

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

**Einfluss einer modifizierten Form der Kryoenergieapplikation auf die Formation von
Ablationsläsionen und die Koronarperfusion am wachsenden Myokard**

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

vorgelegt von
Johannes Felix Jakobi
aus
Gießen

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent/in: Prof. Dr. Thomas Paul

Ko-Referent/in: Prof. Dr. Lars Lüthje

Drittreferent/in: Prof. Dr. Margarete Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Einführung</i>	1
1.2	<i>Physiologische Herzaktion und Reizleitung</i>	1
1.3	<i>Supraventrikuläre Tachykardien</i>	2
1.3.1	Pathomechanismus bei einer AVRT mit akzessorischer Leitungsbahn	2
1.4	<i>Therapie</i>	3
1.4.1	Historischer Rückblick	3
1.4.2	Ablationsverfahren als Therapieoption zur Behandlung von SVT.....	4
1.4.2.1	Radiofrequenzstromablation	5
1.4.2.2	Kryoenergieablation.....	5
1.4.2.3	Einschränkungen der Kryoablationsanwendung.....	7
1.4.2.4	Serielle Ablationen.....	7
1.5	<i>Unerwünschte Nebenwirkungen von Katheterablationen</i>	7
1.5.1	Koronaraffektion.....	8
1.5.2	Thromboembolische Komplikationen	9
1.5.3	Iatrogen hervorgerufene Rhythmusstörungen	10
1.6	<i>Fragestellung und Zielsetzung der Dissertation</i>	10
2	Tiere, Material und Methoden	11
2.1	<i>Tiermodell</i>	11
2.2	<i>Methoden</i>	11
2.2.1	Tierexperimenteller Teil	11
2.2.1.1	Vorbereitung und Anästhesie.....	11
2.2.1.2	Doppelte Kryoablation.....	12
2.2.1.3	Untersuchungen der Koronararterien.....	14
2.2.2	Herzentnahme	15
2.2.3	Makroskopische Untersuchung	15
2.2.4	Histologische Aufarbeitung	16
2.2.4.1	Histologische Färbungen	17
2.2.4.2	Färbetechniken	18
2.2.5	Mikroskopische Untersuchungen	21
2.2.5.1	Planimetrie	21
2.2.5.2	Volumetrie	21
2.2.6	Statistische Auswertung.....	22
3	Ergebnisse	23
3.1	<i>Kryoenergieapplikation und selektive Koronarangiographie</i>	23
3.2	<i>Intrakoronare Ultraschalluntersuchung der Koronararterien</i>	24

3.3	<i>Makroskopische Darstellung der Läsionen nach doppelter Kryoablation</i>	25
3.4	<i>Mikroskopische Auswertung</i>	27
3.4.1	Histologische Darstellung der Kryoenergieläsionen	27
3.4.2	Histologische Untersuchung der KoronargefäÙe	29
3.4.3	Thrombusformation	33
3.5	<i>Planimetrie und Volumetrie</i>	35
3.6	<i>Statistische Analyse</i>	38
4	Diskussion	41
4.1	<i>Unerwünschte Nebenwirkungen nach Katheterablation</i>	41
4.1.1	Koronaraffektion	41
4.1.2	Thrombusformationsbildung nach Katheterablation	43
4.1.3	Läsionscharakteristika und Mechanismen der Gewebsverletzung	43
4.2	<i>Morphometrische Analyse</i>	44
4.2.1	Läsionsvolumina im Vergleich der unterschiedlichen Energiemodalitäten	44
4.2.2	Tiefenausdehnung von Kryoablationsläsionen.....	46
4.3	<i>Klinische Bedeutung</i>	47
4.3.1	Anatomische Regionen mit erhöhtem Komplikationsrisiko	47
4.3.2	Klinische Konsequenz	49
4.4	<i>Zukünftige Forschungsrichtungen und alternative Therapieoptionen</i>	49
4.5	<i>Limitationen</i>	50
5	Zusammenfassung	53
6	Literaturverzeichnis	55
7	Abbildungsverzeichnis	63
8	Tabellenverzeichnis	64

Abkürzungsverzeichnis

A	Atrium
A. dest.	Destilliertes Wasser
Ad	Adventitia
AK	Antikörper
AV	Atrio-ventrikulär
AVNRT	AV-Knoten-Reentry-Tachykardie
AVRT	Atrio-ventrikulär-Reentry-Tachykardie
DAB	Diaminobenzidin
EKG	Elektrokardiogramm
Epi	Epikardium
EPU	elektrophysiologische Untersuchung
F	French
FAT	fokale atriale Tachykardie
h	Stunde
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
I	Intima
ICUS	intrakoronare Ultraschalluntersuchung
IE	Internationale Einheit
JET	junktionale ektope Tachykardie
kHz	Kilohertz
Koro	Koronararterie
Kryo	Kryoenergie
LAO	links anteriore oblique Projektion
M	Media
max	maximal
MHz	Megahertz
Min	Minuten
min	minimal
MK	Mitralklappe
PJRT	permanente junktionale Reentry-Tachykardie
RAO	rechts anteriore oblique Projektion
RCA	rechte Koronararterie

RCX	Ramus circumflexus
RF	Radiofrequenz
RFA	Radiofrequenzstrom-Ablation
RIVA	Ramus interventrikularis anterior
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SVT	supraventrikuläre Tachykardie
TK	Trikuspidalklappe
TTBS	Tris-Puffer-Lösung
V	Ventrikel
VT	ventrikuläre Tachykardie
WPW	Wolff-Parkinson-White
x	-fach

1 Einleitung

1.1 Einführung

Tachykarde Rhythmusstörungen können hinsichtlich der anatomischen Ursprungsregion in supraventrikuläre Tachykardien (SVT) und ventrikuläre Tachykardien (VT) eingeteilt werden. SVT können durch akzessorische atrioventrikuläre Leitungsbahnen bedingt sein. In diesem Falle besteht ein kurativer Therapieansatz in der Unterbrechung der akzessorischen Leitungsbahnen durch den Einsatz von kathetergesteuerten Ablationsanwendungen auf das Myokard. Hierbei werden gezielt Gewebläsionen erzeugt, die zu einer elektrischen Unterbrechung der akzessorischen Leitungsbahnen führen.

Seit 2005 wird in der Klinik für Pädiatrische Kardiologie und Intensivmedizin der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Paul neben dem bereits etablierten Radiofrequenzstromablationsverfahren die Kryoenergieablationstechnik angewendet. Abhängig von der genutzten Ablationstechnik ergeben sich Unterschiede in der Erfolgsrate und dem Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen. In der vorliegenden experimentellen Studie wurden die akuten Auswirkungen einer doppelten Kryoablationsanwendung auf das wachsende Myokard und die Auswirkung auf die Koronarperfusion untersucht.

1.2 Physiologische Herzaktion und Reizleitung

Das Erregungsbildungs- und Leitungssystem des Herzen besteht aus spezialisierten Herzmuskelzellen. Physiologischer Taktgeber der Herzaktion ist der Sinusknoten, der im Bereich der Einmündungsstelle der oberen Hohlvene im rechten Vorhof lokalisiert ist. Durch die hohe spontane Depolarisation der speziellen Myokardzellen nimmt der Sinusknoten die Schrittmacherfunktion ein. Die Erregung breitet sich über das Vorhofmyokard zum AV-Knoten aus, der sich im sog. Koch-Dreieck in der Wand zwischen rechtem und linkem Vorhof befindet. Distal des AV-Knotens wird die Erregung weiter auf das wenige Millimeter große His-Bündel übertragen und wird hier als einzig mögliche Stelle vom Vorhofbereich auf die Kammer Ebene übergeleitet. Die elektrischen Bahnen setzen sich über die Tawara-Schenkel und die Purkinje-Fasern fort und erzeugen eine Kontraktion des Arbeitsmyokards. Am gesunden Herzen wird durch das bindegewebige Herzskelett eine Isolation der

elektrischen Erregungsausbreitung gewährleistet. Somit kann die Überleitung nur an anatomisch streng vorgegebenen Strukturen des spezifischen Reizleitungssystems erfolgen.

1.3 Supraventrikuläre Tachykardien

Aktuelle Studien geben für das Auftreten von SVT eine Prävalenz von 2,25/1000 Personen an. Bei Patienten unter 19 Jahren geht man dabei von einer jährlichen Inzidenz von 13/100000 aus (Brugada et al. 2013). Die häufigste Form der SVT im Kindesalter ist die atrioventrikuläre Reentrytachykardie (AVRT) (Kriebel et al. 2007). Daneben stellen die AV-Knoten-Reentrytachykardie (AVNRT), die permanente Form der junctionalen Reentry-Tachykardie (PJRT) und seltener die fokale atriale Tachykardie (FAT) mit gesteigerter Autonomie im Sinne eines ektopen Reizbildners weitere häufige Formen von SVT im Kindes- und Jugendalter dar (Brugada et al. 2013; Kriebel et al. 2007; Lindinger et al. 1998).

1.3.1 Pathomechanismus bei einer AVRT mit akzessorischer Leitungsbahn

Die AVRT beruht auf einer kreisenden Erregung zwischen Herzvorhof und Herzkammer, die durch eine akzessorische atrioventrikuläre Leitungsbahn entsteht. Diese akzessorischen Leitungsbahnen bestehen aus Myokardgewebe und verbinden im Bereich der AV-Klappenebene das Vorhof- mit dem Ventrikelmyokard (Basso et al. 2001).

Je nach Richtungsablauf der elektrischen Weiterleitung in der SVT unterscheidet man eine orthodrome und eine antidrome Form. Bei der orthodromen Form (ca. 80 %) erfolgt die antegrade Leitung vom Vorhof zur Kammer über den AV-Knoten und die retrograde Leitung von der Kammer zurück zum Vorhof über die akzessorische Leitungsbahn. Bei der antidromen Form erfolgt die Erregungsleitung vom Vorhof auf die Kammer über die akzessorische Bahn mit Rückleitung über den AV-Knoten.

Bei einer antegrad leitenden akzessorischen Leitungsbahn in Kombination mit einer SVT spricht man von einem Wolff-Parkinson-White-Syndrom. Die Überleitung erfolgt im SR über die akzessorische Bahn sowie über den AV-Knoten. Dieses Phänomen wird als Präexzitation bezeichnet. Da die Leitungsbahn keine Leitungsverzögerung verursacht, kommt es zur vorzeitigen Erregung des Ventrikelmyokards. Dies spiegelt sich im Oberflächen EKG als verkürzte PQ-Zeit wider. Durch die vorzeitige Erregungsausbreitung im Ventrikelmyokard kommt es initial zu einer trägen Anstiegssteilheit des QRS-Komplexes, der Delta-Welle. Der QRS-Komplex ist schließlich eine Fusion der Erregungsfronten über die Leitungsbahn und den AV-Knoten (Brugada et al. 2013; Schumacher et al. 2008).

Seltenere Formen akzessorischer Leitungsbahnen-bedingter Tachykardien sind die permanente junctionale Reentrytachykardie (PJRT) oder die Überleitung über Mahaim-Fasern.

Typische Symptome einer Reentrytachykardie im Kindesalter sind Palpitation, Schwindel, Unwohlsein und körperliche Erschöpfung. Bei lange bestehenden Tachykardien kann sich eine Kardiomyopathie entwickeln. Darüber hinaus besteht beim WPW-Syndrom die Gefahr eines plötzlichen Herztodes, da sich im Falle einer schnellen Überleitung über eine akzessorische Leitungsbahn aus einem Vorhofflimmern ein Kammerflimmern entwickeln kann (Brugada et al. 2013; Schumacher et al. 2008).

1.4 Therapie

Zur akuten Behandlung von SVT stehen symptomatischen Therapiemaßnahmen zur Verfügung. Demgegenüber stellen interventionelle Eingriffe einen kausalen Therapieansatz dar. Bei der Ablationstherapie werden die akzessorischen Leitungsbahnen durch Verödung mit nachfolgender Narbenbildung im Gewebe unterbrochen.

