte gemacht, wodurch auch der Therapieerfolg von Ablationsbehandlungen eine wesentliche Verbesserung verzeichnete. Mit Hilfe der modernen Verfahren wie 3D-Lokalisation intrakardialer Elektroden (Localisa), elektroanatomisches Mapping (Carto), Non-Contact-Mapping (Ensite, NavX), sowie multipolares Basketmapping ist eine wesentlich genauere Lokalisation der Katheter und somit der pathologischen Substrate möglich (Schmitt et al. 2002).

Bei den Versuchen dieser Arbeit wurde das Localisa System verwendet, weshalb im Folgenden nur auf dieses genauer eingegangen wird. Hierbei wird durch externe kutane Elektroden ein schwaches elektrisches Feld (1 mA mit einer minimal unterschiedlichen Frequenz von ca. 30 kHz) in drei orthogonale Richtungen aufgebaut. Jede Katheterbewegung in diesem elektrischen Feld hat eine Änderung der gemessenen Impedanz jeder Elektrode zur Folge. Durch Abtasten der Herzhöhle mit einem Katheter kann nun eine genaue, dreidimensionale elektrokardiographische Landkarte erstellt werden. Die Lokalisationsgenauigkeit des Systems beträgt 1-2 mm (Wittkampf et al. 1999, Schmitt et al. 2006).

#### 1.6.2 Hochfrequenzstromablation

zunächst unabsichtlich, durch eine zufällige Berührung 1979 wurde, einer Defibrillationselektrode mit einem Elektrodenkatheter während der Schockabgabe bei Defibrillation die erste Katheterablation durchgeführt. Durch diese Gleichstromapplikation wurde ein AV-Block ausgelöst und bald darauf nutzte man diese Technik zur gezielten Unterbrechung von Leitungsbahnen. Um 1986 löste der Einsatz von Hochfrequenzstrom zur Ablation die Technik des Gleichstroms ab. Heute ist die Hochfrequenzstromablation die gängigste Ablationsmethode zur Behandlung tachykarder Herzrhythmusstörungen (Schneider 2005). Hierbei wird über einen transvenösen Elektroden-Katheter Hochfrequenzenergie von 300-1000 kHz auf die pathologisch leitende Region des Myokards übertragen. An der nur 4-8 mm messenden Katheterspitze besteht eine sehr hohe Energiedichte. An der Stelle, wo der Hochfrequenzstrom durch das Gewebe fließt, folgen die elektrisch geladenen Ionen der Richtung des Drehstroms. Das Gewebe stellt dabei einen elektrischen Widerstand dar. Demzufolge kommt es zu einer Umwandlung der elektromagnetischen Energie in mechanische Energie und letztlich zur Hitzeentwicklung. Eine distal am Körper angebrachte indifferente Flächenelektrode dient als Gegenelektrode durch die der Strom den Körper wieder verlassen kann (Schmitt et al. 2006). Die Ablationszeit beträgt zwischen 30 und 120 Sekunden mit einer maximalen Solltemperatur zwischen 50°C und 70°C an der Katheterspitze. Wenn das Gewebe eine Temperatur von etwa 48°C übersteigt, wird den Zellen Wasser entzogen und es kommt zu einer Koagulationsnekrose. Die pathologische Reizweiterleitung wird somit an der abladierten Myokardregion unterbunden (Schneider 2005).

#### 1.6.3 Kryoablation

Insbesondere im Kindesalter ist die Kryoablation eine neuere Alternative zur Hochfrequenzablation bei der Therapie vieler Arten von Tachykardien. Die Technik der Kryoablation basiert im Gegensatz zur Radiofrequenzstromablation auf einer Schädigung der Myokardzellen durch Kälte statt durch Hitze.

Hierbei wird flüssiger Stickstoff durch einen Infusionskanal zu einer Evaporationskammer an der Katheterspitze geführt. Durch eine plötzliche Ausdehnung des flüssigen Stickstoffs wird der Katheterspitze und dem umliegenden Gewebe Wärme entzogen. Anschließend wird der Stickstoff über einen Vakuumanschluss wieder aus dem System entfernt (Schneider 2005).

Bei ca. -30°C bildet sich ein Eisball an der Katheterspitze, was dazu führt, dass der Katheter am Endokard festfriert. Die Myokardzellen werden bei dieser Temperatur zunächst passager geschädigt, sodass der gewünschte Effekt zwar voraussehbar, aber reversibel ist. Ist aus dem intrakoronarem Elektrogramm nun erkennbar, dass die richtige Stelle zur Ablation gefunden wurde, wird die Temperatur auf -75°C gesenkt. Dadurch kommt es zur Gewebsschädigung und zum angestrebten Ablationseffekt. Den Vorgang, die gewünschte Ablationsstelle durch die besagte Technik ausfindig zu machen, bezeichnet man als "Kryo-mapping" (Schumacher et al. 2008).

Der Mechanismus der Zellschädigung während der Kryoablation kann in drei Phasen unterteilt werden. Die Einfrier-/Auftau- Phase, die haemorrhagisch-inflammatorische Phase und die fibröse Umwandlungsphase. Der Hauptmechanismus des Zelltodes durch Kryoablation besteht in der intrazellulären Eisbildung, was die Zerstörung der Zellmembran und der zytoplasmatischen Organellen zur Folge hat (Schmitt et al. 2006).

#### 1.6.4 Doppelte Kryoablation

In verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass die Kryoablation eine geringere Effektivität mit sich bringt als die Hochfrequenzstromablation (Deisenhofer et al. 2010, Kriebel et al. 2005).

Um diesem Defizit entgegenzuwirken wurde in einigen Studien gezeigt, dass ein doppelter Anfrierzyklus mit kurzem Auftauintervall eine höhere Effektivität zur Folge haben könnte (Dubuc et al. 1999, Schneider et al. 2013).

Auch in Studien zur Kryoablation an Leber, Prostata und Haut konnte nachgewiesen

werden, dass ein Anfrier-Auftau-Anfrier-Zyklus zu massiveren Gewebeschäden und größeren Läsionen führt (Dubuc et al. 1999).

#### 1.6.5 Nebenwirkungen der Ablationsbehandlung

Die Ablationsbehandlung ist auch bei Kindern eine sehr effektive und nebenwirkungsarme Behandlungsmethode (Van Hare et al. 2004). Die Langzeiteffekte der Ablationsbehandlung sind in der pädiatrischen Kardiologie jedoch noch unzureichend untersucht. In einer Studie von Kugler et al. (1994) wurden die Daten von 24 Zentren ausgewertet und die Komplikationsrate von Radiofrequenzstrombehandlungen an jungen Patienten beschrieben. Hierbei ergab sich eine Komplikationsrate von 4,8%. Neuere Studien beschreiben einen Rückgang der Komplikationsrate auf nur 3% (Kugler et al. 2002), bis hin zu nur 0,7% in einer aktuellen Registerstudie (Krause et al. 2020).

Eine wesentliche Komplikation der Ablationsbehandlung besteht in einer irreversiblen Schädigung des AV-Knotens. Das Risiko eines AV-Blocks liegt bei Hochfrequenzstromablation bei 1,2%-4% (Schumacher et al. 2008, Schmitt et al. 2006).

Eine weitere unerwünschte Nebenwirkung ist die Affektion von Koronararterien, die durch Proliferation von verletzten Gefäßwänden oder thromboembolischen Obliterationen entstehen und sowohl im Tiermodell (Paul et al. 1997, Bökenkamp et al. 2000, Sturm et al. 2004, Schmitt et al. 2006, Aoyama et al. 2005) als auch klinisch beschrieben wurden (Bertram et al. 2001, Roberts-Thomson et al. 2009, Schneider et al. 2009, Stavrakis et al. 2014, Pothineni et al. 2019, Solomon et al. 1993).

Weitere schwerwiegende Komplikationen wie Myokardperforation, Perikarderguss, Apoplex durch thromboembolische Ereignisse und Arrhythmien mit teilweise letalem Ausgang wurden ebenfalls beschrieben (Schaffer et al. 2000).

## 1.6.6 Vorteile der Kryoablation als alternative Methode zur Hochfrequenzstromablation

Obwohl Hochfrequenzstromablation die zurzeit meistgenutzte Ablationsart ist, entwickelt die Kryoablation insbesondere in der pädiatrischen Kardiologie einen zunehmenden Stellenwert.

Ein bedeutender Vorteil der Kryoablation sowohl im Kindes-, als auch im Erwachsenenalter, besteht in der Möglichkeit eine "Probeläsion" zu setzen. Die

Reversibilität dieses Kryomappings ist, besonders in der Nähe kritischer Strukturen, wie des AV-Knotens, ein sehr nützlicher Effekt, da das Risiko einer Fehlablation, die zum Beispiel einen AV-Block verursachen könnte, hierdurch deutlich gesenkt werden kann (Schumacher et al. 2008). Zudem wird durch das Anfrieren des Katheters an das Myokard eine Dislokation verhindert (Schmitt et al. 2006).

Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass die Kryoablation ein geringeres Risiko für das Entstehen von Koronaraffektionen birgt (Kriebel et al. 2009, Khairy et al. 2003, Schneider et al. 2013).

Ein weiterer Vorteil, welcher alle Altersstufen betrifft, ist die Schmerzfreiheit der Prozedur. Bei der Anwendung von Radiofrequenzstrom dagegen kann besonders bei Ablation in Nähe der Vena Cava inferior ein Schmerzreiz entstehen (Schneider 2005).

#### 1.7. Fragestellung und Zielsetzung der Dissertation

Die Kryoablation stellt eine gute Alternative zur Hochfrequenzablation dar, die gerade im Kindesalter durch ihre höhere Sicherheit eine attraktive Behandlungsmöglichkeit bietet. Der größeren Sicherheit steht allerdings die signifikant höhere Rezidivrate entgegen (Deisenhofer et al. 2010, Kriebel et al. 2005).

Um diesen Nachteil eventuell ausgleichen zu können, wurde die Methode der einfachen Kryoablation um ein alternatives Konzept erweitert, in dem eine zusätzliche Läsion am gleichen Ort durch einen Anfrier-Auftau-Anfrier-Zyklus eine höhere Effektivität erreichen sollte (Drago et al. 2010). Die Größen- und Tiefenzunahme der Läsionen durch diese alternative doppelte Ablationsform wurde bisher noch unzureichend am wachsenden Myokardgewebe bei entsprechenden klinisch angewandten Ablationsbedingungen untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es, durch einen doppelten Anfrier-Auftau-Anfrier-Zyklus gesetzte Läsionen mittels exakter Volumetrie genau zu vermessen und die Morphologie zu beurteilen. Durch Koronarangiographie, intrakoronaren Ultraschall und makroskopische und mikroskopische Untersuchung der Applikationsläsionen und der Koronararterien, sollten mögliche Affektionen dieser Gefäße nach Applikation analysiert werden.

Eine Beurteilung der Größenzunahme der Läsionen am wachsenden Myokard war durch den Vergleich der volumetrischen Ergebnisse dieser Arbeit mit den Ergebnissen einer vorausgehenden Arbeit dieser Studie möglich (Schneider et al. 2013, Jakobi 2016), bei welcher die Applikationsergebnisse unter gleichen Bedingungen, jedoch schon 48 Stunden nach Applikation untersucht wurden.

Ziel war es, durch eine genaue mikroskopische Analyse der Läsionen und der Auswirkung der Energieapplikation auf die umgebenden kardialen Strukturen, die unerwünschten Wirkungen dieser Behandlungsvariante zu eruieren, sowie deren Effektivität durch die Beurteilung der Ausdehnung und Größenzunahme der Läsionen abzuschätzen.

Durch diese Arbeit soll ein weiterer Schritt in der Suche nach einer effektiven und gleichzeitig sicheren Behandlungsoption arrhythmogener Substrate bei Kindern gemacht werden.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

#### 2.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen dieser Studie wurden mit Schweinen durchgeführt, da Schweineherzen sich bis auf einige Verschiedenheiten gut zum Vergleich mit Menschenherzen eignen, insbesondere in Bezug auf die Koronargefäße (Crick und Sheppard 1998).

Als Versuchstiere standen bei dieser Studie zehn junge Schweine der deutschen Landrasse zur Verfügung, die im Alter von sechs Wochen bei einem Gewicht von ca. 15 kg untersucht wurden. Die Tiere wurden auf einem Versuchsgut in Niedersachsen artgerecht gehalten und vor sowie nach den tierexperimentellen Versuchen für einige Tage in der tierexperimentellen Abteilung des Universitätsklinikums beobachtet. Nach der erfolgten Kryoapplikation wurden die Schweine wieder auf das Versuchsgut gebracht, wo sie weitere sechs Monate artgerecht aufgezogen wurden und während der gesamten Studiendauer unter tierärztlicher Betreuung standen.

Außer der täglichen Gabe von 100 mg Acetylsalicylsäure, die zur Vermeidung von Adhäsionsthromben diente, erhielten die Tiere während dieser Zeit keinerlei Medikamente. Bei den zehn Schweine wurden zu Beginn des Experiments gemäß dem vorgegebenen Arbeitsplan insgesamt sieben Kryoapplikationsläsionen induziert. Nach 48 Stunden wurde fünf der zehn Tiere randomisiert erneut untersucht und das jeweils in tiefer Allgemeinnarkose herauspräparierte Herz der histologischen Aufarbeitung zugeführt. Die Ergebnisse dieser in einer frühen Phase untersuchten Tiere wurden in einer gesonderten Arbeit veröffentlicht (Jakobi 2016, Schneider 2013).

Die bei der vorliegenden Arbeit behandelten fünf Schweine wurden nach sechs Monaten erneut untersucht. Auch die Aufarbeitung der Herzen für die weiteren histologischen Bestimmungen erfolgte zu diesem Zeitpunkt. Nach diesem sechsmonatigen Wachstum wogen die Herzen der Tiere zwischen 240 g und 300 g.