Bei der Wahl der Therapie sind unter anderem die individuelle Prognose und die jeweilige Altersklasse der Patienten entscheidend. Da innerhalb des ersten Lebensjahrs eine Spontanremission von SVT eintreten kann, sollte eine medikamentöse Therapie in Erwägung gezogen werden (Kriebel et al. 2007; Perry und Garson 1990). Ab dem Schulkindalter ist ein spontanes Sistieren seltener zu erwarten, sodass der kurative Therapieansatz durch eine Katheterablation im Vordergrund steht (Kriebel et al. 2007; Perry und Garson 1990).

Für die Behandlung von Herzrhythmusstörungen in der Kinderheilkunde sollte beachtet werden, dass sich Unterschiede zu der Therapie in der Erwachsenenmedizin ergeben. Besonderheiten finden sich in der Anatomie aufgrund deutlich kleinerer Strukturen. Einen weiteren Unterschied stellt das sich im Wachstum befindende Gewebe dar. Langzeitfolgen können sich anders auswirken als an einem ausgewachsenem Organ.

1.4.1 Historischer Rückblick

Herzrhythmusstörungen im Kindesalter wurden bereits im 18. Jahrhundert beschrieben. Soweit bekannt, wurden Vagusreize oder Digitalispräparate als erste Therapieansätze eingesetzt (Schumacher et al. 2008).

Seit den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurden chirurgische Eingriffe durchgeführt, bei denen eine operative Durchtrennung der pathologischen Korrelate am Herzen erfolgte. Hierbei wurden oberflächliche Gewebestücke im Bereich des Annulus fibrosus mittels Skalpell durchtrennt (Sealy und Gallagher 1981). Trotz Erfolgen konnte sich dieses Verfahren nicht als Therapie der ersten Wahl etablieren, da es bedingt durch die notwendige Thorakotomie zu beträchtlichen Schmerzen und operationsbedingter Letalität kam (Cox et al. 1985; Ruskin 1991). In einer Veröffentlichung aus den 90er Jahren untersuchten Cox et al. die Folgen eines operativen Therapieansatzes bei 118 Patienten mit WPW-Syndrom. Hierbei wurde in 99,3 % eine erfolgreiche Unterbrechung der akzessorischen Leitungsbahnen erreicht, jedoch verstarb ein Patient (0,8 %) an den Folgen der Operation (Cox et al. 1985).

Die Anfänge der Ablationsbehandlung ergaben sich 1979 durch eine akzidentielle Anwendung bei einer elektrophysiologischen Untersuchung (EPU), bei der versehentlich eine Gleichstromapplikation im Bereich des His-Bündels zu einer Induktion eines kompletten AV-Blocks führte (Vedel et al. 1976). Zudem beobachtete die Arbeitsgruppe von Lavergne et al. nach Kardioversionen an Tiermodellen, dass es durch die Strominduktion zu Myokardläsionen kam, die Einfluss auf die Erregungsleitung nahmen (Lavergne et al. 1986).

Die Technik der Gleichstromapplikation wurde im weiteren Verlauf zu einem Radiofrequenzablationsverfahren weiterentwickelt. Borggrefe et al. beschrieben 1987 erstmals eine Radiofrequenzablation zur erfolgreichen Unterbrechung von akzessorischen Leitungsbahnen beim Menschen (Borggrefe et al. 1987).

1.4.2 Ablationsverfahren als Therapieoption zur Behandlung von SVT

Katheterablationen stellen heutzutage eine sinnvolle und kausale Therapie von symptomatischen SVT dar und sind bei kinder-kardiologischen und erwachsenen Patienten fester Bestandteil in der Therapie von Herzrhythmusstörungen (Friedman et al. 2004; Kriebel et al. 2007; Kuck et al. 2007).

Um die akzessorischen Bahnen zu lokalisieren, nutzt man elektrophysiologische Untersuchung, bei denen Elektrodenkatheter an verschiedenen Stellen innerhalb des Herzens platziert werden. Durch Ableitung von intrakardialen Elektrokardiogrammen oder nach Stimulation über die Elektrodenkatheter können die Ursprünge und die Verläufe der pathologischen Leitungsbahnen identifiziert werden. Die Ablation führt zu einer Myokardnarbe, mit der eine Unterbrechung der elektrischen Leitung über akzessorische

Bahnen beabsichtigt wird. Vorteil von Ablationsbehandlungen ist es, dass es sich um kausale Behandlungseingriffe handelt und keine weitere postinterventionelle Therapie wie eine lebenslange Einnahme von antiarrhythmischen Medikamenten notwendig wird.

1.4.2.1 Radiofrequenzstromablation

Die führende kausale Therapie zur Behandlung von akzessorischen atrioventrikulären Leitungsbahnen stellt derzeit die Ablation mittels Radiofrequenzenergie dar. Gründe dafür finden sich in einer hohen Erfolgsrate von über 90 % und langjährigen klinischen Erfahrung (Brugada et al. 2013; Morady 2004).

Zur Unterbrechung der akzessorischen Leitungsbahnen wird im unipolaren Modus Radiofrequenzenergie (300 – 500 kHz) über spezielle Applikationskatheter auf das Herzgewebe abgegeben. Durch eine Gegenelektrode, die z.B. am Rücken des Patienten angebracht wird, entsteht die maximale Energiedichte an der Katheterspitze. Diese gebündelte Energie kann in Form einer Hitzeabgabe mit einer maximalen Solltemperatur von ca. 50 – 65 °C Läsionen im Gewebe hervorrufen. Die resultierende Gewebsnarbe führt zu einer Unterbrechung der elektrischen Weiterleitung. Die Komplikationsrate bei RFA ist gering, jedoch können in seltenen Fällen schwerwiegende Nebenwirkungen auftreten (siehe Kapitel 1.5 Unerwünschte Nebenwirkungen von Katheterablationen) (Brugada et al. 2013).

1.4.2.2 Kryoenergieablation

Gegenüber Radiofrequenzablation hat sich in den letzten Jahren das Kryoenergieablationsverfahren zu einer effektiven und sicheren Alternative entwickelt (Kriebel et al. 2005; Kriebel et al. 2007; Miyazaki et al. 2005). Im Gegensatz zur RFA, die mit Hitzeapplikation Läsionen erzeugt, wird bei der Kryoenergie-technik eine Kälteinduktion genutzt, um eine Gewebsnarbe zur Unterbrechung der Leitungsbahnen hervorzurufen. Dabei nutzt man die physikalischen Eigenschaften von Gasen wie Stickstoff, bei denen es durch Druckverminderung zur Änderung der Siedepunkte kommt. Durch Verwendung von Kryoenergie-Konsolen können die physikalischen Prozesse und die Temperaturabgabe reguliert werden.

Bevor das Herzgewebe irreversibel geschädigt wird, lässt sich die Katheterspitze kontrolliert auf -30 °C abkühlen und friert so am Endokard an. Durch den Anfriervorgang an das Herzgewebe wird die Katheterspitze fixiert und es kann ein unerwünschtes Verrutschen vermieden werden (Friedman et al. 2004; Skanes et al. 2000). Trotz der kontinuierlichen Bewegungen aufgrund von Herzaktivität und Atemexkursionen kann so eine Dislokation der

Katheterspitze verhindert und die Sicherheit und Präzision der Applikation erhöht werden (Dubuc et al. 1999; Miyazaki et al. 2005; Rodriguez et al. 1998; Skanes et al. 2002).

Durch das Abkühlen des Gewebes auf zunächst -30 °C kann der potentielle Therapieerfolg an der jeweiligen Applikationsstelle überprüft werden. Der Kälteeffekt führt zu einer reversiblen Abnahme der Leitungsfähigkeit des Zellverbundes und kann eine Terminierung der Arrhythmie bewirken. Durch den reversiblen Effekt kann die bestmögliche Ablationsposition gefunden werden. Sobald sich Hinweise für Komplikationen oder ein Ausbleiben des potentiellen Therapieerfolgs zeigen, kann die Anwendung abgebrochen werden, wonach das Gewebe ohne Folgeschäden wieder auftaut (Brugada et al. 2013; Dubuc et al. 1999). Dieses Vorgehen wird als Kryomapping bezeichnet. Durch weitere Abkühlung auf die maximale Endtemperatur von ca. -75 °C wird das Herzgewebe irreversibel geschädigt. Durch den Kälteeffekt kommt es an der Katheterspitze zu einer vorübergehenden Eisformation mit Apoptose- und Nekroseinduktion im Gewebe. Die Eisformationen können für eine kurze Dauer zu einer Kompression der Koronararterien führen. Dieses Phänomen kann im intrakoronaren Ultraschall (ICUS) als sogenannter *ice ball* imponieren, der sich an der Läsion zugewandten Seite des Gefäßes befindet. Aoyama et al. beobachteten nach Kryoablationen Eisformationen in den Koronarien bei 13 von 16 Hunden, die sich jeweils durch die physiologische Erwärmung des Körpers innerhalb weniger Sekunden (4 bis 15 Sekunden; im Mittel 7 Sekunden) auflösten. Im Anschluss zeigten sich im intrakoronaren Ultraschall normale Lumina der Gefäße (Aoyama et al. 2005).

Auf die Induktion der Kälteenergie und das folgenden Auftauen reagiert der Organismus mit Hämorrhagien, Entzündungsreaktionen und fibrösem Umbau (Holman et al. 1983; Lustgarten et al. 1999; Mazur 1970). Die genauen histopathologischen Auswirkungen und zellulären Reparationsvorgänge nach Ablationsanwendungen auf das wachsende Myokard sind derzeit im Detail nicht genau bekannt. Makroskopisch und mikroskopisch stellten sich die Kryoenergieläsionen in vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe als glatt begrenzte Läsionen dar (Kriebel et al. 2009).

Gegenüber RFA kann durch das Kryomapping eine erhöhte Sicherheit von Ablationsanwendungen erreicht werden. Insbesondere bei Ablation in enger Nachbarschaft zu kritischen Strukturen wie z.B. am AV-Knoten oder bei nahe verlaufenden Herzkranzgefäßen kann die Kryoablation bei Hinweisen für Komplikationen abgebrochen werden.

1.4.2.3 Einschränkungen der Kryoablationsanwendung

Nachteile des Kryoenergieverfahrens gegenüber der RFA zur Therapie von SVT sind momentan eine niedrigere Erfolgsrate mit 62 – 92 % und eine erhöhte Rezidivrate von 7 - 29 % (Brugada et al 2013). Der klinische Einsatz der Kryoenergie wird daher von vielen Arbeitsgruppen auf anatomische Regionen, die mit erhöhtem Risiko für eine Koronararterienverletzung oder das Auftreten eines AV-Blocks behaftet sind, beschränkt (Kriebel et al. 2009).

1.4.2.4 Serielle Ablationen

In verschiedenen Studien wurde eine Volumenzunahme der Läsionen durch zusätzliche Sicherheits- oder „Bonusablationen“ beschrieben (Collins et al. 2007; Drago et al. 2006; Dubuc et al. 1999; Khairy et al. 2011; Kriebel et al. 2005; Papez et al. 2006; Reents et al. 2012; Skanes et al. 2000). Weitere Experimente an unterschiedlichen Geweben wie Haut, Leber oder Prostata bestätigten die Annahme über eine größere Läsionsausbreitung nach seriellen Kryoablationen (Baust et al. 2012; Berth-Jones et al. 1994; Galanty und Lechowski 1994; Nordin et al. 1997; Pisters et al. 1997).

Nach einfacher Kryoenergieablation wurde eine höhere Rezidivquote als nach RFA beschrieben (Drago et al. 2006; Khairy et al. 2011; Kriebel et al. 2005; Reents et al. 2012).

In der vorliegenden Studie wurde ein doppelter Anfrier-Zyklus gewählt. Es besteht die Hypothese, dass durch die zusätzliche Ablation eine größere Läsionsausbreitung innerhalb des wachsenden Myokards entsteht. Durch die Zunahme der Läsionsvolumina kann sich die Wahrscheinlichkeit pathologische Leitungsbahnen zu unterbrechen erhöhen. Über die potentielle Steigerung der Effektivität durch den Einsatz von doppelten Kryoenergieablationen im klinischen Einsatz besteht aktuell ein Mangel an experimentell erhobenen Daten über die Läsionscharakteristika sowie von klinisch vergleichbaren Studienergebnissen. Es besteht die Möglichkeit, dass sich nach doppelter Applikation höhere Risiken für Komplikationen ergeben. In der vorliegenden Studie erfolgte eine Überprüfung von unerwünschten Nebenwirkungen nach doppelter Kryoenergieapplikation auf wachsendes Myokard unter detaillierter Analyse der akuten Auswirkungen auf die Koronarperfusion.

1.5 Unerwünschte Nebenwirkungen von Katheterablationen

In einer zusammenfassenden Veröffentlichung aus dem Jahr 2013 berichteten Brugada et al. über eine Prävalenz von 3 – 4,2 % unerwünschter Nebenwirkungen, die bei pädiatrischen Patienten nach RFA auftraten (Brugada et al. 2013). Hauptkomplikationen wurden dabei in

Form von Koronaraffektionen, thromboembolischen Ereignissen, Perforationen, Perikardergüssen und Blockierung der AV-Überleitung beschrieben (Brugada et al. 2013; Deisenhofer et al. 2010). Dass die Komplikationen einen letalen Ausgang nehmen können, wurde in einer Studie von Schaffer et al. verdeutlicht. Bei einem Kollektiv von 4092 Kindern (im Alter von 0,1 bis 13,3 Jahren) traten bei 5 Patienten (0.12%) nach RFA tödliche Komplikationen auf. Als Todesursache wurde Myokardperforation, Perikarderguss, thromboembolische Ereignisse und ventrikuläre Arrhythmien angegeben (Schaffer et al. 2000).

Blaufox et al. beschrieben, dass ein Körpergewicht von unter 15 kg mit einer erhöhten Komplikationsrate nach Radiofrequenzablationen assoziiert war (Blaufox et al. 2004).

1.5.1 Koronaraffektion

In einer Studie unsere Arbeitsgruppe wurde bei routinemäßig durchgeführten Koronarangiographien bei Kindern und Jugendlichen mit SVT unmittelbar nach RFA eine geringfügige asymptotische Reduktion des Gefäßdurchmessers bei zwei von 117 (1,7 %) pädiatrischen Patienten beschrieben (Schneider et al. 2009).

Dass die Koronaraffektion nach Ablationsanwendungen eine ernstzunehmende Komplikation darstellt, verdeutlicht der Verlauf eines 13-jährigen Patienten, der drei Stunden nach erfolgreicher RFA einer akzessorischen Leitungsbahn an den Folgen des Verschlusses der linken Koronararterie verstarb. Bei einem weiteren 17-jährigen Jungen kam es ebenfalls nach Ablationsanwendung zu einer Koronararterienstenose mit tödlichem Ausgang (Kugler et al. 1997; Zhou et al. 1999).

Sobald Ablationen in enger Nachbarschaft zu Koronargefäßen gesetzt werden, besteht das Risiko, dass durch die Manipulation Gewebsläsionen mit Beteiligung der Gefäßwände entstehen. Dabei können reaktive Koronarspasmen auftreten oder die Gefäßwände in dem Maße verletzt werden, dass sich innerhalb der Gefäßwände durch Gewebsproliferation Stenosen mit kritischer Minderperfusion des Myokards ergeben. Dies verdeutlicht eine Veröffentlichung von Paul et al., in der die Auswirkungen auf die Koronararterien nach RFA histologisch an einem Tiermodell untersucht wurden (Paul et al. 1997). Dabei traten sechs Monate nach RFA Proliferationen der Arterienwand in zwei von fünf Schweineherzen auf, die zu einer kritischen Lumeneinengung von 25 % und 40 % führten (Abbildung 1).



Abbildung 1: Wandproliferation nach RFA

Histologischer Anschnitt einer pathologisch veränderten rechten Koronararterie eines Schweins sechs Monate nach RFA: An der läsionszugewandten Seite (gelbe Markierung) fallen innerhalb der Intimawandabschnitte (I) sowie der Lamina media (M) deutliche Proliferationen des Zellverbundes auf. Durch die Proliferationsreaktionen wird eine Lumen-einengung (Pfeil) der rechten Koronararterie von ca. 40 % hervorgerufen (Paul et al., 1997).

1.5.2 Thromboembolische Komplikationen

Durch Ablationsanwendung kann das Endothel verletzt werden und sich thrombotisches Material anheften. Thrombusformationen können sich endokardial bilden oder innerhalb der Koronargefäße auftreten. Die Pathophysiologie bei der Entstehung von Thromben in den Herzkranzgefäßen lässt sich durch die Folgen des Ablationsvorgangs mit Radiofrequenzenergie erklären. Hierbei kommt es initial zu einer Schädigung des Endothels. Kongsgaard et al. beschrieben, dass der Zellverbund des Endothels hoch sensitiv für Verletzungen durch Radiofrequenzstrom war (Kongsgaard et al. 1994). Im Detail wird die Gerinnungskaskade durch die Intimaverletzung und folgende Freisetzung von subendothelialen Botenstoffen wie beispielsweise den Von-Willebrand-Faktor, Kollagen oder den Tissue Factor gestartet. Durch die Anheftung von Thrombozyten an die geschädigten Wandstrukturen und weitere Fibrinansammlung kann ein Thrombus entstehen, der je nach Größe und Lokalisation zu unerwünschten klinischen Folgekomplikationen führt (Lijnen und Collen).

Die Inzidenz von thromboembolischen Ereignissen nach RFA wurde von der Arbeitsgruppe von Zhou et al. auf 0,6 % bis 0,8 % geschätzt (Zhou et al. 1999).

In einer vorangegangenen tierexperimentellen Studie unsere Arbeitsgruppe fanden nach einfacher Kryoablation auf wachsendes Myokardgewebe vergleichbare histologische und angiographische Untersuchungen wie in der aktuellen Studie statt. Dabei wurde kein Auftreten von thromboembolischen Komplikationen beschrieben (Kriebel et al. 2009).

1.5.3 Iatrogen hervorgerufene Rhythmusstörungen

Durch Ablationsanwendungen mittels Radiofrequenzenergie können ungewollt physiologische Leitungsbahnen geschädigt werden. In der im Jahr 2013 erschienen Publikation von Brugada et al. wurde die Inzidenz eines AV-Block III° mit 1 – 2 % nach RFA angegeben (Brugada et al. 2013).

Durch das Kryomapping kann das Risiko eines AV-Blocks bei Kryoenergieablationen minimiert werden. Diese erhöhte Sicherheit zeigte sich in vergangenen klinischen und tierexperimentellen Anwendungen mit Kryoablation, wobei bisher keine Induktion eines permanenten AV-Blocks beobachtet wurde (Aoyama et al. 2005; Kriebel et al. 2009; Schneider et al. 2009).

1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Dissertation

Die vorliegende Studie zu den akuten Auswirkungen 48 Stunden nach doppelter Kryoenergieablation soll Daten für einen Vergleich gegenüber einfachen Kryoapplikationen sowie gegenüber Hochfrequenzstromablationen an einem bereits etablierten Schweinmodell aus vorangegangenen Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe liefern. Wir beabsichtigen zu untersuchen, ob sich die Annahme einer Volumenvergrößerung durch die zusätzliche Kryoablation an derselben Stelle bestätigt.

Durch makroskopische und detaillierte mikroskopische Untersuchungen der Läsionen mit exakter Vermessung der Volumina und der Tiefenausdehnung sollte eine verbesserte Einschätzung der Risiken und über die potentielle Effektivität der doppelten Kryoenergieablationen erzielt werden.

Um Rückschlüsse über die Sicherheit im Umgang mit doppelten Kryoenergieablationen zu erlangen, wurden neben den detaillierten mikroskopischen Untersuchungen die Koronararterien angiographisch und mittels intrakoronaren Ultraschalls untersucht.

Die Beantwortung dieser Fragen sollte wichtige Beiträge zur Indikationsstellung und Risikoabschätzung der Kryoenergieapplikationstechnik im Kindes- und Jugendalter leisten.

2 Tiere, Material und Methoden

2.1 Tiermodell

Aufgrund der großen anatomischen Ähnlichkeit von porcinem und menschlichem Herz fanden die Experimente an einem bereits etablierten Schweinmodell statt (Kriebel et al. 2005; Kriebel et al. 2009; Paul et al. 1997). Der experimentelle Versuchsablauf orientierte sich an vorherigen Studien, bei denen RFA und einfache Kryoenergieablationen am gleichen Tiermodell durchgeführt worden waren (Kriebel et al. 2005; Kriebel et al. 2009; Paul et al. 1997).

Insgesamt wurden in der Versuchsreihe fünf weibliche Schweine untersucht. Die Schweine vom Typ „Deutsche Landrasse“ hatten zum Zeitpunkt der experimentellen Kryoapplikation ein Körpergewicht von 15 bis 16 kg bei einem Alter von sechs bis sieben Wochen. Die Tiere waren artgerecht auf einem Versuchsgut in Holtensen (Niedersachsen) gehalten worden. Für die experimentellen Verfahren und weiteren Untersuchungen wurden die Schweine drei bis fünf Tage zuvor in die tierexperimentelle Abteilung der Universitätsmedizin Göttingen transportiert. Über den gesamten Zeitraum der Studie fand eine tierärztliche Betreuung statt.

Die Tierversuche für die vorliegende Studie wurden von der Bezirksregierung in Braunschweig unter dem Aktenzeichen 33.42502-04-031/07 genehmigt. Die ethischen Grundsätze des Weltärztebundes nach der Deklaration von Helsinki wurden befolgt.

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimenteller Teil

2.2.1.1 Vorbereitung und Anästhesie

Zur Prämedikation erhielten die Tiere intramuskulär 80 mg/kg Körpergewicht Azaperon (Strensil®, Jansen-Cilag, Neuss). Zur Narkoseeinleitung wurde über die Vena auricularis 0,1 mg/kg Körpergewicht Midazolam (Midazolam-Ratiopharm®, Ratiopharm GmbH, Ulm) und 1 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Ketamin-Ratiopharm, Ratiopharm GmbH, Ulm) verabreicht. Zur Aufrechterhaltung der Dauernarkose wurde eine Gasnarkose mit 2 %

Isofloran (Forene®, Abbott GmbH und Co. KG, Wiesbaden) und zusätzlich Propofol (Propofol-Lipuro®, Braun Melsungen AG, Melsungen) in der Dosierung 1 mg/kg Körpergewicht / Stunde genutzt. Als Narkosegerät diente das „Sulla 19“ ® der Firma Dräger (Drägerwerk AG, Lübeck). Der Narkoseverlauf wurde dokumentiert und die Vitalparameter überwacht.

Unter sterilen Bedingungen wurden ca. 10 mg des Lokalanästhetikums Lidocain (Xylocain, Astra Zeneca, Wedel) in den geplanten Punktionsort im Inguinalbereich injiziert. Mittels Seldinger-Technik wurden die Arteria und Vena femoralis punktiert. Für die weiteren Anwendungen wurden in den Gefäßen Schleusen platziert. Zur Antikoagulation wurden 100 IE/kg Körpergewicht Heparin (Heparin-Natrium, Ratiopharm GmbH, Ulm) verabreicht. Zusätzlich erhielten die Schweine eine einmalige intravenöse antibiotische Prophylaxe mit 50 mg Cephazolin pro kg Körpergewicht (Cepahazolin, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg).

Vor den Kryoenergieablationen wurden die Koronararterien der Schweine zu Beginn der Studie angiographisch untersucht. Hierfür wurden Angiographiekatheter der Größe vier French (5F Amplatzer oder 5F Judkins, Cordis, Roden, Niederlande) durch die Schleusen über die Leistengefäße weiter bis zum Herzen vorgeschoben. Nach Kontrastmittelgabe wurden die rechte und die linke Koronararterie selektiv dargestellt. Die Durchleuchtungen erfolgten in den Standardprojektionsebenen 30° RAO und 60° LAO mit einem mobilen Röntgengerät (BV Pulsera, Firma Phillips, Amsterdam, Niederlande). Die Aufnahmen wurden für die weiteren Analysen digital gespeichert (BV Pulsera, Philips, Amsterdam, Niederlande).

Zur Vermeidung von Adhäsionsthromben wurde den Tieren 100 Milligramm Aspirin per os verabreicht.