Der Tierversuchsantrag zur aktuellen Studie wurde von der Tierschutzkommission in Braunschweig genehmigt (Aktenzeichen 33.42502-04-031/07).

#### 2.2 Technische Instrumente

vorgesehenen Kryoenergieapplikationen wurde Für die bei allen Tieren als Kryoablationskatheter der 7 French Freezor® Xtra, Cryocath, Quebec, Canada benutzt. Die jeweilige exakte Lokalisation des Katheters wurde durch das real-time, 3-dimensionale Katheternavigationssystem LocaLisa® gewährleistet. Zur Dokumentation der makroskopisch sichtbaren Läsionen wurde als Kamera die Digitalkamera D5000 der Firma Nikon benutzt.

Nach Aufarbeitung der gesamten Läsionen in seriellen Längsschnitten wurden diese mit Hilfe des digitalen Mikroskopiersystems DotSlide SL der Firma Olympus, bestehend aus dem Olympusmikroskop BX51, einem automatischen Slideloader, einer integrierten peltiergekühlten Kamera und einer PC-basierten Workstation eingescannt. Die Bilddateien der Histologiepräparate wurden zur Planimetrie mit einer Bildverarbeitungssoftware, der DPsoft Archivierungssoftware F DP 10 der Firma Olympus, in ihrer Ausdehnung vermessen.

#### 2.3 Experimenteller Teil

#### 2.3.1 Vorbereitung

Zu Beginn des Versuches wurden alle zehn für das Experiment vorgesehenen Tiere durch die i.m.-Gabe von Azaperon (Stresnil<sup>®</sup>) prämediziert. Eine Venenverweilkanüle in der Vena auricularis sicherte während des Eingriffs den venösen Zugang. Nach der Vorbereitung des Punktionsortes im Inguinalbereich durch eine Lokalanästhesie (Lidocain) wurden die *Arteria* und die *Vena femoralis* mittels Seldinger-Technik punktiert.

#### 2.3.2 Narkose

Das Versuchstier wurde nach endotrachealer Intubation zum weiteren Prozedere in Rückenlage gelagert und fixiert. Zur Narkoseeinleitung bekamen die Tiere 0,1 mg Midazolam pro kg KG (Körpergewicht) sowie 1 mg Ketamin pro kg KG. Die Dauernarkose wurde mittels zweiprozentiger Isofloran-Gasnarkose gewährleistet, zusätzlich erhielten die Tiere ein Hypnotikum (Propofol ca. 1 mg pro kg KG pro Stunde).

Das Narkosegerät war von der Firme Dräger (Sulla 19), der Narkoseverlauf wurde

2 Material und Methoden

dokumentiert und die Vitalparameter kontinuierlich überwacht.



Abbildung 1: Versuchsschwein während der Behandlung

### 2.3.3 Medikamente

Außer den bereits erwähnten Medikamenten zur Narkosevorbereitung und zur Aufrechterhaltung der Dauernarkose erhielten die Tiere nach Anlage der venösen Schleuse 100 IE pro kg KG Heparin zur Antikoagulation.

Zusätzlich wurde mit einer einmaligen i.v.-Gabe von Cephazolin (50 mg pro kg KG) eine Antibiotikum-Prophylaxe durchgeführt.

Ebenso erhielten die Tiere eine einmalige intrakoronare Gabe von Glycerolnitrat (0,2-0,3 mg) bei der intrakoronaren Ultraschalluntersuchung zur Vermeidung von Koronarspasmen.

Wirkstoff	Dosierung	Applikation	Zeitpunkt
Azaperon	80 mg/kg KG	intramuskulär	Prämedikation
Lidocain	30 mg	lokale Infiltration	Prämedikation
Heparin	100 IE/kg KG	intravenös	einmalige Prophylaxe
Cephazolin	50 mg/kg KG	intravenös	einmalige Prophylaxe
Midazolam	0,1 mg/kg KG	intravenös	Narkoseeinleitung
Ketamin	1 mg/kg KG	intravenös	Narkoseeinleitung
Isofloran	2%	inhalativ	Narkose
Propofol	1 mg/kg KG	intravenös	Narkose
Glycerolnitrat	0,2-0,3 mg	intrakoronar	vor Intervention
ASS	100 mg/Tag	per os	post OP bis Ende des
			Tierversuchs

# Tabelle 1: Applizierte Medikamente

#### 2.3.4 Angiographie und intrakoronarer Ultraschall

Bei allen Versuchstieren wurden vor der Kryoapplikation sowohl die rechte als auch die linke Koronararterie mittels eines Angiographiekatheters (4 F Amplatzer oder 4 F Judkins, Cordis, Roden, Niederlande) selektiv dargestellt. Das mobile Röntgengerät (BV Pulsera, Firma Phillips, Amsterdam, Niederland) ermöglichte die Durchleuchtung. Die Röntgenaufnahmen (30° RAO und 60° LAO Projektion) wurden digital gespeichert. Sechs Monate nach Kryoapplikation wurden die Tiere nicht nur angiographisch, sondern auch mittels intrakoronarem Ultraschall (ICUS) untersucht. Dabei wurde ein 2,9 F großer Ultraschallkatheter (Jovus Avamar F/X, Volcano Therapeutics Inc., Brüssel, Belgien) genutzt. Über die *Arteria femoralis* oder *Arteria carotis* wurde die *Arteria coronaria dextra*, sowie der *Ramus circumflexus* der *Arteria coronaria sinistra* tief sondiert. Die gewonnenen angiographischen und sonographischen Daten wurden digital gespeichert und ausgewertet.

#### 2.3.5 Kryoapplikation

Nach den oben beschriebenen Untersuchungen wurde über die *Vena femoralis* ein Kryoablationskatheter in den rechten Vorhof geschoben.

Über diesen Katheter wurden jeweils sieben Kryoapplikationen entlang der atrioventrikularen Grube vorgenommen. Dies erfolgte unter Durchleuchtung über einen Anfrier-Auftau-Anfrier-Zyklus, wobei das Anfrieren bei -75° Celsius über eine Zeitspanne von jeweils 4 Minuten, und das Auftauen über eine Zeitspanne von einer Minute erfolgte.

Um eine exakte Lokalisation des zweiten Anfrierzyklus zu gewährleisen, wurde das realtime dreidimensionale Katheternavigationssystem LocaLisa<sup>®</sup> benutzt, welches eine Punktgenauigkeit von 1,4  $\pm$  1,1 mm innerhalb von zwei Stunden mittels eines stabilen Referenzkatheters erlaubt (Wittkampf et al. 1999).



Abbildung 2: Katheternavigation mittels LocaLisa®

Die Abbildung zeigt eine 3-dimensionale Animation des Katheternavigationssystems LocaLisa<sup>®</sup>. (links 60° RAO (rechts anterior oblique), rechts 30° LAO (links anterior oblique)). Die verschiedenfarbigen Punkte stellen die jeweiligen Kryoablationsloci dar (eigene Darstellung). Im rechten Vorhof wurden am atrialen Ansatz des lateralen Trikuspidalklappenanulus vier Applikationen gesetzt. Auf der linksatrialen Seite erfolgten drei Läsionen am ventralen Ansatz des lateralen Mitralklappenanulus.



Abbildung 3: Schemazeichnung der Läsionslokalisationen

Die roten Linien markieren die häufigste Lokalisation akzessorischer Leitungsbahnen bei Patienten mit WPW-Syndrom, die schwarzen Pfeile die angestrebten Kryoapplikationsorte (eigene Darstellung).

#### 2.3.6 Nachsorge

Nach Beendigung aller Untersuchungen und Interventionen wurden die Tiere nach Erreichen eines ausreichenden Wachheitszustandes extubiert und anschließend in der tierexperimentellen Abteilung überwacht.

Fünf randomisiert ausgesuchte Tiere wurden nach 48 Stunden erneut untersucht; diese Ergebnisse sind Teil einer anderen Arbeit. Die für diese Arbeit relevanten fünf Schweine wuchsen im Tiergut Holtensen artgerecht für weitere sechs Monate auf, erhielten täglich 100 mg Aspirin und kamen nach diesem halben Jahr zur erneuten Untersuchung.

#### **2.3.7 Nachuntersuchung**

Um im späteren Verlauf nach Kryoapplikationen auftretende Koronaraffektionen am wachsenden Herzen zu erfassen, wurden diese fünf Versuchstiere nach sechs Monaten erneut mit selektiver Koronarangiographie, intrakoronarer Ultraschalluntersuchung und programmierter Stimulation nachuntersucht. Die Durchführung erfolgte nach dem oben ausführlich beschriebenen Vorgehen.

Anschließend erfolgte in tiefer Allgemeinnarkose die Entnahme der Herzen zur makroskopischen und mikroskopischen Aufbereitung.

## 2.4 Aufbereitung und histologische Untersuchung

#### 2.4.1 Makroskopische Dokumentation

Zu Beginn wurden die Läsionen an der endokardialen Oberfläche vermessen, deren Ausdehnung dokumentiert und die Herzen auf eventuelle Verletzungen untersucht. Die Läsionen mitsamt des umgebenden Gewebes (Vorhof, Ventrikel und AV-Grube) und anheftender Koronaratterien wurden aus dem Herzen herauspräpariert und alle Läsionen wurden photographisch dokumentiert.

Nach der Entnahme der Schweineherzen wurden die mit bloßem Auge sichtbaren Läsionen aufgesucht, vermessen und in passenden Zuschnitten mitsamt der AV-Grube und der Koronararterie herauspräpariert. Dabei wurde jede Läsion photographisch dokumentiert.







#### Abbildung 4 a-c: Makroskopische Aufnahmen einer atrialen Kryoläsion

Die Bilder zeigen eine atrial lokalisierte Kryoläsion (gelbe Markierung). Abbildung 4a zeigt die Läsion am vollständigen herauspräparierten Herzen. In den Abbildungen 4b und 4c ist die Läsion bereits aus dem Atrium herauspräpariert und wird in Folge als Block zugeschnitten, um die Histologiepräparate anzufertigen.

#### 2.4.2 Histologie

Die Läsionen wurden nun mit umgebendem Gewebe und Koronararterie in 10% Formalinlösung fixiert und diese Gewebeblöcke 48 Stunden in Paraffin eingebettet.

Anschließend wurden die einzelnen Läsionen in ihrer gesamten Ausdehnung in seriellen Längsschnitten mit einer Schichtdicke von 5 µm aufgearbeitet. Je nach Größe der Läsion, ergab sich daraus eine Gesamtzahl von ca. 1000 Schnitten bei der kleinsten Läsion und ca. 4200 Schnitten bei der größten Läsion, sodass sich durchschnittlich annähernd 3000 Schnitte pro Läsion ergaben.

Von den angefertigten mikroskopischen Präparaten wurde jeder 40. Schnitt mit H.E.-Färbung und der jeweils benachbarte Schnitt mit EvG-Färbung bearbeitet. Von den gesamten Schnitten einer Läsion wurden auch in größeren Abständen Präparate mit Desmin gefärbt.

Für diese Arbeit erwiesen sich die EvG-Schnitte als am besten verwertbar, so dass die H.E.gefärbten Schnitte, sowie die seltenen Desmin-Schnitte nur teilweise zur Überprüfung und Kontrolle der korrekten Lokalisation der Läsion vergleichend herangezogen wurden.

Die Präparate in dieser Untersuchungsreihe wurden mit verschiedenen Färbetechniken zur mikroskopischen Aufarbeitung vorbereitet. Hierzu wurden die Histologieschnitte vorerst mittels absteigender Alkoholreihe schrittweise entparaffiniert.

Anzahl	Substanz	Zeit
3x	Xylol	8 Min. je
2x	100% Alkohol	5 Min. je
1x	96% Alkohol	5 Min.
1x	70% Alkohol	5 Min.
1x	50% Alkohol	5 Min.
1x	30% Alkohol	5 Min.
1x	entionisiert H2O	5 Min.

Tabelle 2: Arbeitsschritte der Alkoholfixierung

Die für die vorliegende Arbeit relevanten Färbungen waren die Elastica-van-Gieson (E.v.G.), die Hämatoxylin-Eosin (H.E.) und die immunhistochemische Desmin-Färbung.

Die Elastica-van-Gieson-Färbung ist eine der wichtigsten histologischen Färbetechniken, die Bindegewebe als insbesondere auch elastische Fasern darstellen kann, und war auch für die Präparate dieser Versuchsreihe von entscheidender Bedeutung.

Die Pikrofuchsinfärbung nach van Gieson, ergänzt durch die Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert ermöglicht eine gute Differenzierung zwischen Kernen, Bindegewebe, elastischen Fasern und Muskulatur.



## Abbildung 5: Elastica-van-Gieson-Färbung eines Myokardschnittes mit Kryoläsion

Das Bild zeigt einen E.v.G. angefärbten Histologieschnitt. Das atriale (A) und ventrikuläre (V) Myokard stellt sich hier rot-bräunlich dar.

Die Myokardstruktur wird im Bereich der Läsion (gelbe Umrandung) unterbrochen und vom weiß-rötlich gefärbten Läsionsgewebe abgelöst.

#### Tabelle 3: Färbeprotokoll der Elastica-van-Gieson-Färbung

Anzahl	Substanz	Zeit
1x	Elastin nach Weigert	10 Min.
1x	fließendes Leitungs-	1 Min.
	wasser	
1x	Weigert A&B 1:1	5 Min.
1x	fließendes Leitungs-	1 Min.
	wasser	
1x	Pikrofuchsin-Lösung	2 Min.
1x	70% Alkohol	1 Min.
2x	96% Alkohol	1 Min. je
2x	100% Alkohol	2 Min. je
3x	Xylol	3 Min. je

Bei den mit Hämatoxylin-Eosin-Farbstoffen (H.E.) angefertigten Präparaten färben sich die Zellkerne blau, das Zellplasma blassrosa und das Muskelgewebe sowie die Erythrozyten rot an.