2.2.1.2 Doppelte Kryoablation

Für die Kryoenergieapplikationen wurde ein Kryoablationskatheter (7 F Freezor ® Xtra, Cryocath LP, Heerlen, Niederlande) verwendet, an den eine Cryocath-Konsole (Cryocath Technologies LP, Heerlen, Niederlande) angeschlossen wurde. Für die Ablationen an den atrialen und ventrikulären Ansätzen des Trikuspidalklappenannulus wurde der Kryoenergieapplikationskatheter über die venöse Schleuse der Vena femoralis über die untere Hohlvene in den rechten Vorhof bzw. in den rechten Ventrikel eingeführt. Die doppelten Kryoenergieablationen am atrialen und ventrikulären Ansatz des Mitralklappenannulus

fanden retrograd nach Vorbringen des Kryoablationskatheters über die arterielle Schleuse in die Aorta und weiter bis an die gewünschten Regionen der AV-Grube statt.

Die doppelten Kryoapplikationen erfolgten unter Röntgendurchleuchtung. Abbildung 2 stellt die enge anatomische Lagebeziehung, in der die Koronararterien zu den Applikationsarealen verlaufen, dar.

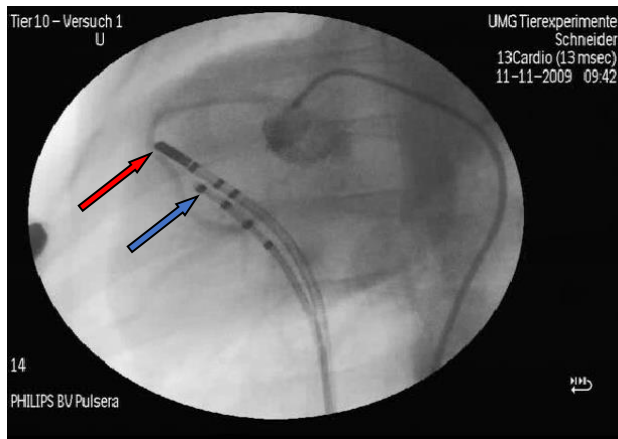
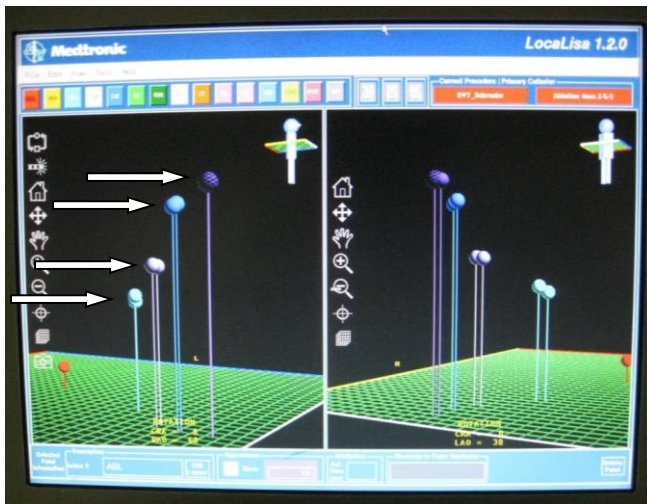


Abbildung 2: Durchleuchtungsaufnahme während einer Kryoenergieapplikation

Doppelte Kryoenergieapplikation am Trikuspidalklappenannulus: Der Ablationskatheter (roter Pfeil) wurde am Trikuspidalklappenannulus positioniert. Der zweite Katheter (blauer Pfeil) diente als Referenz für das Localisa-System. Zur genauen Lageposition wurde simultan eine selektive Injektion in die rechte Koronararterie durchgeführt. Diese dokumentiert die enge Lagebeziehung der Ablationsstelle zur rechten Koronararterie.

An der Spitze des Applikationskatheters befand sich ein Temperatursensor, der eine kontrollierte Energieabgabe ermöglichte und die gewählte Temperatur von -75 °C zum Zeitpunkt der Applikation dokumentierte. Das erste Anfrieren der doppelten Kryoablation erfolgte über eine Dauer von vier Minuten. Danach wurde das Gewebe für eine Minute aufgetaut, bevor im Anschluss ein erneutes vierminütiges Anfrieren erfolgte. Zur exakten Lokalisation für die Kälteapplikationen wurde das dreidimensionale Real-time Katheternavigationssystem Localisa® verwendet (Abbildung 3). Dieses ermöglicht eine Punktgenauigkeit von $1,4 \pm 1,1$ Millimeter innerhalb von zwei Stunden.



3D-Animation des Navigationssystems Localisa® (links 30° RAO, rechts 60° LAO). Jede doppelte Kryoläsion ist dabei durch eine eigene Farbmarkierung dargestellt (Pfeile auf der linken Bildhälfte). Hier wurden vier doppelte Kryoenergieläsionen am Trikuspidalklappenannulus dokumentiert.

Abbildung 3: 3D-Monitoring des Navigationssystems

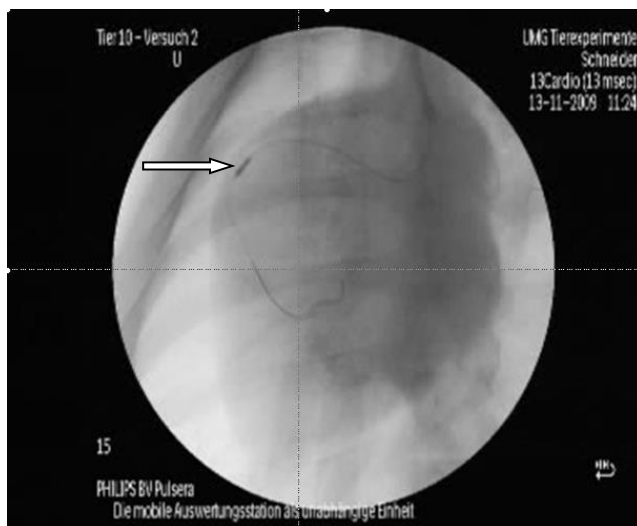
2.2.1.3 Untersuchungen der Koronararterien

30 Minuten nach den doppelten Kryoenergieablationen wurden die Koronararterien mittels selektiver Angiographie untersucht. Hierfür erfolgte eine Kontrastmittelgabe in die rechte und die linke Koronararterie mit anschließender Durchleuchtungen in den Standardprojektions-ebenen 30° RAO und 60° LAO.

Im Anschluss an die doppelten Kryoablationen und die invasiven Diagnostik konnten die Schweine aus der Narkose ausgeleitet und bei ausreichendem Wachheitszustand, Schutzreflexen sowie Spontanatmung extubiert werden. Sämtliche Katheter und Schleusen wurden entfernt. Um Blutungen zu stoppen, fand eine ca. ein- bis zweiminütige manuelle Kompression an den Punktionsregionen statt.

Weitere 48 Stunden nach den doppelten Kryoenergieablationen wurden die Koronararterien erneut angiographisch überprüft. Die Vorbereitungen und Intubationsnarkose erfolgten nach dem Schema, das vor den doppelten Kryoenergieablationen genutzt wurde. Ergänzend wurden die Herzen 48 Stunden nach Ablation mittels intrakoronaren Ultraschalls untersucht. Mit diesem Verfahren wurde die Wandstruktur der Koronararterien auf mögliche pathologische Veränderungen, Adhäsionsthromben oder Plaqueformationen überprüft. Zur Vorbeugung vor Koronarspasmen erhielten die Tiere prophylaktisch eine einmalige intracoronare Medikation von 0,2 – 0,3 mg Glycerolnitrat (Nitro lingual Infusion, Pohl-Bokamp GmbH und Co. KG, Hohenlockenstedt), das lokal über den Koronarkatheter in die

Koronarien injiziert wurde. Mit Hilfe eines 0,014 Inch starken Führungsdrahtes (High Torque, Balance Middleweight, Abbott, Diegem, Belgien) wurde ein 2,9 French starker Ultraschallkatheter (EagleEyeGold, Volcano Europe, Zaventem, Belgien) eingebracht (Abbildung 4). Bei den Ultraschalluntersuchungen wurde eine Frequenz von 20 MHz genutzt. Unter Durchleuchtungskontrolle wurde nach der Positionierung mit der Aufzeichnung begonnen. Hierzu wurde eine automatische Rückzugtechnik (Track back, EndoSonics Corporation, Rancho Cordova, Kalifornien, USA) mit Intervallen von jeweils einem Millimeter genutzt, bis die Katheterspitze das jeweilige Gefäßostium erreicht hatte. Die erhobenen Ultraschalldaten wurden an eine Konsole (EnsoSonics, Volcano Therapeutics Inc., Brüssel, Belgien) gesendet und digital gespeichert.



Röntgen-Aufnahme in 60° LAO-Projektion während einer ICUS-Untersuchung 48 Stunden nach doppelter Kryoablation. Die Ultraschallsonde (Pfeil) wurde über einen 0,014 Inch feinen Führungsdraht in die rechte Koronararterie vorgebracht.

Abbildung 4: Röntgen-Aufnahme während einer ICUS-Untersuchung

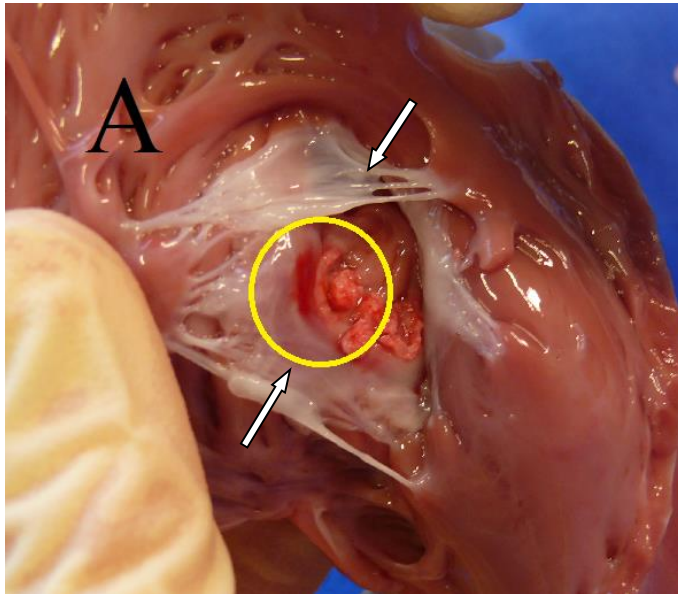
2.2.2 Herzentnahme

Anschließend an die angiographischen Untersuchungen erhielten die Schweine zusätzlich zur tiefen Allgemeinnarkose einen Bolus von 30 µg Fentanyl pro kg Körpergewicht (Janssen - Cilag GmbH, Neuss). Mittels Sternotomie wurde der Brustkorb geöffnet und das Perikard aufgetrennt. Nachdem an Aorta, Hohlvenen und Pulmonalgefäßen Ligaturen angelegt worden waren, konnten die großen Gefäße vom Herzen abgetrennt und das freipräparierte Herz komplett entnommen werden.

2.2.3 Makroskopische Untersuchung

Die entnommenen Herzen wurden unter Schonung relevanter anatomischer Strukturen vorsichtig eröffnet und nach makroskopisch sichtbaren Läsionen untersucht (Abbildung 5).

Die Läsionen erhielten eine Seriennummer, mit welcher sie abfotografiert wurden (Nikon D 5000, Digitalkamera). Es folgte ein orientierendes Vermessen der Läsionsausdehnung mittels Lineal. Die Ergebnisse und makroskopische Auffälligkeiten wurden dokumentiert.



Sicht auf ein eröffnetes Herz mit Anteilen der rechten Vorhofmuskulatur (A), Segel der Trikuspidalklappe (Pfeile) und Anteilen des rechten Ventrikelmyokards. Nach Auffinden der makroskopisch zu erkennenden Läsionen mit Einblutungen und irregulärer Oberflächenstruktur (innerhalb der gelben Markierung) wurde diese Region für die weiteren mikroskopischen Untersuchungen aus dem Herzen herauspräpariert.

Abbildung 5: Makroskopische Läsion

2.2.4 Histologische Aufarbeitung

Im Anschluss an die Herzentnahme wurden die jeweiligen Regionen, an denen die doppelten Kryoenergieablationen erfolgt waren, mit dem zugehörigen AV-Klappenannulus und Koronargefäßen aus dem Herz herauspräpariert und zur weiteren histologischen Analyse in 10 % Formalinlösung (Roti® Histofix, Carl Roth-GmbH und Co. KG, Karlsruhe) fixiert und über 48 Stunden in Paraffin (Parablast Plus®, Mc Cormick Scientific LLC, St. Louis, USA) eingebettet. Die Paraffineinbettung wurde an einem Gewebereinbettungsautomat (Shandon Citadel 1000 ® Shandon GmbH, Frankfurt am Main) durchgeführt (Tabelle 1).

Probengefäß	Lösung	Zeit
1	H ₂ O bzw. Ethanol 60 %	bis Start 3:00 h
2	Ethanol 70 %	01:00 h
3	Ethanol 80 %	01:00 h
4	Ethanol 96 %	01:00 h
5	Ethanol 100 %	01:00 h
6	Ethanol 100 %	01:00 h
7	Ethanol 100 %	01:00 h
8	Xylol	01:30 h
9	Xylol	01:30 h
10	Paraffin	01:00 h
11	Paraffin	01:00 h
12	Paraffin	03:00 h

Tabelle 1: Histologische Aufarbeitung mit aufsteigenden Alkoholreihen

Mit Hilfe von aufsteigenden Alkoholreihen konnte eine Entwässerung erreicht werden. Dazu wurden Ethanollösungen mit einer Konzentration von 60 bis 100 Prozent verwendet (Chemie Vertrieb Hannover GmbH und Co. KG, Hannover). Xylol (Carl Roth-GmbH und Co. KG, Karlsruhe) stellt hierbei ein Intermedium dar, das den Alkohol entzieht. Nach mehrfachem Eintauchen in geschmolzenes Paraffin konnten die Präparate in Einbettformen gegossen werden.

Um die Stabilität und Festigkeit für den Schneidevorgang zu erhöhen, wurden die Gewebeblöcke anschließend tiefgekühlt. Nach Härtung der würfelförmigen Blöcke konnten diese mit einem Rotationsmikrotom (RM 2165, Leica, Wetzlar) in fünf Mikrometer dünne Schnitte geschnitten werden. Zur histologischen Auswertung wurden die Schnitte jeweils auf einen Objektträger (Superfrost+ Objektträger, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) übertragen. Wie jeder Block erhielt auch jeder einzelne Schnitt eine fortlaufende Seriennummer, die jeweils auf der Label-Seite des Objektträgers notiert wurde. Hierdurch wurde eine Zuordnung zum Tier, zur Läsion, zum Block und zur Schnittfolge angefertigt.

2.2.4.1 Histologische Färbungen

Die fixierten Gewebeschnitte wurden alle 200 Mikrometer mittels Hämatoxylin-Eosin- und Elastika-van-Gieson-Lösung gefärbt. Zusätzlich wurden spezielle immunhistologische

Färbungen durchgeführt. Zur exakten Bestimmung der Ausbreitung der Läsionen wurde eine immunhistologische Färbetechnik genutzt, die eine Hervorhebung der Desminfilamente bewirkt. Desmin ist ein intermediäres Filament und ein spezifischer Marker für intakte und ausdifferenzierte Herz- und Skelettmuskelzellen (Mulisch und Romeis 2010).

2.2.4.2 Färbetechniken

Für die weitere histologische Aufarbeitung war eine Alkoholfixierung notwendig (Tabelle 2). Hierbei wurden die Schnitte mit absteigenden Alkoholreihen schrittweise entparaffiniert. Dieser Vorgang benötigte ein Lösungsmittel wie Alkohol oder Formalin.

Reihenfolge & Wiederholungen	Lösungsmittel	Dauer
3 x	Xylol	Je 8 Min.
2 x	100 % Alkohol	Je 5 Min.
1 x	96 % Alkohol	5 Min.
1 x	70 % Alkohol	5 Min.
1 x	50 % Alkohol	5 Min.
1 x	30 % Alkohol	5 Min.
1 x	entionisiertes H ₂ O	5 Min.

Tabelle 2: Histologische Aufarbeitung durch Alkoholfixierung

Für die immunhistologischen Färbungen war zusätzlich eine Entplattung nötig (Tabelle 3).

Anzahl	Substanz	Zeit
2-3x	Xylol	Je 20 Min.
1x	2-Methoxyethylacetat (MEA)	20 Min.
2x	Aceton	Je 5 Min.
1x	entionisiertes H ₂ O	5 Min.

Tabelle 3: Histologische Aufarbeitung durch Entplattung

Die speziellen Charakteristika der einzelnen Färbetechniken sind in Tabelle 4 – 6 aufgeführt.

Hämatoxylin-Eosin:

Anzahl	Substanz	Zeit
3 x	Hämalaunlösung sauer nach Mayer (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)	Je 3 Min.
1 x	fließendes Leitungswasser	6 Min.
1 x	entionisiertes H ₂ O	2 Min.
2 x	fünfprozentige Eosinlösung (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)	Je 2 Min.
1 x	entionisiertes H ₂ O	Spülen

Tabelle 4: Histologische Aufarbeitung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Elastika van Gieson:

Anzahl	Substanz	Zeit
1x	Elastin nach Weigert (Färbekit der Firma Merck, Darmstadt)	10 Min.
1 x	fließendes Leitungswasser	1 Min.
1 x	Weigert A & B 1:1 (Färbekit der Firma Merck, Darmstadt)	5 Min.
1 x	fließendes Leitungswasser	1 Min.
1 x	Pikrofuchsin-Lösung	2 Min.

Tabelle 5: Histologische Aufarbeitung der Elastika-van-Gieson-Färbung

Desmin:

Vorbehandlung	(s.u.)
Waschen	5 x 2 Min. TTBS
Blocken der endogenen Peroxidase	DAKO Peroxidase Blocking Reagent S001
Inkubation	RT 12 Min.
Waschen	5 x 2 Min. TTBS
Inkubation mit AK-Diluent	30 Min.
1. Antikörper	(s.u.)
Inkubation	4° C über Nacht
Waschen	5 x 2 Min. TTBS
2. Antikörper	(s.u.)
Inkubation	RT 60 Min.
Inkubation	RT 30 Min.
Waschen	5 x 2 Min. TTBS
Substrat-Chromogensystem	DAB frisch ansetzen: pro 1 ml Substrat 1 Tropfen Liquid DAB Chromogen, Inkubation 5 – 30 Min. unter Mikroskopkontrolle
Waschen	4 x 1 Min. A. dest., 1x 5 Min. A. dest.
Gegenfärbung	15 Sec. - 1 Min. Hämalaun 7 Min. fließendes Leitungswasser

Tabelle 6: Histologische Aufarbeitung der immunhistologischen Färbungen

Für die Desminfärbung war eine Vorbehandlung mit einem Puffer (Target-Retrieval-Puffer high pH) mit Inkubation im Dampfkochtopf bei 90 °C für 20 Minuten nötig. Als erster Antikörper wurde ein Maus-Antikörper (Monoclonal IgG, Progen No. 10519, Verdünnung 1:50, 32 µl AK + 1586 µl AK Diluent) verwendet, der bei 4 °C über Nacht inkubiert wurde. Anschließend fand eine Inkubation über 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper (Rabbit Anti Mouse Immunglobulin DAKO P0260, Verdünnung 1:100, 16 µl AK + 1584 µl AK Diluent) statt.

Als abschließender Schritt der histologischen Aufarbeitung folgte die Eindeckung mit Entellan® (Firma Merck, Darmstadt).

2.2.5 Mikroskopische Untersuchungen

Zur mikroskopischen Untersuchung wurde das Mikroskop BX51 der Firma Olympus (Olympus Life Science Europe GmbH) genutzt. An der mikroskopischen Vorrichtung waren Objektive mit zehnfach-, zwanzig- oder vierzigfacher Vergrößerung angebracht. Die mikroskopische Einheit ermöglichte das automatische Einscannen von bis zu maximal 50 Objektträgern pro Einlesevorgang (Bench-Einheit: motorised revolving nosepiece: BX-REMCB). Mittels Luftansaugvorrichtung wurden die Objektträger einzeln aus der Einheit per Roboterarm unter das Mikroskop befördert und nach dem Einscannen wieder zurückgelegt. An das Mikroskop war eine Kamera (Typ 1376 x 1032 pixel dotSlide camera) angeschlossen, die Bilderfolgen des Präparates abfotografierte und dem Programm „Dotslide 2,1“ der Firma Olympus (DP-Soft Archivierungssoftware F DP 10, Olympus, Hamburg) übermittelte. Das Programm fügte die entsprechenden Einzelbilder zu einer Einheit zusammen, die am Bildschirm eingesehen und bearbeitet werden konnte. Die Bilder wurden automatisch in einer Online-Datenbank gespeichert. Zu den Einstellungen am Computer zählte die Dokumentation der Schnittnamen mit Blocknummer, Schnittnummer und Färbetechnik, sodass zu jedem späteren Zeitpunkt eine richtige Zuordnung ermöglicht wurde.

2.2.5.1 Planimetrie

Die eingescannten Präparate konnten unter Zuhilfenahme des Programms „Dotslide“ (DP-Soft Archivierungssoftware F DP 10, Olympus, Hamburg) digital vermessen werden. Das Programm ermöglichte durch Öffnen mehrerer Schnitte nebeneinander einen optimalen Vergleich benachbarter Schnittflächen. Die Abgrenzung der Ablationsläsion ließ sich durch Setzen mehrerer Einzelpunkte markieren. Dadurch ergab sich ein Polygon, dessen Flächeninhalt automatisch berechnet wurde.

2.2.5.2 Volumetrie

Die Flächenmaße wurden in Quadratmikrometern angegeben und ließen sich via „Dotslide“ in ein Exceldokument (Microsoft) überführen. Zur Berechnung der Läsionvolumina wurde die Formel: Grundfläche * Höhe verwendet. Die Grundfläche entsprach der zuvor mit Dotslide gemessenen Fläche. Die Höhe betrug 200 Mikrometer, da die Schnitte im Abstand von jeweils fünf Mikrometern voneinander angefertigt wurden, jedoch nur jeder 40. Schnitt planimetrisch vermessen wurde ($40 * 5 \text{ Mikrometer} = 200 \text{ Mikrometer}$). Tabellarisch geordnet ließen sich anschließend die einzelnen Volumina durch die Formel $\sum_i (\text{Fläche}_i \times \text{Höhe}_i)$ (wobei i die entsprechende Anzahl an berechneten Anschnitten pro Läsion darstellt) zu einem Gesamtvolumen berechnen.

2.2.6 Statistische Auswertung

Bei den erhobenen Daten der Planimetrie und Volumetrie erfolgte, soweit nichts anders angegeben, die statistische Analyse mit Bestimmung der jeweiligen Mittelwerte, des Medians, der Minimal- und Maximalwerte, sowie eine Berechnungen der Standardabweichung.

Bei der Unterscheidung der Läsionslokalisationen zwischen Herzvorhof und Herzkammer interessierte, ob signifikante Unterschiede in der Läsionsausdehnung oder der Rate von unerwünschten Nebenwirkungen, insbesondere der Häufigkeit von Thrombusformationsbildung, bestanden. Die statistischen Analysen fanden unter Vorgabe der Nullhypothese statt, nach welcher die Auswirkungen der doppelten Kryoenergieablation innerhalb der Atrien und Ventrikel identisch waren. Dabei fand ein Vergleich jeder einzelnen doppelten Kryoenergieläsion unabhängig vom Tier statt.

Die Ergebnisse wurden durch einen unverbundenen t-Test überprüft. Unter Vorgabe des Signifikanzniveaus $\alpha = 5\%$ durfte die Nullhypothese verworfen werden, sobald der p-Wert $< 0,05$ war. Die Analysen wurden mit Hilfe der Computerprogramme Excel (Microsoft) und STATISTICA (Stat Soft) durchgeführt.