### Abbildung 6: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Myokardschnittes mit Kryoläsion

Das Bild zeigt einen H.E.-gefärbten Histologieschnitt. Das intakte atriale Myokard (A) stellt sich rötlich dar. Im Bereich der Läsion (gelbe Umrandung) ist das Gewebe weiß-rosa gefärbt. Die Wandstruktur der rechten Koronararterie (RCA) stellt sich ebenfalls rötlich dar.

Tabelle 4: Färbeprotokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Anzahl	Substanz	Zeit
3x	Hämalaun	3 Min. je
1x	fließendes Leitungs- wasser	6 Min.
1x	entionisiert H <sub>2</sub> O	2 Min.
2x	Eosin	2 Min. je
1x	entionisiert H <sub>2</sub> O	Spülen
1x	96% Alkohol	1 Min. je
2x	100% Alkohol	2 Min. je
3x	Xylol	3 Min. je

Die für den Einsatz in der Immunhistochemie an formalinfixierten Paraffinschnitten bestimmte Desmin-Färbung ermöglicht eine gute Darstellung der gesetzten Kryoläsionen. Desmin, ein Intermediärfilament-Protein der glatten und quergestreiften Muskulatur, ist durch die Färbung der Z-Linie ein spezifischer Marker für intakte Muskelzellen, somit auch für Herzmuskelzellen. Der Verlust der Desmin-Färbung kennzeichnet deutlich die geschädigten Herzmuskelzellen und ermöglicht das differenzierte Erkennen der durch den Kryoenergiereiz entstandenen Verletzung. Die bei der Färbung verwendeten Mausantikörper dienen zur Lokalisation von Desmin.



## Abbildung 7: Desmin-Färbung eines Myokardschnittes mit Kryoläsion

Desmin-angefärbter Histologieschnitt. Man erkennt deutlich, wie das braünlich gefärbte Ventrikelmyokard durch die Läsion (gelbe Umrandung) unterbrochen wird.
	Target Retrieval Puffer high pH		
Vorbehandlung	aus Kit Flex (50x) DAKO K8004		
	Inkubation im Dampfkochtopf 90°C 20 Min.		
Waschen	5 x 2 Min. TTBS (Tris-Puffer-Lösung)		
Blocken d. endogenen Per-	DAKO Derevidere Diesking Descent \$2022		
oxidase	DARO Feloxidase Blocking Reagent 52025		
Inkubation	Raumtemperatur 17 Min.		
Waschen	5 x 2 Min. TTBS (= TBS + 0,1 % Tween)		
Inkubation mit AK-Diluent	Dako REAL Antibody Diluent S2022 30 Min.		
	Desmin, D9 Mouse monoclonal IgG Progen No.		
1 Antikörner	10519		
1. Antikorper	Verd. (Verdünnung) 1:50 (2 µl AK + 98 µl AK Di-		
	luent)		
Inkubation	4°C über Nacht		
Waschen	5 x 2 Min. TTBS		
2 Antikörner	Rabbit Anti Mouse Immunglobulin DAKO P0260		
2. Antikorper	Verd. 1:100 (1 µl AK + 99 µl AK Diluent)		
Inkubation	Raumtemperatur 60 Min.		
Waschen	5 x 2 Min. TTBS		
	DAB Substrat Kit Zytomed DAB5000plus frisch an-		
Substrat-Chromogensystem	setzen:		
Substrat Chromogensystem	Verd. 1:20 (50 µl Chromogen + 1000 µl Substrat)		
	Inkubation 5 – 30 Min. unter Mikroskopkontrolle		
Waschen	4 x 1 Min. A.dest. 1 x 5 Min. A.dest.		
	2 x 1,5 Min. Hämalaun		
Gegenfärbung	7 Min. fließendes Leitungswasser (lauwarm)		
	(Vorsicht bei Kernfärbung wird leicht überdeckt!)		
	1 x 1 Min. 96% Alkohol		
Entwässerung	2 x 2 Min. 100% Alkohol		
Linewassorality	1 x 3 Min. Xylol		
	eindecken mit Entellan Merck 1.07961.0100		

## Tabelle 5: Färbeprotokoll der Desmin-Färbung

## 2.5 Planimetrie und Volumetrie

Zum Einscannen der so bearbeiteten Histologie-Präparate wurde das digitale Mikroskopiersystem dotSlide SL der Firma Olympus genutzt. Dieses System besteht aus abgestimmten Komponenten, dem Olympus-Mikroskop BX51, einem automatischen Slide-Loader, einer integrierten Peltier-gekühlten dot-Slide-Kamera und der PC-basierten Workstation. Dies ermöglicht es, die erzeugten virtuellen Slides so zu untersuchen, wie ein Präparat auf einem üblichen Mikroskopiertisch. Je zehn Präparate werden auf ein Tablett sortiert. Dabei können fünf Tabletts pro Scanvorgang beladen werden, von dem der Slide-Loader die Präparate einzeln per Ansaugvorrichtung und Roboterarm dem Objektträger zuführt. Die von der Kamera erzeugten Bilder haben mit 1379x1032 Pixeln durch die hohe Auflösung eine große Schärfe und hervorragende Detailgenauigkeit. Dadurch konnte man die Läsionen du in starker Vergrößerung ohne Bildqualitätsverlust betrachten.

Die so ermittelten Metadaten der Präparate wurden der Bildverarbeitungssoftware (DP-Soft Archivierungssoftware F DP 10, Olympus) zugeführt und konnten dadurch in ihrer maximalen Ausdehnung mittels Planimetrie bestimmt werden. Auf diese Weise kam jeder 40. Schnitt einer Läsion zur Erfassung.

Nach dem Vergleich aller Bilder einer Läsion und der Zuordnung der dargestellten Strukturen zu der korrespondierenden Läsion wurde diese mittels des Systemtools Closed-Polygon an ihrer äußeren Begrenzung markiert. Dadurch wird automatisch der Flächeninhalt des markierten Bereichs berechnet.

Die sich aus allen so bearbeiteten Präparaten ergebenden Flächeninhalte der einzelnen Läsion wurden in eine Exceldatei übertragen und summiert. Die Summe wurde mit der Schichtdicke (200  $\mu$ m [berechnet aus der Schnittdicke von 5  $\mu$ m multipliziert mit 40, da nur jeder 40. Schnitt vermessen wurde]) multipliziert (Formel  $\Sigma i=(Fläche_i \times Tiefe_i))$ , wobei das i in der Formel für die Anzahl der Schnitte der jeweiligen Läsion steht. Daraus ergab sich das Volumen der Läsion.

Von jeder einzelnen Läsion wurde das Präparat, bei dem die maximale Tiefe ermittelt wurde, herausselektiert und dieser Wert gesondert gespeichert.

## 2.6 Statistische Auswertung

Die berechneten Volumina und weitesten Tiefen wurden in eine Tabelle übertragen und statistisch ausgewertet. Dabei wurde zwischen atrialen und ventrikulären Läsionen unterschieden. Läsionen, die sich nicht eindeutig zuordnen oder exakt vermessen ließen, wurden verworfen und kamen nicht zur statistischen Auswertung.

Sowohl von den atrialen als auch von den ventrikulären Läsionen wurden jeweils das arithmetrische Mittel, der Medianwert, die Spannweite, die Varianz und die Standardabweichung des Mittelwertes berechnet.

Um die verschiedenen Ergebnisse untereinander zu vergleichen, kamen zwei unterschiedliche Testverfahren zur Anwendung. Zur Prüfung, ob sich die atrialen und ventrikulären Läsionen in Volumen und Tiefe signifikant unterschieden, wurde der T-Test für unabhängige Stichproben zur Hilfe genommen. Um zu ermitteln, ob bei den Thrombusformationen und der transmuralen Ausdehnung ein Zusammenhang mit der jeweiligen Läsionslokalisation im Vorhof bzw. Ventrikel bestand, wurde der  $\chi^2$ -Test verwendet. Als Wert für die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde bei beiden Tests ein Wert von 0,05 gewählt.

## **3 ERGEBNISSE**

## 3.1 Kryoapplikation und bildgebende Verfahren

Während der Kryoapplikation kam es bei keinem der Tiere zu EKG-Veränderungen, Herzrhythmusstörungen oder Zeichen einer Myokardischämie.

Bei allen Tieren konnte die Koronarangiographie vor Kryoapplikation und sechs Monate nach Kryoapplikation erfolgreich und ohne Komplikationen durchgeführt werden.

Die intrakoronare Ultraschalluntersuchung der rechten Koronararterie und des *Ramus circumflexus* konnte ebenfalls bei allen fünf Schweinen komplikationslos nach Gabe von Heparin und Nitroglycerin durchgeführt werden.

## 3.1.1 Koronarangiographie

Die koronarangiographischen Untersuchungen wurden bei allen fünf Tieren erfolgreich durchgeführt. Bei den Untersuchungen wurde insbesondere auf eventuelle Stenosen und auf Wandunregelmäßigkeiten der Koronararterien geachtet (Abbildung 8 und 9).



Abbildung 8 a,b: Koronarangiographie der linken Koronararterie

Die linke Koronararterie zweigt sich in den *Ramus circumflexus* (RCX, schwarzer Pfeil) und den *Ramus interventrikularis anterior* (RIVA, weißer Pfeil) auf (Projektionsebene a: 60° LAO, b: 30° RAO). Sechs Monate nach Kryoapplikation sind regelrechte Gefäßverläufe zu erkennen und es zeigen sich keine Hinweise auf Arterienwandproliferation, Thrombusformation, Plaquebildung oder andere stenosierende Lumeneinengungen.



Abbildung 9 a,b: Koronarangiographie der rechten Koronararterie

Die rechte Koronararterie (Pfeile) sechs Monate nach Kryoapplikation (Projektionsebene a: 60° LAO, b: 30° RAO) zeigt einen physiologischen Gefäßverlauf ohne Hinweise auf Arterienwandproliferation, Thrombusformation, Plaquebildung oder andere stenosierende Prozesse.

Bei keiner der durchgeführten Untersuchungen konnten Stenosen, Thrombosen, Plaqueformation, intimale Proliferation oder andere pathologische Gefäßveränderungen angiographisch festgestellt werden.

#### 3.1.2 Intrakoronare Ultraschalluntersuchung

Die Intaktheit der Gefäße und die Homogenität des umgebenden Gewebes wurden mittels ICUS untersucht. Bei den untersuchten Tieren fanden sich keine erkennbaren Signalverstärkungen oder Zeichen von Plaques, Stenosen, intimaler Proliferation, Verkalkungen oder von anderen pathologischen Auffälligkeiten (Abbildung 10).



Abbildung 10: Darstellung der rechten Koronararterie sechs Monate nach doppelter Kryoapplikation durch ICUS im Querschnitt

Mittig ist die Ultraschallsonde innerhalb des Lumens der RCA (rechte Koronararterie) zu erkennen (Pfeil). Sie liegt der Gefäßwand im blutgefüllten Lumen (schwarz) superior an. Die innere Gefäßwand stellt sich zirkumferentiell regelmäßig dar, ohne Anhalt für Proliferationen, Plaque oder Stenosen. Insbesondere weist die Intima keine Thromben oder Verdickungen auf.

## 3.2 Makroskopie der Kryoläsionen

Die einzelnen Kryoläsionen imponierten makroskopisch als gut erkennbare weiße Bezirke mit glatter Oberflächenstruktur, die an ihren Grenzen einen relativ scharfen Übergang ins umliegende vitale Gewebe zeigten (Abbildung 11 und 12).







Abbildung 11 a-c: Läsionsmorphologie

Die Kryoläsion zeigt sich in Abbildung 11a als weißer Bezirk innerhalb des herauspräparierten Herzens. In Abbildung 11b ist selbige Läsion zu einem Block in Paraffin zurechtgeschnitten.

Abbildung 11c zeigt einen Histologieschnitt der Läsion (E.v.G.-Färbung). Man erkennt sie als rotweißlich gefärbten Bereich (gelbe Umrandung) innerhalb des braunen Myokardgewebes entlang der AV-Grube. In der oberen Bildhälfte ist die rechte Koronararterie (RCA) zu sehen. Es sind keine Auffälligkeiten der Wandschichten zu erkennen.

A = Atrium, V = Ventrikel, TK = Trikuspidalklappe, RCA = rechte Koronararterie, AV = Atrioventrikular

Es konnte bei 14 der 29 Läsionen eine transmurale Ausdehnung beobachtet werden (48%). Bei den atrialen Läsionen waren zwölf der insgesamt 16 Läsionen transmural ausgedehnt (75%), bei den ventrikulären Läsionen waren es zwei der insgesamt 13 Läsionen (15%).

Einige der Läsionen waren bereits makroskopisch als transmural erkennbar.



Abbildung 12 a,b: Präparat einer transmuralen atrialen Kryoläsion

Die Kryoläsion (gelbe Umrandung) lässt sich makroskopisch als weißer, scharf abgegrenzter Bereich innerhalb des bräunlichen Myokardgewebes abgrenzen. Abbildung a zeigt die Läsion von endokardial, Bild b von epikardial.

## 3.3 Mikroskopie

Es konnten von den insgesamt 35 applizierten Läsionen 29 Läsionen (82%) ausgewertet werden. Die fehlenden Läsionen waren aufgrund technischer Probleme und Verletzungen während der Präparation nicht mikroskopisch verwertbar.

#### 3.3.1 Histologische Auffälligkeiten

Die Präparate wurden auf mögliche histologische Auffälligkeiten untersucht. Dabei standen neben den Läsionen selbst insbesondere die Koronararterien und ihre eventuellen pathologischen Veränderungen im Fokus der Betrachtung.

## 3.3.1.1 Histologische Untersuchung der Koronargefäße

Bei den meisten Präparaten stellten sich die Koronargefäße ohne pathologische Besonderheiten dar (Abbildungen 13 bis 16).