Zur weiteren Bewertung der Ergebnisse wurden Vergleichsdaten aus vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe über die Auswirkungen von einfachen Kryo- und Radiofrequenzablationen herangezogen (Kriebel et al. 2005; Kriebel et al. 2009; Paul et al. 1997). Dabei wurden die Volumina der Läsionen in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Energiemodalitäten sowie zwischen einfachen und doppelten Kryoenergieablationen verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Kryoenergieapplikation und selektive Koronarangiographie

Die EKG-Ableitungen zeigten 30 Minuten und 48 Stunden nach doppelter Kryoenergieablation bei keinen Tier ST-Streckenhebungen, ventrikuläre Arrhythmien oder andere Hinweise auf eine akute Myokardischämie. Es wurden keine pathologisch verlängerten AV-Überleitungszeiten beobachtet.

Die selektiven angiographischen Darstellungen der rechten und linken Koronararterien konnten bei allen fünf Tieren erfolgreich durchgeführt werden. Dabei ergaben sich weder im Ramus circumflexus der linken Koronararterie (Abbildung 6), noch in der rechten Koronararterie (Abbildung 7) Hinweise auf Gefäßobstruktionen, Thrombusbildungen, Plaques oder Proliferationsreaktionen der Arterienwand.

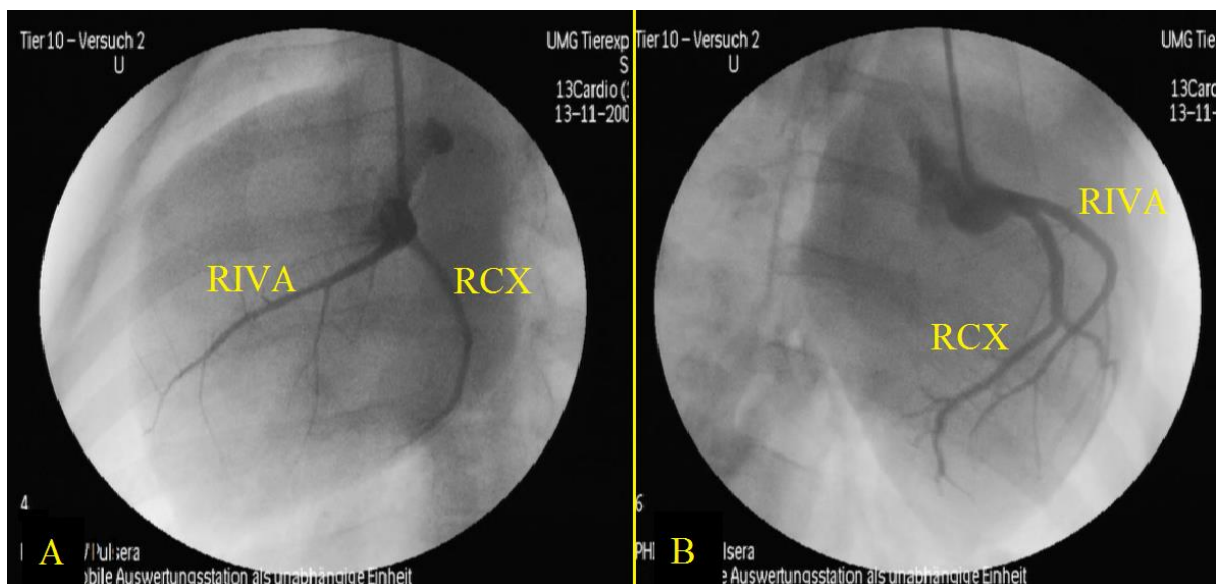


Abbildung 6: Koronarangiographie der linken Koronararterie

48 Stunden nach doppelter Kryoablation sind innerhalb der linken Koronararterie regelrechte Gefäßverläufe zu erkennen. Die linke Koronararterie zweigt sich in den Ramus circumflexus (RCX) und Ramus interventricularis anterior (RIVA) auf (Projektionsebene: A: 60° LAO, B: 30° RAO). Die Koronarangiographien zeigen keinen Hinweis auf Plaquebildungen, Thrombusformationen, Arterienwandproliferationen oder andere stenosierende Lumeneinengungen.

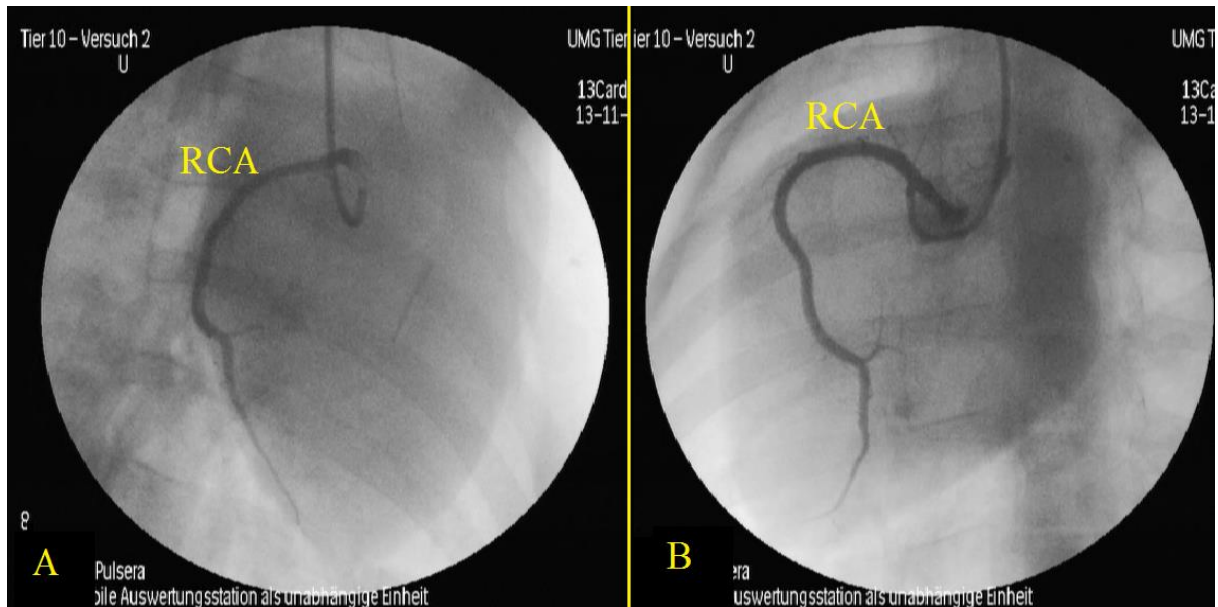


Abbildung 7: Koronarangiographie der rechten Koronararterie

Selektive Koronarangiographie der rechten Koronararterie (RCA) 48 Stunden nach doppelter Kryoablation (Projektionsebene: A: 30° RAO, B: 60° LAO). Die Darstellung der rechten Koronararterie zeigt einen physiologischen Verlauf ohne Anzeichen für stenosierende Prozesse durch Thrombusbildungen, Ödeme oder Proliferationsreaktionen der Arterienwand.

3.2 Intrakoronare Ultraschalluntersuchung der Koronararterien

Die intrakoronare Ultraschalluntersuchungen der rechten und linken Koronararterie wurden erfolgreich in allen fünf Tieren durchgeführt. Die Analyse der ICUS-Aufnahmen erbrachte keine Anzeichen für Stenosen, Thrombusformationen, Plaques oder Arterienwandproliferationen (Abbildung 8).

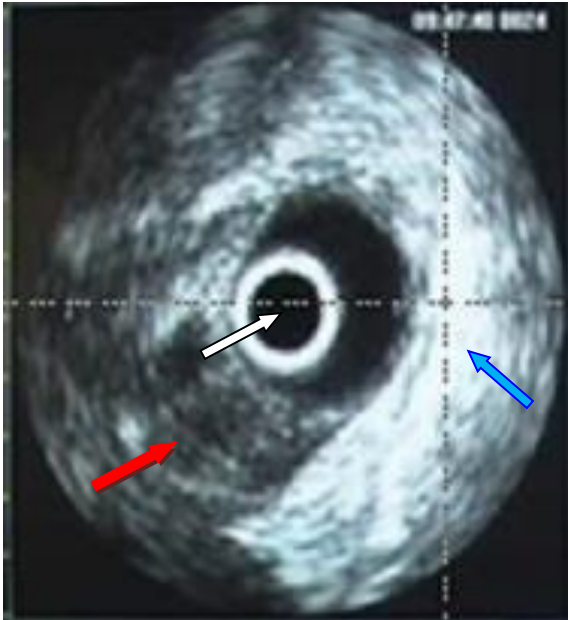


Abbildung 8: ICUS-Aufnahme der rechten Koronararterie 48 Stunden nach doppelter Kryoablation

In der Bildmitte erkennt man in die Ultraschallsonde (Bereich um den weißen Pfeil). Die innere Gefäßwand stellt sich scharf begrenzt dar. Es sind keine Anhaltspunkte für Thrombusformationen, Plaques, Arterienwandproliferationen oder Stenosen erkennbar. Um die Gefäßwand befindet sich auf der rechten Seite eine erkennbare Verstärkung des Echosignals (Region um den hellblauen Pfeil). Dies wird durch sonographische Phänomene im Rahmen flüssigkeitsvermittelter Signalverstärkung hervorgerufen. Auf der linken unteren Bildhälfte wurde das Echosignal durch den Führungsdraht abgeschwächt (Bereich um den roten Pfeil).

3.3 Makroskopische Darstellung der Läsionen nach doppelter Kryoablation

Insgesamt konnten 31 von 35 Kryoablationsläsionen (88,6 %), darunter 16 am atrialen und 15 am ventrikulären Ansatz der AV-Grube, makroskopisch identifiziert und analysiert werden. Die übrigen vier Läsionen konnten aufgrund Schäden durch die Präparierung oder Mängel bei der histologischen Aufarbeitung nicht verwertet werden.

Die Läsionen stellten sich 48 Stunden nach doppelter Kryoablation durch eine irreguläre Oberflächenstruktur mit zentralen Einblutungen dar und waren durch einen weißlichen Randsaum scharf begrenzt. Zusätzlich konnte man in Anschnitten eine blaugräuliche Verfärbung des Myokards beobachten, die durch eine vermehrte Infiltration eines inflammatorischen Zellverbandes hervorgerufen wurde (Abbildung 9 bis 11).



Abbildung 9: Makroskopische Darstellung einer Kryoläsion am ventrikulären Ansatz der AV-Grube

Blick auf das Endokard eines eröffneten Schweineherzens mit Darstellung einer Kryoläsion am ventrikulären Ansatz des Mitralklappenringes 48 Stunden nach doppelter Kryoablation. Die Läsion ist oval und grenzt sich durch einen weißen, leicht vorgewölbten Randsaum sowie Einblutungen und irreguläre Oberflächenstrukturen vom intakten Myokardgewebe ab. Oben erkennt man den Anteil der Mitralklappe (Pfeile).

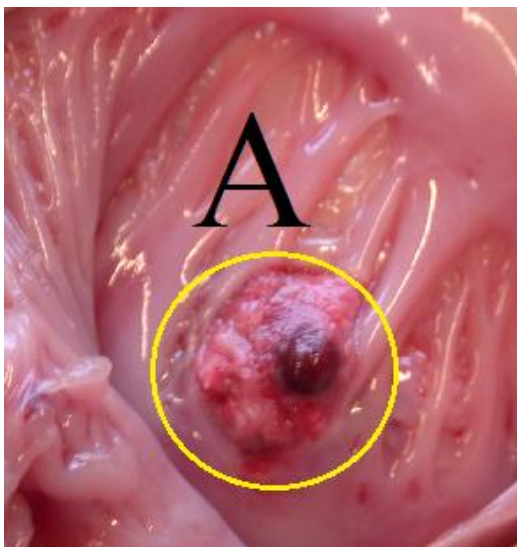


Abbildung 10: Makroskopische Darstellung einer atrialen Kryoläsion

Ansicht auf das rechte Vorhofmyokard mit Muskuli pectinates (A). Innerhalb der gelben Markierung zeigt sich die Kryoläsion mit irregulärer Oberflächenstruktur und Einblutungen ins Myokard.