## Abbildung 13: Atriale Kryoläsion mit unauffälliger Koronararterie

Im oberen Bildbereich dieses E.v.G.-gefärbten Schnittes erkennt man das atriale Myokard (A) mit der dazugehörigen Läsion (gelbe Umrandung). Die Läsion besteht aus bindegewebiger Vernarbung und beim Übergang ins epikardiale Fettgewebe der AV-Grube zunehmend aus Fettzellen. Im Bildbereich ist das unteren Ventrikelmyokard (V) zu sehen. Dazwischen liegt in der AV-Grube die rechte Koronararterie (RCA).



## Abbildung 14: Vergrößerung der Koronararterie aus Abbildung 13

In der Vergrößerung erkennt man einen unauffälligen Wandaufbau der RCA, bestehend aus *Tunica intima*, *Tunica media* und *Tunica adventitia*. Keine der Schichten zeigt eine auffällige Verdickung oder Unregelmäßigkeit. Auch das Lumen der Arterie ist nicht pathologisch verengt.





## Abbildung 15: Ventrikuläre Kryoläsion mit unauffälliger Koronararterie

Im gelb eingerahmten Bezirk ist eine E.v.G.-gefärbte Kryoläsion im Bereich des Ventrikelmyokards (V) zu erkennen. Die Läsion besteht überwiegend aus dichter bindegewebiger Vernarbung. Das atriale Myokard (A) sieht man im oberen Bildbereich. Die rechte Koronararterie (RCA) liegt zwischen dem Myokard in der AV-Grube. Links von der Arterie liegt eine Koronarvene, beide Gefäße zeigen keine Stenose.

## Abbildung 16: Vergrößerung der Koronararterie aus Abbildung 15

Auch in der Bildvergrößerung erkennt man bei keiner der drei Wandschichten eine Verdickung. Das Koronarlumen ist ebenfalls nicht verengt, die *Tunica intima* ist einschichtig und intakt.

Bei einigen Schnitten fiel auf, dass die Wände der Koronarien, auf der zur Läsion zeigenden Seite verdickt waren. Zum großen Teil zeigten sich diese Verdickungen im Bereich der *Tunica adventitia* (Abbildungen 17 und 18), es gab jedoch auch Präparate, die eine Mediaverdickung aufzeigten (Abbildungen 19 und 20). Der Wandverdickung lag eine Proliferation des jeweiligen Gewebes zugrunde. In zwei Fällen war die *Tunica intima* ebenfalls proliferiert, die *Lamina elastica interna* blieb jedoch bei allen Kryoläsionen intakt (Abbildung 21 und 22). Dies führte in keinem Fall zu einer signifikanten Stenosierung der jeweiligen Koronararterie.



## Abbildung 17: Ventrikuläre Kryoläsion mit Koronararterienveränderung

E.v.G.-Färbung einer Kryoläsion mit einer Koronarie, welche auf der Seite der Läsion Umrandung) eine deutliche (gelbe Verdickung der Tunica adventitia (weißer Pfeil) aufweist. Am Rande der Tunica adventitia ist eine Neovaskularisation (schwarzer Pfeil) zu beobachten. Diese Neovaskularisation liegt vereinzelt auch im Läsionsbereich vor (schwarze Pfeile). Die Kryoläsion besteht im Bereich der Oberfläche vor allem aus bindegewebigen Anteilen und geht dann ins epikardiale Fettgewebe über.

## Abbildung 18: Vergrößerung der Koronararterie aus Abbildung 17

In der Bildvergrößerung erkennt man noch eindeutiger die verdickte *Tunica adventita* und die prominenten Neovaskularisationen (Pfeile) auf der läsionszugewandten Seite der Arterie. Die *Tunica media* und *intima* sind nicht verdickt.



## Abbildung 19: Koronararterie mit Verdickung von zwei Wandschichten

E.v.G.-Färbung einer atrialen Kryoläsion (gelbe Markierung).

Die Läsion geht vom atrialen Myokard (A) ins epikardiale Fettgewebe der AV-Grube über. Auf der zur Läsion zeigenden Seite ist eine Verdickung von zwei Wandschichten der rechten Koronararterie zu sehen (Pfeil).



Abbildung 20 a,b: Vergrößerung der Koronararterie aus Abbildung 19

Die Vergrößerung zeigt die Koronararterie mit deutlicher Verdickung der *Tunica media* und nur geringer Verdickung der *Tunica adventitia*. Die pathologischen Veränderungen zeigen sich nur auf der Seite, die zur Läsion zeigt. Die *Tunica intima* ist intakt und besteht aus einer Zellschicht.



# Abbildung 21: Atriale Kryoläsion mit Verdickung aller drei Arterienwandschichten

Bei dieser E.v.G.-gefärbten atrialen Kryoläsion besteht eine deutliche Verdickung aller drei Wandschichten der rechten Koronararterie auf der läsionszugewandten Seite (Pfeil).



Abbildung 22 a,b: Vergrößerung der Koronararterie aus Abbildung 21

In der Vergrößerung ist neben der Verdickung der *Tunica adventitia* und der *Tunica media* auch die *Tunica intima* betroffen. Die geringe Verdickung besteht aus mehreren Schichten Endothel. Jedoch ist die *Lamina elastica* (schwarz) intakt.

Eine der 29 Läsionen wies einen kleinen intrakoronaren Thrombus auf. Die betroffene rechte Koronararterie wies eine Proliferation aller drei Wandschichten auf. Der Thrombus liegt den proliferierten Endothelschichten auf. Zudem ist der Thrombus bereits organisiert, bestehend auch aus fibrösem Gewebe mit einer glatten Oberfläche. Dieses impliziert, dass es sich nicht um einen frischen Thrombus handelt und somit kein postmortem Phänomen darstellt. Intravenöse oder endokardiale Thromben wurden nicht gefunden.



## Abbildung 23: Ventrikulären Kryoläsion mit intrakoronarem Thrombus

Bei dieser E.v.G.-Färbung einer ventrikulären Läsion (gelbe Markierung) ist ein kleiner Thrombus innerhalb des Lumens der rechten Koronararterie zu erkennen (Pfeil). Dieser liegt der *Tunica intima* an. Zudem sind alle drei Wandschichten leicht proliferiert. Die Kryoläsion erstreckt sich bis in das epikardiale Fettgewebe und erreicht die rechte Koronarie.



Abbildung 24 a,b: Vergrößerung der Koronararterie aus Abbildung 23

In der Vergrößerung ist zu erkennen, dass der Thrombus innerhalb der Koronararterie bereits organisiertes Gewebe aufweist. Zur Lumenseite weist der Thrombus bereits glattbegrenztes fibrosiertes Gewebe auf. Intimawärts zeigen sich thrombotisch organisierte Erythrozyten. Es ist auffällig, dass der Thrombus der proliferierten Seite des Endothels aufliegt. Zudem ist auch die *Tunica media* läsionswärts durch Proliferation der glatten Muskelzellen, jedoch erhaltener Ultrastruktur verdickt. Auch bei dieser Läsion sind alle drei Wandschichten der Koronararterie verdickt. Es finden sich ebenfalls Gefäßneubildungen im Läsionsbereich.

## 3.3.1.2 Morphologische Auffälligkeiten der Kryoläsionen

In der Histologie stellten sich die Läsionen morphologisch als relativ scharf begrenzte, gut erkennbare Bereiche dar, die in manchen Läsionen jedoch strähnig ins umgebende Muskelgewebe übergingen. Die Kryoläsionen bestanden vorwiegend aus Bindegewebe und Fettzellen, in der Regel war die endokardiale Oberfläche intakt. Als Besonderheit fand man in drei Läsionen Inseln aus erhaltenem muskulären Gewebe.





## Abbildung 25: Ventrikuläre Kryoläsion mit muskulärem Gewebseinschluss

Innerhalb dieser E.v.G.-gefärbten bindegewebigen und fetthaltigen Kryoläsion (gelbe Umrandung) am ventrikulären AV-Klappenanulus erkennt man eine kleine Insel aus muskulärem Gewebe. Die Läsion geht bindegewebig strähnig ins intakte Ventrikelmyokard über. Sie zeigt keinen direkten Kontakt zur Oberfläche, das Endokard ist intakt und einzellig.

## Abbildung 26: Vergrößerung der Kryoläsion aus Abbildung 25

In der Vergrößerung erkennt man deutlich den Bereich aus intakten Myozyten, eingeschlossen von Läsionsgewebe.

Deutlich sichtbar sind auch die sich weiß darstellenden Fettzellen innerhalb der Läsion. Innerhalb von vier vetrikulären Läsionen beobachteten wir knorpelige Bereiche, welche sich scharf vom umliegenden Läsionsgewebe abgrenzten.



## Abbildung 27: Knorpelformation innerhalb einer ventrikulären Kryoläsion

Die Abbildung zeigt eine E.v.G. Färbung einer ventrikulären Läsion. Innerhalb dieser Läsion (gelbe Umrandung) befinden sich Bereiche aus Chondrozyten (Pfeile). Das Umgebende intakte Myokardgewebe ist frei von Knorpelgewebe. Die naheliegende Koronararterie und -vene sind intakt.



## Abbildung 28: Vergrößerung des Läsionsbereiches aus Abbildung 27

In der Vergrößerung erkennt man die sich dunkel darstellenden Chrondrozyten. Die knorpeligen Bereiche grenzen sich scharf vom umliegenden überwiegend fibrösen Läsionsgewebe ab.

Auffällig war ebenfalls, dass in vielen histologischen Schnitten innerhalb der Läsionen kleine Gefäße zu finden waren. Solche Gefäßproliferationen konnten sonst weder im muskulären Bereich um die Läsionen gefunden werden, noch im Myokard unbehandelter Kontrolltiere. Diese Gefäße zeichnen sich durch eine auffällig dicke *Tunica media* auf.



## Abbildung 29: Gefäßproliferation innerhalb einer atrialen Kryoläsion

E.v.G.-Färbung einer atrialen Kryoläsion am AV-Klappenring. Im Läsionsbereich sind mehrere kleine, dickwandige Gefäße zu sehen (Pfeile). Im intakten Bereich der AV-Grube und des Myokardgewebes sind diese Gefäßformationen nicht vorhanden.



## Abbildung 30: Vergrößerung des Läsionsbereiches aus Abbildung 29

In der Vergrößerung erkennt man, dass besonders die *Tunica media* und die *Tunica adventitia* der neugebildeten Gefäße verdickt sind. Die *Tunica intima* ist jedoch regulär einzellig. Die Gefäße befinden sich innerhalb vom Binde- und Fettgewebe der Läsion.

Insgesamt zeigte sich bei einer der 29 Läsionen eine intrakoronare Thrombusformation. Geringfügige Veränderungen der koronaren Gefäßwände konnten in acht der 29 Läsionen gefunden werden. Bei zwei Läsionen waren alle Wandschichten betroffen. Der Stenosierungsgrad betrug jedoch in keinem Fall mehr als 20%. Knorpelige Bereiche fielen bei vier der 29 Läsionen auf, Muskelresiduen wurden in drei der 29 Läsionen gefunden. Die häufigste Auffälligkeit war das Auftreten von Gefäßproliferationen innerhalb der Läsionen. Dies zeigte sich bei 16 der 29 Läsionen. Neun der betroffenen Läsionen waren am atrialen AV-Klappen anulus lokalisiert, sieben am ventrikulären. Eine signifikante Abhängigkeit des Auftetens der Veränderung von der Lokalisation der Läsionen zu finden. Alle anderen Auffälligkeiten waren nicht signifikant abhängig von der Lokalisation im Vorhof oder Ventrikel.

	Atrial	Ventrikulär	Gesamt	X <sup>2</sup> - Test	Signifikanz
Thrombusformation	0/16	1/13	1/29	0,84	nicht signifikant
Knorpel	0/16	4/13	4/29	5,71	signifikant
Muskelresiduen innerhalb der Läsion	1/16	2/13	3/29	0,65	nicht signifikant
Koronarveränderungen	6/16	2/13	8/29	1,76	nicht signifikant
Gefäßproliferation	9/16	7/13	16/29	0,02	nicht signifikant

Tabelle 6: Häufigkeit und Lokalisation der morphologischen Auffälligkeiten

Die Tabelle stellt das Auftreten der im oberen Abschnitt aufgezählten Auffälligkeiten in Abhängigkeit von der Läsionslokalisation dar.

#### 3.3.2 Volumetrie

### 3.3.2.1 Atriale Läsionen

Von den 29 Läsionen befanden sich 16 Läsionen im Vorhofmyokard.

Die folgende Tabelle (Tabelle 7) führt die Messergebnisse der atrialen Läsionen im einzelnen auf:

Läsionsnummer	Volumen in mm <sup>3</sup>	Maximale Tiefe in mm
1	250,59	2,70
2	249,50	2,98
3	203,73	3,76
4	70,65	1,81
5	198,29	3,90
6	116,65	3,35
7	190,35	4,42
8	155,49	4,91
9	272,85	4,42
10	135,20	2,69
11	131,12	3,63
12	235,64	4,11
13	149,94	3,53
14	39,08	3,40
15	149,95	3,53
16	235,64	4,11

Tabelle 7: Läsionsausdehnung der atrialen Kryoläsionen

Tabellarische Auflistung der gemessenen Ergebnisse der Volumetrie der 16 atrialen Kryoläsionen sechs Monate nach doppelter Kryoapplikation

Das mittlere Volumen aller atrialer Läsionen betrug 174,04 mm<sup>3</sup>, die Standardabweichung des Mittelwerts ergab einen Wert von 67,18 mm<sup>3</sup>.

Der minimale Wert betrug 39,08 mm<sup>3</sup> und der maximale Wert 272,85 mm<sup>3</sup>. Es wurde als Median ein Wert von 172,92 mm<sup>3</sup> berechnet.

Aus den einzelnen Werten der maximalen Tiefe der Läsionen ergab sich ein arithmetisches Mittel von 3,58 mm. Als Standardabweichung des Mittelwerts wurde ein Wert von 0,78 mm berechnet.

Der Median lag ebenfalls bei 3,58 mm. Der Minimalwert der Tiefenausdehnung lag bei 1,81 mm, der Maximalwert bei 4,91 mm.