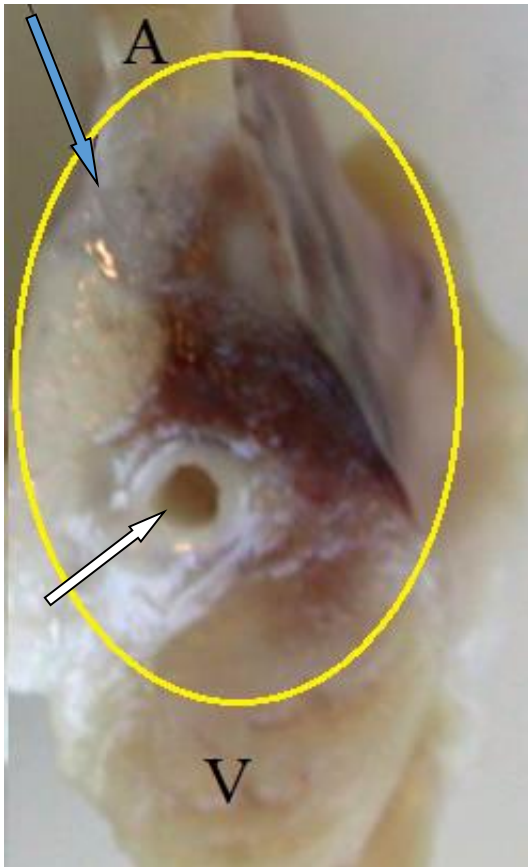


Abbildung 11: Querschnitt durch eine Kryoenergieläsion mit Anteilen der unmittelbar benachbarten rechten Koronararterie

Senkrechter Anschnitt durch die AV-Grube mit Anteilen der rechten Koronararterie (weißer Pfeil), Vorhof- (A) und Ventrikelmyokard (V). Die Kryoläsion (innerhalb der gelben Markierung) breitet sich vom Endokard bis an die Koronararterie aus und stellt sich mit rötlichen Einblutungen und einer zusätzlichen blaugrauen Verfärbung (blauer Pfeil) des Myokards dar. Diese blaugraue Färbung wird durch eine vermehrte Infiltration inflammatorischer Zellen hervorgerufen (s.u.).

3.4 Mikroskopische Auswertung

3.4.1 Histologische Darstellung der Kryoenergieläsionen

Die makroskopisch zu erkennenden weißlichen Randsäume der Läsionen und blaugrüulichen Verfärbungen des Myokards stellten sich histologisch als Ansammlung von inflammatorischen Zellen dar, die sich vor allem als Leukozyteninfiltration repräsentierte. Zusätzlich konnte man die bereits makroskopisch beobachteten hämorrhagischen Areale sowie eine Auflockerung des Muskelgewebes mit Ödembildung erkennen. An den jeweiligen Applikationsstellen fielen teilweise Unterbrechungen der intakten endokardialen Oberfläche auf (Abbildung 12 und 13).

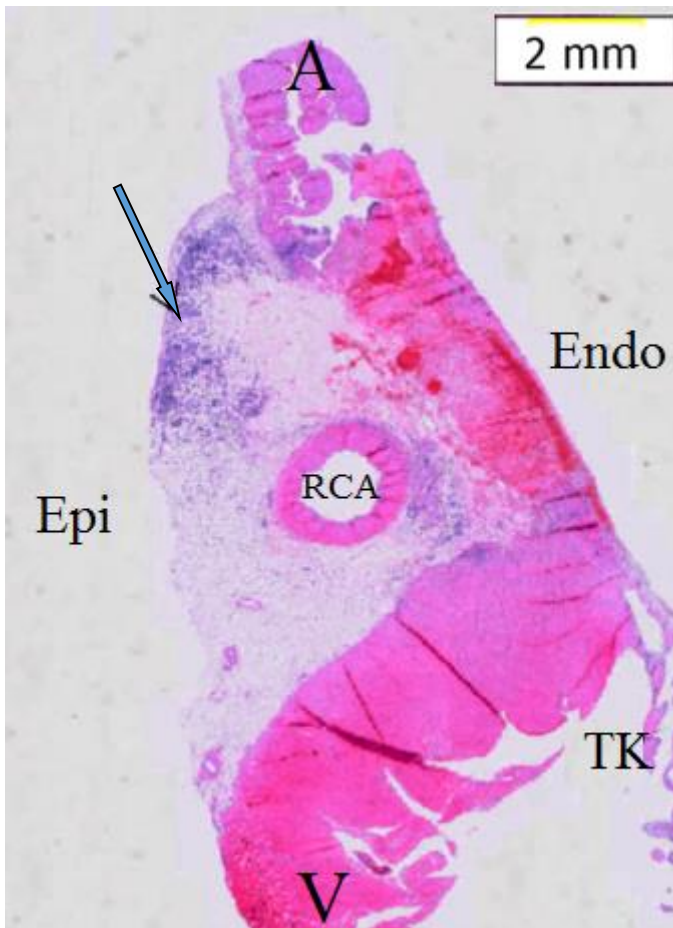


Abbildung 12: Mikroskopische Darstellung einer Kryoenergieläsion mit Anteilen der benachbarten rechten Koronararterie
 Läsion wie in Abbildung 11 (H.E. Färbung) Analog zur makroskopischen Ansicht erkennt man hämorrhagische Areale im Bereich der endokardialen Oberfläche (Endo) und eine vermehrte Infiltration von Leukozyten (Region um den blauen Pfeil), die sich transmural bis in die AV-Grube und das epikardiale Fettgewebe (Epi) ausbreiten. Die rechte Koronararterie (RCA) weist keine Lumeneinengung oder thrombotisches Material auf und stellt sich intakt dar. Neben Anteilen des Vorhof- (A) und Ventrikelmyokards (V)

ist der Klappenapparat der Trikuspidalklappe (TK) angeschnitten.

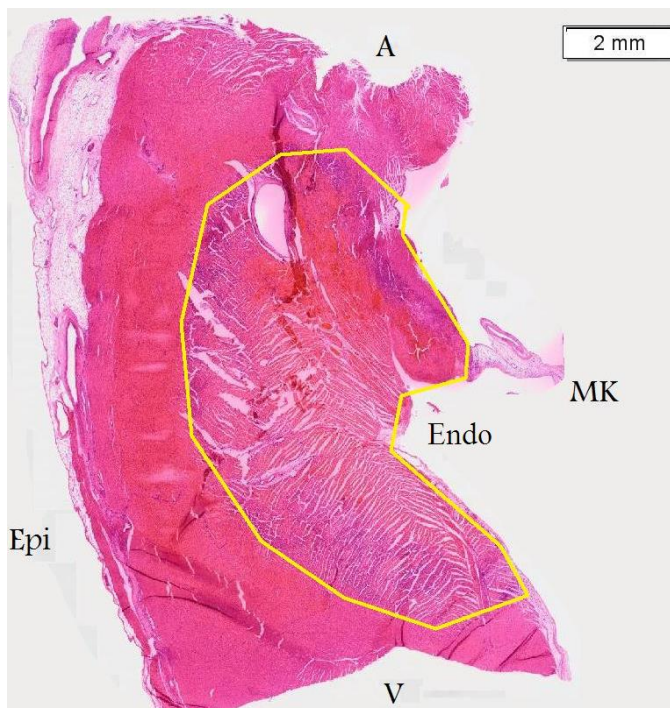


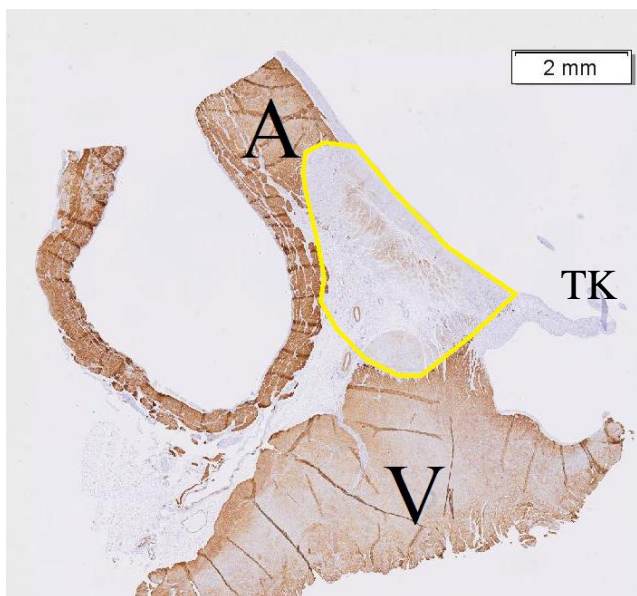
Abbildung 13: Histologie einer doppelten Kryoläsion am ventrikulären Ansatz des Mitralklappenannulus

H.E.-Färbung einer Kryoläsion am ventrikulären Ansatz der Mitralklappe (MK). Innerhalb der gelben Markierung erkennt man die Kryoenergieläsion, die sich durch Auflockerung der Gewebsstruktur mit leichter Ödembildung vom gesunden Herzmuskelgewebe des Vorhofes (A) und Ventrikels (V) abgrenzt. Die Läsion stellt sich als nicht-transmural dar, da sie sich nicht komplett vom Endokard (Endo) bis zum Epikard (Epi) ausbreitet. Das Endokard zeigt sich intakt ohne Verletzungen und ohne Anheftung von Thrombusformationen.

dar, da sie sich nicht komplett vom Endokard (Endo) bis zum Epikard (Epi) ausbreitet. Das Endokard zeigt sich intakt ohne Verletzungen und ohne Anheftung von Thrombusformationen.

Ausgehend von der endokardialen Flächenausdehnung zeigte sich in den tieferen Gewebeschichten oft eine zunehmende ovale Läsionsausbreitung. Unter den 31 Läsionen wurde in 16 Fällen eine transmurale Läsionsausdehnung festgestellt. Die Häufigkeit einer transmuralen Läsionsausdehnung war in den Vorhöfen mit 87,5 % (14 von 16 Läsionen) höher als in den Ventrikeln mit 13,3 % (2 von 15 Läsionen).

Durch die spezielle immunhistologische Anfärbung der Desminfilamente verdeutlichte sich, dass es innerhalb der 48 Stunden nach doppelter Kryoablation im Bereich der Kryoenergieläsionen zu einem Abbau der Desminfilamente kam. Dies ermöglichte eine exakte Abgrenzung der durch den Kälteeffekt entstandenen Verletzungen des Myokards (Abbildung 14).



Die Kryoenergieläsion (innerhalb der gelben Markierung) am atrialen Ansatz des Trikuspidalklappenannulus (TK) grenzt sich durch eine deutlich schwächere Anfärbung der Desminfilamente ab. Im übrigen intakten Herzmuskelgewebe des rechten Vorhofmyokards (A) und des Ventrikelmyokards (V) kann man eine stärkere Anfärbung der intakten Desminfilamente beobachten.

Abbildung 14: Immunhistologische Desmin-Färbung einer Kryoenergieläsion am atrialen Ansatz der Trikuspidalklappe 48 Stunden nach doppelter Kryoablation.

3.4.2 Histologische Untersuchung der Koronargefäße

Die Koronararterien waren bei 29 von 31 Läsionen (93,5 %) unauffällig und zeigten keine Lumeneinengung oder Unregelmäßigkeiten in der Wandbeschaffenheit (Abbildung 15 und 16).