Tabelle	8: Statistische	Auswertung der	Ausdehnung der	r atrialen K	ryoläsionen
		0	0		•

	Volumen in mm <sup>3</sup>	Maximale Tiefe in mm
Minimum	39,08	1,81
Maximum	272,85	4,91
Median	172,92	3,58
Arithmetisches Mittel	174,04	3,58
Standardabweichung	67,18	0,78

Überblick über Minimalwert, Maximalwert, arithmetisches Mittel und Standardabweichung der Volumina und Tiefen der atrialen Kryoläsionen

## 3.3.2.2 Ventrikuläre Läsionen

Von den insgesamt 29 Läsionen befanden sich 13 im Ventrikelmyokard.

Die Messergebnisse für die einzelnen ventrikulären Läsionen können aus der folgenden Tabelle (Tabelle 9) ersehen werden:

Läsion	Volumen in mm <sup>3</sup>	Maximale Tiefe in mm
1	260,59	7,37
2	264,55	4,24
3	514,43	3,64
4	270,38	5,08
5	150,01	3,48
6	107,59	4,05
7	164,33	3,60
8	121,08	4,59
9	233,06	5,39
10	173,09	4,80
11	178,44	4,19
12	368,46	4,02
13	297,00	5,39

Tabellarische Auflistung der gemessenen Ergebnisse der Volumetrie der 13 ventrikulären Kryoläsionen sechs Monate nach doppelter Kryoapplikation

Bei den ventrikulären Läsionen betrug der arithmetische Mittelwert der Volumina 238,69 mm<sup>3</sup>, bei einem Minimalwert von 107,59 mm<sup>3</sup> und einem Maximalwert von 514,43 mm<sup>3</sup>. Der Wert für die Standardabweichung des Mittelwertes war 112,1 mm<sup>3</sup>.

Als Median fand sich ein Wert von 233,06 mm<sup>3</sup>.

Aus der Berechnung der Ergebnisse der maximalen Tiefe der ergab sich ein arithmetrisches Mittel von 4,60 mm. Die Standardabweichung des Mittelwertes wies hier einen Wert von 1,05 mm auf.

Der Median betrug 4,24 mm, bei einem Minimalwert der Tiefe von 3,48 mm und einem Maximalwert von 7,37 mm.

	Volumen in mm <sup>3</sup>	Maximale Tiefe in mm
Minimum	107,59	3,48
Maximum	514,43	7,37
Median	233,06	4,24
Arithmetisches Mittel	238,69	4,60
Standardabweichung	112,10	1,05

## Tabelle 9: Statistische Auswertung der Ausdehnung der ventrikulären Kryoläsionen

Überblick über Minimalwert, Maximalwert, arithmetisches Mittel und Standardabweichung der Volumina und Tiefen der ventrikulären Kryoläsionen

## 3.3.2.3 Statistische Analyse

Im Folgenden werden die Einzelergebnisse von Volumen- und Tiefenausdehnung der atrialen und ventrikulären Läsionen aufgeführt und verglichen.

Abbildung 31 und 32 veranschaulichen graphisch die Unterschiede der Volumina der Kryoläsionen zwischen atrialer und ventrikulärer Läsionslokalisation. Die blauen Rechtecke zeigen das zweite und dritte Quartil an. Die Antennen veranschaulichen das obere und untere Quartil mit den Extremwerten am Antennenende. Die jeweils horizontalen Linie innerhalb der blauen Rechtecke zeigt den Median an. Auf der y-Achse sind die Werte der Volumenbzw. Tiefenausdehnung in mm bzw mm<sup>3</sup> angegeben.

Die Tabelle unterhalb der Boxplott Darstellungen (Tabelle 11) führt die Ergebnissen der statistischen Analyse auf.



## Abbildung 31: Boxplott-Darstellung der Volumina sechs Monate nach doppelter Kryoapplikation

Auf dieser Abbildung ist zu erkennen, dass die ventrikulären Läsionsvolumina größer als die atrialen Läsionen sind. Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.



## Abbildung 32: Boxplott-Darstellung der Tiefenausdehnung sechs Monate nach doppelter Kryoapplikation

Bei dieser Boxplott-Darstellung befinden sich die blauen Rechtecke auf unterschiedlicher Höhe und überschneiden sich kaum. Die Tiefenausdehnung der ventrikulären Kryoläsionen ist im Durchschnitt signifikant tiefer als die der atrialen Kryoläsionen. Die ventrikulär lokalisierten Kryoläsionsvolumina waren zwar größer als die atrial lokalisierten, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Die Läsionstiefe erwies sich bei den ventrikulären Läsionen als signifikant tiefer. Der  $\chi^2$ -Test zeigte, dass eine transmurale Ausdehnung signifikant häufiger bei den atrialen Läsionen auftrat als bei den ventrikulären.

Applikationsort	Volumon	Maximala Tiafa	Transmurala Ausdahnung
Applikationsoft	volumen	Maximale There	Transmurale Ausdennung
	mm <sup>3</sup>	mm	
Atriale Läsionen	$174,04 \pm 67,18$	$3{,}58\pm0{,}78$	12/16
n=16			
Ventrikuläre Läsio-	238,69 ±	$4,60 \pm 1,05$	2/13
nen, n=13	112,10		
Alle Läsionen n=29	203,02 ± 94,20	4,04 ± 1,03	14/29
Signifikanz	nicht	signifikant	signifikant
	signifikant		
p-Wert/χ <sup>2</sup> -Wert	p = 0,08	p = 0,01	χ²=10,20

 Tabelle 10: Statistischer Vergleich der Läsionsausdehnungen sechs Monate nach

 Kryoapplikation

Die Tabelle führt die Läsionsvolumina, die maximalen Tiefen, die transmurale Ausdehnung und das Auftreten von Thromben auf.

## 3.3.2.4 Vergleich mit Messergebnissen 48h nach Applikation

Im ersten Teil dieser Studie wurden die Herzen von fünf auf die gleiche Weise behandelten Schweinen 48 Stunden nach der Applikation morphologisch und planimetrisch untersucht. Um eine Größenzunahme im wachsenden Myokard zu untersuchen, wurden die Läsonsvolumina und maximalen Tiefen 48 Stunden und sechs Monate nach der Applikation verglichen.

	nach 48 Stunden	nach 6 Monaten	p-Wert	Signifikanz
Volumen atrial	$109,21 \pm 39,61$	$174,04 \pm 67,18$	0,003	signifikant
Volumen	$150,30 \pm 53,21$	$238,69 \pm 112,10$	0,019	signifikant
ventrikulär				
Volumen gesamt	$129,09 \pm 50,41$	$203,02 \pm 94,20$	0,001	signifikant
Tiefe atrial	$3,07 \pm 1,08$	$3,58 \pm 0,78$	0,140	nicht signifikant
Tiefe ventrikulär	$3,56 \pm 1,30$	$4,60 \pm 1,05$	0,019	signifikant
Tiefe gesamt	$3,20 \pm 1,20$	$4,04 \pm 1,03$	0,001	signifikant

 

 Tabelle 11: Vergleich der Läsionsausdehnung 48 Stunden und sechs Monate nach doppelter Kryoapplikation

Anhand der Tabelle lassen sich Volumen und Tiefenausdehnung der Kryoläsionen 48 Stunden und sechs Monate nach Applikation vergleichen. Die Signifikanz der Größenzunahme ist aufgeführt.

Es zeigte sich eine signifikant größere Ausdehnung des Volumens bei den nach sechs Monaten untersuchten Schweinen, sowohl im Vergleich der atrialen Läsionen untereinander, als auch der ventrikulären. Auch bei der Gesamtheit der Läsionen war ein signifikant größeres Volumen bei den nach sechs Monaten untersuchten Schweinen zu verzeichnen. Die Tiefenausdehnung der Läsionen ließ bei der Gesamtheit der Läsionen und bei den ventrikulären Läsionen eine signifikante Größenzunahme nach sechs Monaten erkennen. Allein die Tiefe der atrialen Läsionen unterschied sich nicht signifikant.

#### 3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Koronarangiographische Untersuchungen und intrakoronare Ultraschalluntersuchungen 30 Minuten und sechs Monate nach Kryoapplikation am unreifen Myokard zeigten in diesem Tiermodell keine pathologischen Befunde. Die Kryoläsionen stellten sich makroskopisch als relativ scharf begrenzte Bereiche aus Binde- und Fettgewebe dar.

Die Auswertung der histologischen Präparate zeigte in vielen Fällen geringfügige Veränderungen der Koronargefäßwandschichten. Hauptsächlich handelte es sich hierbei um leichte Proliferationen der *Tunica adventitia* und *media*. Eine geringe Proliferation der *Tunica intima* von 2-4 Zellschichten konnte in zwei Fällen detektiert werden. Bei einer dieser Läsionen wurde eine thrombotische Auflagerung einer Koronararterie entdeckt. Endokardiale Thromben stellten sich jedoch nicht dar.

Als histologische Besonderheiten fiel eine Neoproliferation von kleinen, wandstarken Gefäßen im Bereich vieler Läsionen auf. Des Weiteren fanden sich bei drei der 29 ausgewerteten Läsionen kleinere Inseln aus intaktem muskulärem Gewebe innerhalb der Läsion, bei vier weiteren kam es zu knorpeligen Gewebsveränderungen.

Während die ventrikulären Läsionen ein mittleres Volumen von 238,69 mm<sup>3</sup> und eine mittlere Tiefe von 4,60 mm aufwiesen, lag das Volumen der atrialen Läsionen im Mittel bei 174,04 mm<sup>3</sup>, die mittlere Tiefe der Läsionen bei 3,58 mm. Somit zeigte sich eine signifikant größere Läsionstiefe der ventrikulären Läsionen im Gegensatz zu den atrialen. Die Volumina der ventrikulären Läsionen waren zwar größer als die der atrialen, der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Bei 14 der 29 Läsionen zeigte sich eine transmurale Läsionsausdehnung. Diese trat signifikant häufiger bei den atrial platzierten Läsionen auf.

Der Vergleich der Läsionsvolumina und Läsionstiefen mit Ergebnissen einer vorangegangenen Studie 48 Stunden nach Kryoapplikation zeigte signifikant größere Läsionsvolumina bei den nach sechs Monate untersuchten Schweinen. Dies traf sowohl auf die ventrikulären, als auch auf die atrialen Läsionen zu. Die Läsionstiefen wiesen bei den ventrikulären Läsionen ebenfalls ein signifikantes Wachstum nach sechs Monaten auf. Lediglich wurde keine signifikante Zunahme der Tiefenausdehnung der atrialen Läsionen beobachtet.

53

## **4 DISKUSSION**

Das Ziel dieser Arbeit ist die Beurteilung der Effektivität und der Sicherheit der doppelten Kryoablation als alternatives Behandlungskonzept zur Hochfrequenzablation für supraventrikuläre Tachykardien bei Kindern. Dazu wurden an einem durch unsere Arbeitsgruppe etablierten Tiermodell angiographische und detaillierte mikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

## 4.1 Unerwünschte Nebenwirkungen nach Katheterablation

#### 4.1.1 Koronararterielle Veränderungen

Bei der Ablation mit Hochfrequenzstrom gibt es einige Fallberichte über Koronarstenosen bei Kindern als Folge der Behandlung. Khanal et al. (1999) stellten einen Fallbericht vor, der einen akuten Koronarverschluss eines zwölf Jahre alten Jungens direkt nach Ablation mit Hochfrequenzstrom beschreibt, der nur durch eine Stentimplantation behoben werden konnte. In einem weiteren Fallbericht wird beschrieben, dass ein acht Jahre alter Junge, direkt nach Hochfrequenzstromablation einen nichtthrombotischen Verschluss der rechten Koronararterie erlitt. Auch diese war nur durch einen Stent zu revaskularisieren (Strobel et Koronarverschlüsse im al. 2001). Auch weiteren zeitlichen Verlauf nach Hochfrequenzstromablation werden in der Literatur beschrieben (Dinckal et al. 2003, Nakagawa und Jackman 2007). Zum Beispiel berichten Kugler et al. (2002) über den Tod eines 13 Jahre alten Kindes drei Stunden nach erfolgreicher Hochfrequenzstromablation. Ursache war eine Verletzung der linken Koronararterie. Hingegen wurde noch nie ein Fallbericht über Koronarverschlüsse bei Kindern oder Erwachsenen nach Kryoablation beschrieben.

Auch im Tiermodell an Schweinen wurden Koronarstenosen nach Hochfrequenzapplikation beobachtet. In einer Studie unsere Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2000 am Schweinemodell zeigte sich eine Wandveränderung der rechten Koronararterie sechs Monate nach Hochfrequenzstromapplikation bei drei von den acht langzeitüberlebenden Versuchstieren (Paul et al. 1997, Bökenkamp et al. 2000, Sturm et al. 2004). Mehrere Studien an Tieren weisen darauf hin, dass Kryoablation geringere koronararterielle Veränderungen zur Folge hat als Hochfrequenzstromablation (Kriebel et al. 2009, Misaki et al. 1983, Skanes et al.

#### 2004, Aoyama et al. 2005).

In einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe am gleichen Tiermodell wurden bei zehn Schweinen die einfache Kryoapplikation angewandt. Hierbei zeigten sich bei keinem der Versuchstiere Gefäßveränderungen oder Stenosen der Koronararterien nach 48 Stunden, drei und sechs Monaten (Kriebel et al. 2009).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass durch einen doppelten Zyklus der Kryoenergie größere und auch tiefere Läsionen entstehen. Daraus ergibt sich auch die Frage nach einem höheren Nebenwirkungsprofil. In unserer Studie konnten weder durch Koronarangiographie noch durch ICUS sechs Monate nach Applikation Koronararterienveränderungen nachgewiesen werden. Histologisch war bei acht der insgesamt 29 Läsionen eine minimale Proliferation der Wand der Koronararterien nachweisbar, jedoch ohne Stenosierung. Meist war von der Wandverdickung die *Tunica adventitia* betroffen. Allerdings kam es in zwei Fällen zu einer geringen Proliferation, nicht nur der *Tunica media* und *adventitia*, sondern auch der *Tunica intima*. Diese intimale Proliferation bestand aus zwei bis vier Zellreihen. Auch in dem vorangehenden Teil dieser Studie, bei dem die Herzen der Versuchstiere 48 Stunden nach doppelter Kryoapplikation histologisch untersucht wurden, zeigte sich in zwei Fällen eine leichte Veränderung der Koronararterien. Hierbei handelte es sich um Wandverdünnungen mit Nekrose der *Tunica media* und *adventitia*. Die *Tunica intima* und die *Elastica interna* blieben intakt.

Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit einer Studie von Aoyama et al. (2005) an Hunden, in welcher die Schädigung von Koronararterien bei Radiofrequenzstromapplikation direkt mit denen der einfachen und doppelten Kryoapplikation verglichen wurden. Hierbei zeigte sich im ICUS während der Hochfrequenzstromapplikation eine Wandverdickung und Einengung des Ramus circumflexus der linken Koronararterie in neun von zehn Fällen. Koronarangiographische Untersuchungen zeigten fünf Minuten und eine Woche nach Applikation eine Stenosierung in sechs von zehn, bzw. vier von neun Fällen. Histologisch wurde in sieben von zehn Fällen eine Nekrose der Tunica media beschrieben, in fünf davon war auch die Tunica intima betroffen. Hingegen zeigte der ICUS während der Kryoapplikation reversible Eisballkompressionen der Koronararterie. Die nur koronarangiographische Untersuchung nach fünf Minuten und einer Woche ergab weder bei einfacher noch bei doppelter Kryoapplikation Hinweise auf eine Stenosierung. Einfache Kryoapplikation verursachte in zwei von sieben Fällen eine geringe Medianekrose, doppelte Kryoapplikation in acht von 14 Fällen. Nach einer Woche zeigten sich keine Veränderungen der Tunica intima, nach drei Monaten wurde in zwei von acht Fällen eine leichte Intimaproliferation ohne Lumeneinengung detektiert. Insgesamt ergab sich aus den tierexperimentellen Studien eine wesentlich geringere Koronaraffektion nach Kryoapplikation als nach Hochfrequenzstromapplikation. Doppelte Kryoapplikation hatte eine etwas höhere Rate an Koronaraffektionen zur Folge als einfache Kryoapplikation, diese blieb jedoch wesentlich geringer als nach Hochfrequenzstromapplikation (Aoyama et al. 2005).

#### **4.1.2 Thrombusformation**

Sechs Monate nach doppelter Kryoapplikation wurde bei einer der 29 Läsionen (3,4%) ein kleiner Thrombus im Lumen der rechten Koronararterie gefunden. Bei der betroffenen Läsion zeigte sich zusätzlich eine Proliferation aller drei Wandschichten der den Thrombus enthaltenen Koronararterie. Sowohl die proliferierten Arterienwände als auch der Thrombus befanden sich auf der läsionszugewandten Seite der Arterie.

48 Stunden nach doppelter Kryoapplikation wurden im Vergleich dazu keine intrakoronaren Thromben gefunden, jedoch ein Thrombus in einer Koronarvene (Schneider et al. 2013).

Zusätzlich beobachtete man 48 Stunden nach doppelter Kryoapplikation endokardiale Thrombusformationen bei sechs von 31 Läsionen (19,4%).

Ähnliche Ergebnisse erbrachte eine Studie von Skanes et al. 2004, bei der an 14 Schweinen eine Kryoapplikation durchgeführt wurde. Nach 48 Stunden wurden die Läsionen histologisch untersucht, wobei bei vier der insgesamt 25 Läsionen (16%) endokardiale Thrombusformationen gefunden wurden.

Khairy et al. (2011) applizierten bei 32 Minischweinen eine Hochfrequenzstrom- oder eine Kryoapplikationsläsion. Bei 26,8% der Kryoapplikationsläsionen wurden direkt nach Applikation Adhäsionsthromben beschrieben. Bei der Hochfrequenzstromapplikation waren es 73,3%. Bei den sechs Monate nach Kryoapplikation untersuchten Läsionen wurde nur noch jeweils bei einer der Kryo- und Hochfrequenzstomapplikationen ein Thrombus gefunden. Zwölf Monate nach Applikation konnte bei beiden Energiemethoden kein Thrombus mehr gefunden werden.

Endokardiale Thromben fanden wir sechs Monate nach doppelter Kryoapplikation ebenfalls nicht. Es ist in Zusammenschau der Studien zu vermuten, dass das Risiko endokardialer Thrombenbildung nur im engen zeitlichen Zusammenhang zu der Applikation besteht, welches am ehesten eine akute Reaktion auf die endokardiale Verletzung darstellt. Das Fehlen von Thromben im Verlauf entspricht daher der defektfreien Heilungsreaktion der endokardialen Oberfläche.

Zusätzlich weisen auch die Ergebnisse von Khairy et al. (2011) darauf hin, dass die Hochfrequenzapplikation mit einem höheren Risiko einer Thrombusbildung einhergeht als Kryoapplikation. Auch die Ergebnisse einer anderen Studie von Khairy et al. (2003), bei der 22 an Hunden die endokardiale Thrombusformation im Vergleich von Hochfrequenzstromapplikation und einfacher Kryoapplikation bei unterschiedlicher Kathetergröße, Kühlungsrate und Endtemperatur sieben Tage nach Applikation untersucht wurden, unterstützen diese These. Kryoapplikation ging hierbei mit einer Thrombusrate von 30% der Läsionen einher. Bei Hochfrequenzstrom war die Rate mit 75% signifikant höher. Ebenfalls auffällig war, dass bei Hochfrequenzstromapplikation mit der Größe der Läsion auch die Größe der Thrombusbildung wuchs. Bei Kryoapplikation traf dies nicht zu.

#### 4.2 Morphometrische Analyse

In verschiedenen Studien wurde beschrieben, dass eine Abhängigkeit des Läsionsvolumens von Ablationstemperatur, Elektrodengröße, Ablationsdauer und Anzahl der Ablationszyklen besteht (Schwagten et al. 2010, Markovitz et al. 1988). Eine größere Läsionsausdehnung könnte eine größere Effektivität zur Folge haben, möglicherweise jedoch mit einem gesteigerten Risikoprofil.

Während die Mehrheit der vorangegangenen Studien die Größe der Applikationsläsionen durch Extrapolierung ermittelte, konnte wir in unserer Studie durch eine detaillierte 3dimensionale histologische Messung eine genaue Analyse der Größenverhältnisse der Läsionen gewährleistet. Bei vorangehenden Studien derselben Arbeitsgruppe mit gleichem Versuchsaufbau gleicher Messmethode und wurden die Läsionsvolumina bei Hochfrequenzstrom und einfacher Kryoapplikation 48 Stunden nach Applikation, sowie nach sechs Monaten untersucht, ebenso bei doppelter Kryoapplikation nach 48 Stunden. Dadurch ist ein direkter Vergleich der Läsionsvolumina der verschiedenen Energieanwendungen möglich, aber die Beurteilung jeweiligen auch der Volumenveränderungen nach sechs Monaten.

#### 4.2.1. Läsionsvolumina im Vergleich der unterschiedlichen Energiemodalitäten

Im Vergleich der Größenverhältnisse waren die Läsionen 48 Stunden nach Hochfrequenzstomapplikation etwa gleich groß wie nach einfacher Kryoapplikation. Die ventrikulären Läsionen der doppelten Kryoapplikation waren größer als die der einfachen Kryoapplikation und die der Hochfrequenzapplikation. Allerdings war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Bei den atrialen Läsionen der doppelten Kryoapplikation ließ sich ein etwa doppelt so großes Volumen vermessen als bei der einfachen. Dies erreichte statistische Signifikanz (Tabelle 13) (Kriebel et al. 2009, Kriebel et al. 2010, Schneider et al. 2013).

Insgesamt waren die ventrikulären Läsionen bei allen Energiemodalitäten größer als die atrialen.

Die Läsionen der doppelten Kryoapplikation zeigten eine signifikant größere Ausdehnung des Volumens nach sechs Monaten als 48 Stunden nach Applikation (Schneider et al. 2013). Sowohl die atrialen als auch die ventrikulären Läsionen zeigten eine Zunahme des Volumens von etwa 60%.

Messzeitpunkt	Energiemethode	Mittleres Volumen	Mittleres Volumen
nach Applikation		der Vorhofläsionen	der
			Ventrikelläsionen
48 Stunden	Hochfrequenz	48 ± 13,5	$150,2 \pm 5,2$
	einfache	$52 \pm 45$	$144 \pm 203$
	Kryoapplikation		
	doppelte	109,21 ± 39,61	$150,3 \pm 53,21$
	Kryoapplikation		
6 Monate	Hochfrequenz	27,8 ± 4,2	96,7 ± 18,6
	einfache	$40 \pm 20$	$192 \pm 118$
	Kryoapplikation		
	doppelte	$174\pm67{,}18$	$238,6 \pm 112,1$
	Kryoapplikation		

 Tabelle 12: Vergleich der Läsionsvolumina 48 Stunden und sechs Monate nach Hoch 

 frequenzstromapplikation, einfacher Kryoapplikation und doppelter Kryoapplikation

Khairy et al. (2011) berichten, dass sich sowohl Kryo-, also auch Hochfrequenzläsionen im zeitlichen Verlauf vergrößern. Dabei zeigte sich kein Unterschied der Wachstumsrate

zwischen den beiden Energiemodalitäten. Auch stellte sich kein signifikanter Unterschied im Läsionswachstum im Vergleich atrialer- und ventrikulärer Läsionslokalisation heraus. Insgesamt waren aber auch, wie bei unseren Studien, die ventrikulären Läsionen größer als die atrialen.

Dass Läsionen nach doppelter Kryoapplikation im Mittel größere Ausmaße haben als nach einfacher Kryoapplikation beschrieben auch Dubuc et al. (1999) in einer Studie an Hunden. Hier war der Unterschied aufgrund der großen Spannweite der Volumina jedoch nicht signifikant.

Diese Beobachtung bestätigt Ergebnisse anderer Studien (Saul et al. 1994, Khairy et al. 2011, Kriebel et al. 2010), bei denen beobachtet wurde, dass sich die Läsionen mit dem somatischen Wachstum vergrößern. In unserer Studie nahmen die Läsionsvolumina um das etwa 1,5 -fache zu. Dies entspricht jedoch weder der Zunahme des Köpergewichtes noch der des Gewichts der Herzen, welche in unserem Schweinemodel um das fünf- bis sechsfache zugenommen haben.

#### 4.2.2 Tiefenausdehnung von Kryoapplikationsläsionen

Wichtige Einflussgrößen für die Effektivität der Ablationsbehandlung sind die Tiefenausdehnung und besonders die Transmuralität der Läsionen.

Die mittlere Eindringtiefe der Läsionen dieser Studie lag bei den atrialen Läsionen bei 3,5 mm, bei den ventrikulären bei 4,6 mm. Die ventrikulären Läsionen waren somit signifikant tiefer. Die Tiefen der Läsionen bei den 48 Stunden nach Applikation untersuchten Tiere im vorangehenden Teil dieser Studie waren mit 3,0 mm bei den atrialen Läsionen und 3,5 mm bei den ventrikulären Läsionen etwas geringer als die der nach sechs Monaten untersuchten Tieren. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Jakobi 2016, Schneider et al. 2013). Bei den Versuchen dieser Studie zeigten 14 der 29 Läsionen (48%) eine transmurale Ausdehnung. Zwölf der transmuralen Läsionen waren atrial lokalisiert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen des vorangehenden Teils dieser Studie. Dort zeigte sich bei 50% der nach 48 Stunden untersuchten doppelten Kryoläsionen eine transmurale Ausdehnung. Auch hier war der Anteil der atrial gelegenen transmuralen Läsionen wesentlich größer als der der ventrikulär lokalisierten (Jakobi 2016, Schneider et al. 2013). Die Ergebnisse der Studie von Kriebel et al. (2009) mit einfacher Kryoenergie als Applikationsmethode beschrieben, dass auch bei einfacher Kryoapplikation alle atrialen Läsionen eine transmurale Ausdehnung aufwiesen, die ventrikulären jedoch nicht.

In der Studie von Bökenkamp et al. (2020) zeigte sich bei durch Hochfrequenzstrom gesetzten Läsionen ein gleiches Verteilungsmuster. Alle atrialen Läsionen wurden hier zwölf Monate nach Applikation als transmural detektiert. Von den ventrikulären Läsionen zeigte jedoch keine eine transmurale Ausdehnung.

Auch Khairy et al. (2011) untermauern die Ergebnisse unserer Studie. Bei ihren Versuchen wurden mit Hochfrequenzstrom gesetzte Läsionen und Kryoapplikationsläsionen in verschiedenen Zeiträumen nach Applikation unter anderem auf ihre Transmuralität untersucht. 70% der atrialen Läsionen waren transmural, nur 38% der ventrikulären. Die transmurale Läsionsausdehnung kam bei beiden Energiemodalitäten gleichermaßen oft vor. Der wahrscheinlichste Grund des vermehrten Auftretens transmuraler Läsionen im Atrium wird die geringere Wanddicke der Vorhöfe sein. Die Wahl der Energiemethode hat demnach wahrscheinlich keinen entscheidenden Einfluss auf die Transmuralität der Läsionen.

## 4.3 Läsionsmorphologie

Die in dieser Studie untersuchten Kryoläsionen stellten sich sechs Monate nach Applikation morphologisch als relativ scharf begrenzte, homogene, gut erkennbare, weißliche Bereiche dar, die in manchen Läsionen jedoch strähnig ins umgebende Muskelgewebe übergingen. Sie bestanden vorwiegend aus Bindegewebe und Fettzellen.

Wir beobachteten bei 16 der 29 Kryoläsionen kleine Gefäße mit deutlich verdickten Gefäßwänden innerhalb der Läsionen. Diese Art von Gefäßen konnte weder in der angrenzenden Muskulatur aller untersuchten Läsionen noch in der Muskulatur der Kontrolltiere gefunden werden.

Misaki et al. untersuchten in einer Studie zu Langzeiteffekten epikardialer und endokardialer Kryochirurgie bei Schafen Applikationsläsionen im zeitlichen Verlauf bis zwei Jahre nach Applikation histologisch. Auch seine Arbeitsgruppe beschrieb eine deutliche Vaskularisation, wobei sich die Kapillarwände als ungewöhnlich dick darstellten. Zudem zeigte sich, dass der fibrinöse Umwandlungsprozess bereits nach vier Wochen vollständig abgeschlossen war. Die Läsionen stellten sich allzeit mit scharfer Abgrenzung zum umgebenden Gewebe dar (Misaki et al. 1983).

Hingegen zeigten sich Hochfrequenzstromläsionen, sowohl bei dem gleichen Versuchsaufbau als auch in anderen Studien als unscharf begrenzte Läsionen mit Unterbrechungen der Endothelzellschicht und niedrigem Kapillarisierungsgrad (Bökenkamp et al. 2000, Khairy et al. 2011).

Die scharfe Abgrenzbarkeit der Kryoläsionen lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass der Katheter im Gegensatz zur Hochfrequenzstromapplikation durch Kryoadhäsion am Gewebe festhaftet und nicht durch die Herzbewegung dislozieren kann. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Kryoapplikation mit einer wesentlich schonenderen Art der Gewebsverletzung einhergeht. Die erhaltene Endothelschicht nach Kryoenergieapplikation bringt den zusätzlichen Vorteil eines geringeren thomboembolischen Risikos (Schwagten et al. 2010).

#### 4.4 Effektivität der Ablationsbehandlungen

Die Ergebnisse von verschiedenen Studien wiesen darauf hin, dass einfache Kryoablation zwar kurzfristig eine vergleichbare Effektivität zeigt, im mittelfristigen Verlauf jedoch mehr Rückfälle aufzeigt als Hochfrequenzstromablation (Kriebel et al. 2005, Miyazaki et al. 2005, Bar-Cohen et al. 2006, Deisenhofer et al. 2010, LaPage et al. 2011).

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass ein doppelter Kryoablationszyklus durch Induktion einer größeren Läsion auch mit einer Steigerung der klinischen Effektivität einhergehen und auch bessere Langzeitergebnisse erzielen könnte. Dubuc et al. veröffentlichten 1999 eine Studie, deren Orientierungspunkt die Induktion eines kompletten AV-Blockes bei Hunden war. Dies gelang mit einfacher Kryoablation nur bei einem von sechs Hunden, bei doppeltem Kryozyklus jedoch bei jedem der sechs Hunde.

Auch klinische Beobachtungen haben sowohl gezeigt, dass durch Applikation von doppelter Kryoenergie am heranwachsenden Myokard eine höhere Effektivität zu erzielen ist, als auch dass eine geringe Rezidivrate in mittelfristigen Nachbeobachtungen bei Patienten besteht (Gist et al. 2009, Collins et al. 2007, Drago et al. 2006, Rodriguez et al. 2002).

Die in dieser Arbeit untersuchten Kryoläsionen zeigten in den meisten Fällen eine homogene Narbenstruktur. Bei drei der 29 Läsionen waren kleinere Inseln aus erhaltenem, muskulärem Gewebe zu finden. Solche Muskelzellreste könnten in vivo die Grundlage für Rezidive bilden (Kowalski et al. 2012).

## 4.5 Schlussfolgerung

Doppelte Kryoenergieapplikation stellte sich in dieser Studie als eine effektive Alternativmethode zur Hochfrequenzstromapplikation am wachsenden Herzen dar. Sie zeigte größere Läsionsausdehnungen als die Hochfrequenzläsionen und somit wahrscheinlich ein vergleichbares Maß an Effektivität mit einem geringeren Risiko für das Auftreten thrombotischer Veränderungen. Es kann also in Korrelation zu anderen Studien vermutet werden, dass eine Ablationsbehandlung mit doppeltem Kryoenergiezyklus am wachsenden Herzen besonders in Risikolokalisationen mit enger Nähe zu Koronargefäßen und dem AV-Knoten einer Behandlung mit Hochfrequenzstromablation vorzuziehen sein könnte.

Im Vergleich zur einfachen Kryoapplikation zeigte die in dieser Arbeit vorgenommene Ablationsmethode mit einem doppelten Kryozyklus größere Läsionen und könnte klinisch
auf eine höhere Effektivität gegebenenfalls mit Verringerung der Rezidivrate hinweisen. Jedoch konnte das Auftreten minimaler Koronarveränderungen gezeigt werden, die bei einfacher Kryoapplikation nicht beobachtet wurden.

Ob sich eine weitere Zunahme der Effektivität auch ohne Verlust an Sicherheit durch eine dreifache Kryoapplikation erzielen lässt (Qureshi et al. 2013, Krause et al. 2017), wird von unserer Arbeitsgruppe im Tiermodell bereits untersucht. Diese Ansätze sollten durch randomisierte klinische Studien überprüft werden.

### 4.6 Limitationen

Für die oben beschriebenen Experimente wurden Schweine als Versuchsobjekte eingesetzt. Dies ist zwar vorteilhaft, da eine große Ähnlichkeit in Organgröße und Physiologie zum menschlichen Herzen besteht, trotzdem unterscheiden sie sich auch in vielen Eigenschaften, deshalb kann das Schweinemodell nicht vollständig auf Menschen übertragen werden (McKenzie 1996; Crick et al. 1998). Die Ergebnisse sind somit zwar wegweisend, aber nicht uneingeschränkt mit Ergebnissen am Menschen gleichzusetzen.

Zudem wurden die Applikationsläsionen an Schweinen gesetzt, bei denen keine akzessorische Leitungsbahn vorlag. Die Ergebnisse sind deshalb nicht vollständig auf reale Patienten übertragbar.

Eine weitere Einschränkung ergibt sich aus der sehr geringen Anzahl an Versuchstieren, weshalb sich nur begrenzt repräsentative Schlussfolgerungen ziehen lassen.

Die Ergebnisse beziehen sich auf einen Zeitraum von sechs Monaten nach Applikation. Über mögliche im weiteren zeitlichen Verlauf auftretende Ereignisse lässt sich keine Aussage treffen.

Wenige Läsionen konnten aufgrund von Präparationsmängeln nicht ausgewertet werden.

#### **5 ZUSAMMENFASSUNG**

Die Kryoenergieablation ist als Alternative zur Hochfrequenzstromablation ein akzeptiertes Verfahren zur Behandlung von supraventrikulären Tachykardien im Kindesalter. Die einfache Kryoenergieablation zeigt allerdings eine geringere Erfolgsrate und höhere Rezidivrate als die Hochfrequenzstromablation. Um die Wirksamkeit der Kryoenergieapplikation zu erhöhen, ist in der klinischen Praxis ein doppelter Kryoenergieapplikationszyklus (Anfrieren-Auftauen-Anfrieren) zur Anwendung gekommen. Dazu liegen jedoch nur unzureichende experimentelle Daten vor, insbesondere nicht im wachsenden Organismus. Stenosierungen der Koronararterien wurden als schwere Komplikation nach Hochfrequenzstromanwendung sowohl experimentell als auch klinisch beobachtet, nicht jedoch nach einfacher Kryoenergieapplikation.

In der vorliegenden Studie wurden dazu anhand eines etablierten Schweinemodells die Auswirkungen einer doppelten Kryoenergieapplikation am AV-Klappenannulus auf das wachsende Myokard und die Koronararterien nach 6 Monaten untersucht, um Rückschlüsse zur Sicherheit und Effektivität dieser Methode ziehen zu können.

Die histologischen Untersuchungen zeigten bei acht der 29 induzierten Kryoenergie-Läsionen geringfügige Veränderungen der Wandschichten der Koronararterien. In den meisten Fällen war hierbei allerdings nur die *Tunica adventitia* durch Proliferation verdickt. In zwei Fällen lag eine geringe Proliferation der *Tunica intima* vor, die *Lamina elastica interna* war intakt. Es wurde keine bedeutsame Stenosierung des Lumens der Koronararterien gefunden, nie war die gesamte Zirkumferenz betroffen. Die Wandveränderungen der Koronararterien fanden sich immer auf der läsionszugewandten Seite. In einer Läsion bestand ein kleiner Thrombus im Lumen der rechten Koronararterie im Bereich der proliferativ veränderten *Tunica intima*. Alle drei Wandschichten der betroffenen Koronararterie waren an dieser Stelle verdickt. Endokardiale oder intravenöse Thromben wurden jedoch nicht gefunden.

Diese subklinischen Veränderungen konnten weder angiographisch noch durch intrakoronaren Ultraschall entdeckt werden. Die koronararteriellen Veränderungen waren im Vergleich zu den Ergebnissen vorangegangener Experimente mit Hochfrequenzstromapplikation deutlich seltener und weniger ausgeprägt.

Eine histologische Auffälligkeit der Kryoläsionen war die Proliferation von kleinen Gefäßen innerhalb der Läsionen, welche auffällig dicke Gefäßwände aufwiesen. Dies war in über der

#### 5 Zusammenfassung

Hälfte der Läsionen nachweisbar. Vereinzelt wurden Residuen von intaktem Myokardgewebe innerhalb der Läsionen gefunden. Diese Beobachtungen könnten die Ursache für die geringere Effektivität und erhöhte Rezidivrate der Kryoenergie sein.

Im Vergleich mit vorangehenden Studien zeigte sich, dass die doppelten Kryoapplikationsläsionen nach sechs Monaten ein um etwa 60% größeres Volumen aufwiesen als die Läsionen nach Hochfrequenzstrom- und einfacher Kryoapplikation.

Zusammenfassend zeigten sich sechs Monate nach doppelter Kryoenergieapplikation am wachsenden Myokard in seltenen Fällen geringe Wandveränderungen der Koronararterien. Die Läsionen waren inhomogen mit Proliferation von kleinen Gefäßen und Residuen von intaktem Myokardgewebe. Die lebenslangen Konsequenzen dieser Veränderungen sind bislang nicht bekannt oder untersucht worden. Daher sind weitere Studien zur Überprüfung des Risikoprofils und der Effektivität der wiederholten Anwendung der Kryoenergie erforderlich.

## **6** LITERATURVERZEICHNIS

- Aoyama H, Nakagawa H, v. Pitha J, Khammar GS, Chandrasekaran K, Matsudaira K, Yagi T, Yokoyama K, Lazzara R, Jackman WM (2005): Comparison of cryothermia and radiofrequency current in safety and efficacy of catheter ablation within the canine coronary sinus close to the left circumflex coronary artery. J Cardiovasc Electrophysiol <u>16</u>, 1218-1226
- Bar-Cohen Y, Cecchin F, Alexander ME, Berul CI, Triedman JK, Walsh EP (2006): Cryoablation for accessory pathways located near normal conduction tissues or within the coronary venous system in children and young adults. Heart Rhythm <u>3</u>, 253-258
- Berger F, Gass M, Balmer C (2015): Wenn Kinderherzen rasen: Supraventrikuläre Tachykardien- ein aktueller Überblick. Paediatrica <u>26</u>, 8-11
- Bertram H, Bokenkamp R, Peuster M, Hausdorf G, Paul T (2001): Coronary artery stenosis after radiofrequency catheter ablation of accessory atrioventricular pathways in children with ebstein's malformation. Circulation <u>103</u>, 538-543.
- Bökenkamp R, Wibbelt G, Sturm M, Windhagen-Mahnert B, Bertram H, Hausdorf G, Paul T (2000): Effects of intracardiac radiofrequency current application on coronary artery vessels in young pigs. J Cardiovasc Electrophysiol <u>11</u>, 565-571
- DGPK (2018) Tachykarde Herzrhythmusstörungen im Kindes-, Jugend- und jungen Erwachsenenalter (EMAH-Patienten). S2k-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie <u>https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/023-022.html</u>; abgerufen am 16.12.2020
- Collins KK, Rhee EK, Kirsh JA, Cannon BC, Fish FA, Dubin AM, Van Hare GF (2007): Cryoablation of accessory pathways in the coronary sinus in young patients: a multicenter study from the Pediatric and Congenital Electrophysiology Society's Working Group on Cryoablation. J Cardiovasc Electrophysiol <u>18</u>, 592-597
- Crick SJ, Sheppard MN, Ho SY, Gebstein L, Anderson RH (1998): Anatomy of the pig heart: comparison with normal human cardiac structure. J Anat <u>193</u>, 105-119
- Deisenhofer I, Zrenner B, Yin YH, Pitschner HF, Kuniss M, Großmann G, Stiller S, Luik A, Veltmann C, Frank J (2010): Cryoablation versus radiofrequency energy for the ablation of atrioventricular nodal reentrant tachycardia (the CYRANO Study): results from a large multicenter prospective randomized trial. Circulation <u>122</u>, 2239-2245
- Dinckal H, Yucel O, Kirilmaz A, Karaca M, Kilicaslan F, Dokumaci B (2003): Left anterior descending coronary artery occlusion after left lateral free wall accessory pathway ablation: what is the possible mechanism? Europace <u>5</u>, 263-266

- Drago F, Silvetti M, De Santis A, Grutter G, Andrew P (2006): Lengthier cryoablation and a bonus cryoapplication is associated with improved efficacy for cryothermal catheter ablation of supraventricular tachycardias in children. J Interv Card Electrophysiol <u>16</u>, 191-198
- Drago F, Russo MS, Silvetti MS, DE Santis A, Iodice F, Naso Onofrio MT (2010): Cryoablation of typical atrioventricular nodal reentrant tachycardia in children: six years' experience and follow-up in a single center. Pacing Clin Electrophysiol <u>33</u>, 475-481
- Dubuc M, Roy D, Thibault B, Ducharme A, Tardif JC, Villemaire C, Leung TK, Talajic M (1999): Transvenous catheter ice mapping and cryoablation of the atrioventricular node in dogs. Pacing Clin Electrophysiol <u>22</u>, 1488-1498
- Gist KM, Bockoven JR, Lane J, Smith G, Clark JM (2009): Acute success of cryoablation of left-sided accessory pathways: a single institution study. J Cardiovasc Electrophysiol <u>20</u>, 637-642
- Haas NA, Kleideiter U: Kinderkardiologie: Klinik und Praxis der Herzerkrankungen bei Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen. 1. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2011
- Jakobi FJ: Einfluss einer modifizierten Form der Kryoenergieapplikation auf die Formation von Ablationsläsionen und die Koronarperfusion am wachsenden Myokard. Med. Diss. Göttingen 2016
- Khairy P, Chauvet P, Lehmann J, Lambert J, Macle L, Tanguay J, Sirois MG, Santoianni D, Dubuc M (2003): Lower incidence of thrombus formation with cryoenergy versus radiofrequency catheter ablation. Circulation <u>107</u>, 2045-2050
- Khairy P, Guerra PG, Rivard L, Tanguay J, Landry E, Guertin M, Macle L, Thibault B, Tardif J, Talajic M (2011): Enlargement of catheter ablation lesions in infant hearts with cryothermal versus radiofrequency energy: An animal study. Circ Arrhythm Electrophysiol <u>4</u>, 211-217
- Khanal S, Ribeiro PA, Platt M, Kuhn M (1999): Right coronary artery occlusion as a complication of accessory pathway ablation in a 12-year-old treated with stenting, Catheter Cardiovasc Interv <u>46</u>, 59-61
- Kiess W, Merkenschlager A, Pfäffle R, Siekmeyer W: Therapie in der Kinder- und Jugendmedizin Strategien für Klinik und Praxis. 1. Auflage; Elsevier Gmbh, München 2007
- Krause U, Müller MJ, Stellmacher C, Backhoff D, Schneider H, Paul T (2020): High density mapping and catheter ablation of atrial tachycardias in adults with congenital heart disease. Clin Res Cardiol <u>109</u>, 999-1007
- Krause U, Abreu da Cunha FD, Backhoff D, Jacobshagen C, Klehs S, Schneider HE, Paul T (2017): Effects of triple cryoenergy application on lesion formation and coronary arteries in the developing myocardium. Pediatr Cardiol <u>38</u>,663-668

- Kriebel T, Broistedt C, Kroll M, Sigler M, Paul T (2005): Efficacy and safety of cryoenergy in the ablation of atrioventricular reentrant tachycardia substrates in children and adolescents. J Cardiovasc Electrophysiol <u>16</u>, 960-966
- Kriebel T, Hermann H, Schneider H, Kroll M, Selle J, Overwaul A, Sigler M, Paul T (2009): Cryoablation at growing myocardium: No evidence of coronary artery obstruction or intimal plaque formation early and late after energy application. Pacing Clin Electrophysiol <u>32</u>, 1197-1292
- Kriebel T, Schneider H, Overwaul A, Stahl M, Quentin T, Sigler M, Paul T (2010): Comparison of ablation lesion size after cryoenergy versus radiofrequency current application at growing myocardium. Heart Rhythm <u>7</u>, S1
- Kowalski M, Grimes MM, Perez FJ, Kenigsberg DN, Koneru J, Kasirajan V, Wood MA, Ellenbogen KA (2012): Histopathologic characterization of chronic ablation lesions for pulmonary vein isolation. J Am Coll Cardiol <u>59</u>, 930-938
- Kugler JD, Danford DA, Deal BJ, Gillette PC, Perry JC, Silka MJ, Van Hare GF, Walsh EP (1994): Radiofrequency catheter ablation for tachyarrhythmias in children and adolescents. New Engl J Med <u>330</u>, 1481-1487
- Kugler JD, Danford DA, Houston KA, Felix G (2002): Pediatric radiofrequency catheter ablation registry success, fluoroscopy time, and complication rate for supraventricular tachycardia: comparison of early and recent eras. J Cardiovasc Electrophysiol <u>13</u>, 336-341
- LaPage MJ, Reed JH, Collins KK, Law IH, Pilcher TA, Tanel RE, Anderson CC, Young ML, Emmel M, Paul T et al. (2011): Safety and results of cryoablation in patients <5 Years Old and/or <15 Kilograms. Am J Cardiol <u>108</u>, 565-571
- Markovitz LJ, Frame LH, Josephson ME, Hargrove WC (1988): Cardiac cryolesions: factors affecting their size and a means of monitoring their formation. Ann Thorac Surg <u>46</u> 531-535
- McKenzie JE: Swine as a model in cardiovascular research. In Tumbleson ME, Schook LB (Hrsg.): Advances in Swine in Biomedical Research. 2. Auflage; Springer, US 1996, 7-17
- Miyazaki A, Blaufox AD, Fairbrother DL, Saul JP (2005): Cryo-ablation for septal tachycardia substrates in pediatric patients: mid-term results. J Am Coll Cardiol <u>45</u>, 581-588
- Misaki T, Allwork S, Bentall H (1983): Longterm effects of cryosurgery in sheep heart. Cardiovasc Res <u>17</u>, 61-69
- Nakagawa H, Jackman WM (2007): Catheter Ablation of Paroxysmal Supraventricular Tachycardia. Circulation <u>116</u>, 2465-2478

- Paul T, Bokenkamp R, Mahnert B, Trappe HJ (1997): Coronary artery involvement early and late after radiofrequency current application in young pigs. Am Heart J <u>133</u>, 436-440
- Pothineni, NV, Kancharla K, Katoor AJ, Shanta G, Paydak H, Kapa S, Deshmukh A (2019): Coronary artery injury related to catheter ablation of cardiac arrhythmias: A systematic review. J Cardiovasc Electrophysiol <u>30</u>, 92-101
- Qureshi MY, Ratnasamy C, Sokoloski M, Young ML (2013): Low Recurrence rate in treating atrioventricular nodal reentrant tachycardia with triple freeze–thaw cycles. Pacing Clin Electrophysiol <u>36</u>, 279–285
- Reinhardt D, Nicolai T, Zimmer K: Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jugendalter.9. Auflage; Springer, Heidelberg 2014
- Roberts-Thomson KC, Steven D, Seiler J, Inada K, Koplan BA, Tedrow UB, Epstein LM, Stevenson WG (2009): Coronary Artery Injury Due to Catheter Ablation in Adults Presentations and Outcomes. Circulation <u>120</u>, 1465-1473
- Rodriguez LM, Geller JC, Tse HF, Timmermans C, Reek S, Lee KL, Ayers GM, Lau CP, Klein HU, Crijns HZ (2002): Acute results of transvenous cryoablation of supraventricular tachycardia (atrial fibrillation, atrial flutter, Wolff-Parkinson-White syndrome, atrioventricular nodal reentry tachycardia). J Cardiovasc Electrophysiol <u>13</u>, 1082-1089
- Saul JP, Hulse JE, Papagiannis J, Van Praagh R Walsh EP (1994): Late enlargement of radiofrequency lesions in infant lambs. Implications for ablation procedures in small children. Circulation <u>90</u>, 492-499
- Schaffer MS, Gow RM, Moak JP, Saul JP (2000): Mortality following radiofrequency catheter ablation (from the Pediatric Radiofrequency Ablation Registry) Am J Cardiol <u>86</u>; 639-643
- Schmitt C, Deisehofer I, Zrenner B: Catheter Ablation of Cardiac Arrythmias: A Practical Approach. 1. Auflage; Steinkopff-Verlag Heidelberg 2006
- Schmitt C, Zrenner B, Schöming A (2002): Behandlung von Herzrhythmusstörungen: Neue dreidimensionale Mappingverfahren erweitern das therapeutische Spektrum. Dtsch Arztebl <u>99</u>, 562-569
- Schneider C: Das EPU Labor: Einführung in die invasive elektrophysiologische Untersuchung. 1. Auflage; Steinkopff-Verlag, Heidelberg 2005
- Schneider HE, Kriebel T, Gravenhorst VD, Paul T (2009): Incidence of coronary artery injury immediately after catheter ablation for supraventricular tachycardias in infants and children. Heart Rhythm <u>6</u>, 461-467

- Schneider HE, Stahl M, Kriebel T, Schillinger W, Schill M, Jakobi J, Paul T (2013): Double cryoenergy application (freeze-thaw-freeze) at growing myocardium: lesion volume and effects on coronary arteries early after energy application. Implications of efficacy and safety in pediatric patients. J Cardiovasc Electrophysiol <u>24</u>, 701-707
- Schumacher G, Hess J, Bühlmeyer K: Klinische Kinderkardiologie: Diagnostik und Therapie der angeborenen Herzfehler. 4. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2008
- Schwagten B, Van Belle Y, Jordaens L (2010): Cryoablation: how to improve results in atrioventricular nodal reentrant tachycardia ablation? Europace <u>12</u>, 1522-1525
- Skanes AC, Jones DL, Teefy P, Guiraudon C, Yee R, Krahn AD, Klein GJ (2004): Safety and feasibility of cryothermal ablation within the mid- and distal coronary sinus. J Cardiovasc Electrophysiol <u>15</u>, 1319-1323
- Solomon AJ, Tracy CM, Swartz JF, Reagan KM, Karasik PE, Fletcher RD (1993): Effects on coronary anatomy of radiofrequency catheter ablation of atrial insertion sites of accessory pathways. J Am Coll Cardiol <u>21</u>, 1440-1444
- Stavrakis S, Jackman WM, Nakagawa H, Sun Y, Xu Q, Beckman KJ, Lockwood D, Scherlag BJ, Lazzara R, Po SS (2014): Risk of coronary artery injury with radiofrequency ablation and cryoablation of epicardial posteroseptal accessory pathways within the coronary venous system. Circ Arrhythm Electrophysiol <u>7</u>, 113-119
- Strobel GG, Trehan S, Compton S, Judd VE, Day RW, Etheridge SP (2001): Successful pediatric stenting of a nonthrombotic coronary occlusion as a complication of radiofrequency catheter ablation. Pacing Clin Electrophysiol <u>24</u>, 1026-1028
- Sturm M, Hausmann D, Bokenkamp R, Bertram H, Wibbelt G, Paul T (2004): Incidence and time course of intimal plaque formation in the right coronary artery after radiofrequency current application detected by intracoronary ultrasound. Z Kardiol <u>93</u>, 884-889
- Ulmer HE: Herzrhythmusstörungen im Kindesalter: angeboren, erworben, vererbt Was Eltern davon wissen sollten. Sonderdruck <u>14</u> hrsg v. Deutsche Herzstiftung, Dannstadt 2003
- Van Hare GF, Javitz H, Carmelli D, Saul JP, Tanel RE, Fischbach PS, Kanter RJ, Schaffer M, Dunnigan A, Colan S, Serwer G (2004), Prospective Assessment after Pediatric Cardiac Ablation: Demographics, Medical Profiles, and Initial Outcomes. J Cardiovasc Electrophysiol <u>15</u>, 759-770
- Wittkampf FH, Wever EF, Derksen R, Wilde AA, Ramanna H, Hauer RN, Robles de Medina EO (1999): LocaLisa: new technique for real-time 3-dimensional localization of regular intracardiac electrodes. Circulation <u>99</u>, 1312-1317
- Ziemer G, Haverich A: Herzchirurgie: Die Eingriffe am Herzen und an den herznahen Gefäßen. 3. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2010

# Danksagung

Besonders danken möchte ich an erster Stelle meiner Doktormutter PD Dr. med. Heike Schneider, für Ihre Unterstützung und Geduld, aber auch für die persönliche Betreuung.

Des Weiteren gilt mein Dank dem Team des Labors der Kinderkardiologie der Georg-August Universitätsklinik Göttingen, die mir jederzeit zur Hilfe beiseite standen und die Zeit der Laborarbeit auch persönlich für mich sehr bereichert haben.

Für die anfängliche Betreuung meiner Arbeit danke ich zudem Prof. Dr. med. Thomas Paul.

# Lebenslauf

Mein Name ist Nehle Ehritt, geb. Gröne, ich bin am 20. August 1988 in Düsseldorf geboren. Von 1999-2008 besuchte ich das Erzbischöflichen Suitbertus-Gymnasium in Düsseldorf und schloss dort meine Schulausbildung mit dem Abitur ab.

Bereits während meiner Schulzeit entwickelte ich Interesse an der Medizin und absolvierte im Rahmen von Wochenendschulungen die Sanitätsdienstausbildung A/B vom DRK.

2008 begann ich mein Studium an der Universität Szeged in Ungarn, wo ich 2011 mein Physikum absolvierte. Während eines Wartesemesters zwischen Physikum und klinischen Teil des Medizinstudiums begann ich meine Dissertation in der kinderkardiologischen Abteilung der Universität Göttingen.

Da ich an der Universität Göttingen keinen Studienplatz für den klinischen Abschnitt des Medizinstudiums bekam, wechselte ich zum Wintersemester 2012 an die Universität Rostock.

Im Jahr 2015 vollendete ich dort das Medizinstudium und begann im Februar 2016 meine Facharztausbildung in der Kinderklinik des Städtischen Klinikums Solingen.

Um einen tieferen Einblick in die verschiedenen Krankheitsbilder zu bekommen, wechselte ich 2019 an die Kinderklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf und arbeitete dort als Assistenzärztin der Pädiatrie bis Ende des Jahren 2020.

Seit Januar 2021 bin ich in der Praxis "Kinderärzte am Zoo" in Köln angestellt.

In den Jahren 2019 bis 2021 bildete ich mich zudem im Fach der Notfallmedizin fort und absolvierte im Februar 2021 erfolgreich die Prüfung zur Zusatzbezeichnung Notfallmedizin.