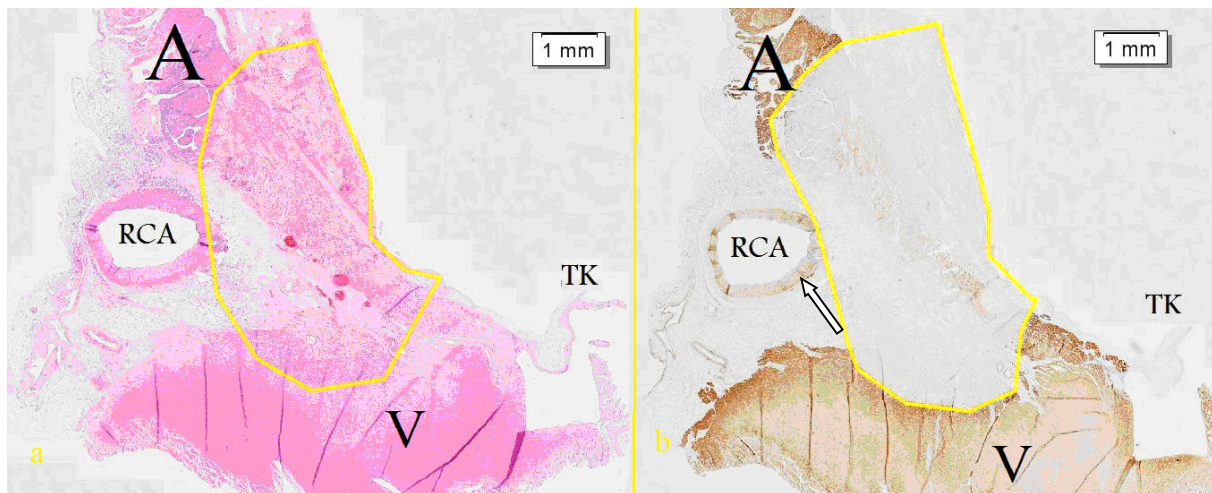


Abbildung 15: Histologie einer Kryoläsion am atrialen Ansatz des AV-Klappenringes mit intakter rechter Koronararterie im Querschnitt (a: H.E.-Färbung, b: immunhistologische Desmin-Färbetechnik).

Darstellung einer unauffälligen rechten Koronararterie (RCA) ohne Lumeneinengung oder pathologische Veränderungen des Wandaufbaus 48 Stunden nach doppelter Kryoablation. Die Kryoläsion (innerhalb der gelben Markierung) befindet sich innerhalb des Vorhofmyokards (A). Neben dem ventrikulären Myokard (V) ist die Trikuspidalklappe (TK) abgebildet. Anhand der Desmin-Spezialfärbung verdeutlicht sich, dass eine vollständige transmurale Unterbrechung von intaktem Myokardgewebe zwischen Vorhof und Ventrikel vorliegt. Das Myokardgewebe innerhalb der Läsion (gelben Markierung) wurde in dem Maße geschädigt, dass keine Anfärbung von intakten Muskelzellen zu erkennen ist. Die transmurale Läsion breitet sich bis an die angrenzende Koronararterie (RCA) aus. Der muskuläre Wandanteil der angeschnittenen rechten Koronararterie wurde durch die Desminfärbung vollständig zirkulär angefärbt (Pfeil). Die Koronararterie stellt sich intakt dar ohne Hinweis auf einen nekrotischen Zellabbau oder Proliferationsreaktion der Arterienwand.



Abbildung 16: Histologie einer intakten rechten Koronararterie 48 Stunden nach doppelter Kryoablation

H.E.-Färbung mit Detailaufnahme derselben Läsion in Abbildung 15 mit Querschnitt durch die rechte Koronararterie, die sich angrenzend zu einer Kryoläsion am atrialen Ansatz des AV-Klappenannulus befand. An der läsionszugewandten Seite erkennt man eine Leukozyten-

infiltration, die bis an die Lamina adventitia heranreicht (blaue Pfeile). Das Gefäß selbst zeigt 48 Stunden nach doppelter Kryoablation weder eine Lumeneinengung noch erkennbare pathologische Wandveränderungen. Die Lamina intima (weißer Pfeil) als innerste Gefäßschicht ist inakt.

48 Stunden nach doppelter Kryoenergieablation fiel bei zwei transmuralen Läsionen am atrialen Ansatz der Trikuspidalklappe auf, dass die rechte Koronararterie Unregelmäßigkeiten und Schwankungen der Wanddicken zeigte (Abbildungen 17 bis 19). Dabei wurden Ausdünnungen von ca. 25 % der Lamina media und adventitia mit Verlust der Ultrastruktur sowie Koagulationsnekrosen beobachtet. Die Lamina intima zeigte bei keinem der beiden veränderten Gefäße pathologische Reaktionen und stellte sich intakt dar. Innerhalb der Gefäßwandabschnitte wurden keine pathologischen Proliferationen beobachtet.

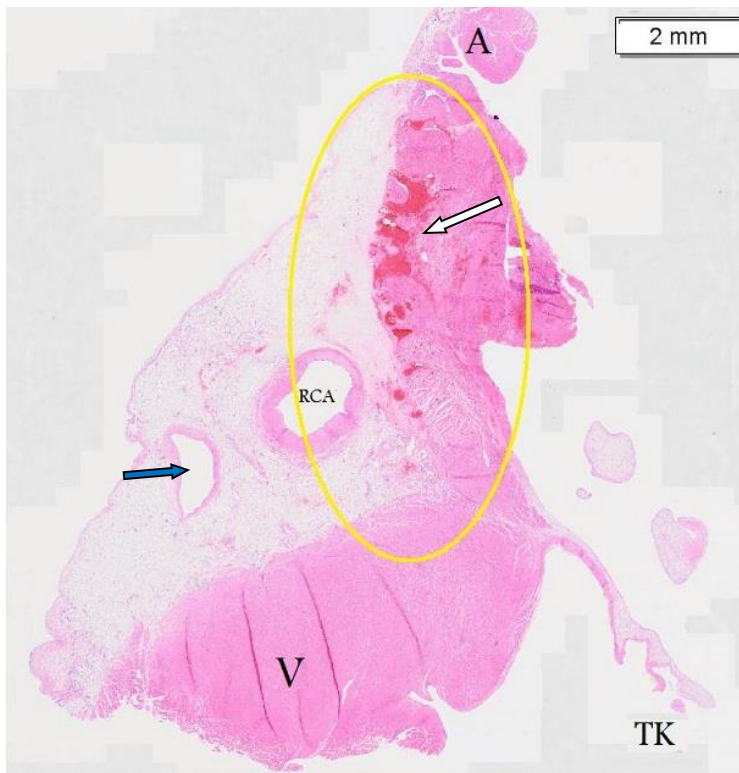


Abbildung 17: Histologie einer Kryoläsion mit Verschmälerung der Arterienwand der rechten Koronararterie 48 Stunden nach doppelter Kryoablation.

H.E.-Färbung einer Kryoenergie-läsion (innerhalb der gelben Markierung) im Bereich des Vorhofmyokards (A), die sich mit diffusen Einblutungen (weißer Pfeil) und Verschmälerung des Wandaufbaus der rechten Koronararterie (RCA) an der läsionszugewandten Seite darstellt. Unterhalb der Läsion befindet sich die Ventrikelmuskulatur (V) und seitlich die angeschnittene Trikuspidalklappe (TK). Im Bereich der AV-Grube ist neben der rechten Koronararterie in etwas weiterer Distanz eine Koronarvene ohne pathologische Auffälligkeiten abgebildet (blauer Pfeil).

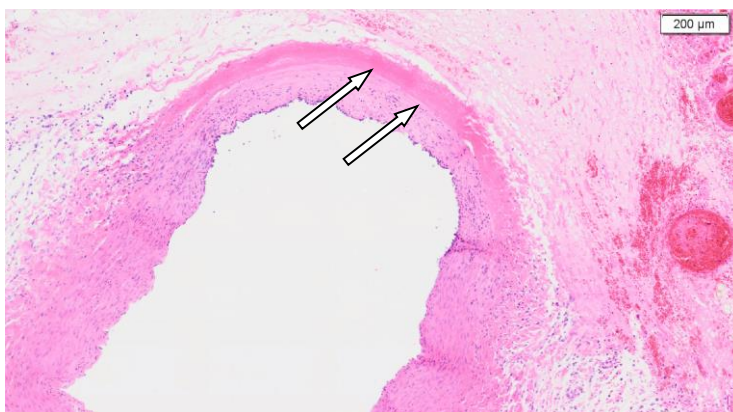


Abbildung 18: Histologie einer rechten Koronararterie mit Verdünnung des Wandaufbaus der Lamina media und adventitia mit Koagulationsnekrosen.

H.E.-Färbung mit Detailaufnahme der rechten Koronararterie derselben Läsion in Abbildung 17. Auf der läsionszugewandten Seite (rechts) mit Hämorrhagien zeigt die rechte Koronararterie über ca. 25 % der Zirkumferenz Unregelmäßigkeiten (Pfeile) im Wandaufbau. Hierbei besteht eine Verdünnung der Lamina media und adventitia mit Koagulationsnekrosen.

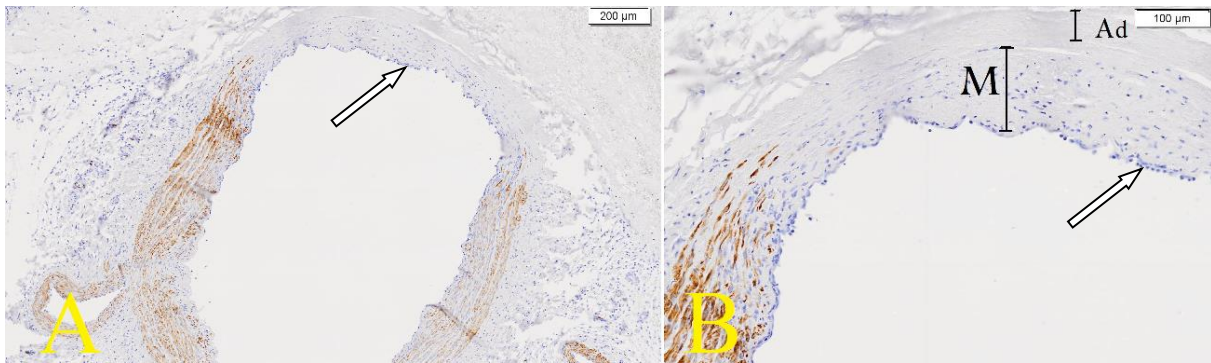
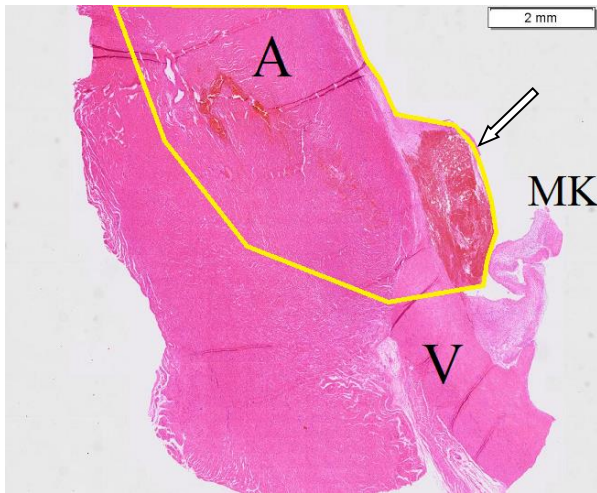


Abbildung 19: Immunhistologische Desminfärbungen mit Verlust von intaktem Muskelgewebe der rechten Koronararterienwand

Immunhistologische Färbung der zuvor abgebildeten rechten Koronararterie mit Hervorhebung von intakten Desminfilamenten; A: Übersicht, B: Detailaufnahme der Arterienwand. Die Spezialfärbung verdeutlicht, dass es in dem Bereich der verschmälerten Koronararterienwand zu einem Verlust an intaktem Muskelgewebe kam. Innerhalb der Lamina media (M) kam es 48 Stunden nach der doppelten Kryoablation zu einer Verschmälerung der Ultrastruktur. Im Wandaufbau der Lamina adventitia (Ad) erkennt man Koagulationsnekrosen mit Verlust von intakten Zellstrukturen. Innerhalb der läsionsabgewandten Arterienwandabschnitte ließ sich das Muskelgewebe der Lamina media und adventitia deutlich anfärben. Die Lamina intima als innerster Zellverbund der Gefäßwand (Pfeile) stellt sich komplett intakt dar. Innerhalb der Gefäßwandabschnitte wurden keine pathologischen Proliferationen beobachtet.

3.4.3 Thrombusformation

Insgesamt lagen bei sechs von 31 Läsionen (19,4 %) Thrombusformationen vor. Dabei wurde ein Thrombus bei den ventrikulären Läsionen und fünf Thrombusformationen bei den atrialen Läsionen festgestellt (Abbildung 20 und 21).



H.E.-Färbung einer Thrombusformation (Pfeil), die sich unmittelbar oberhalb der Mitralklappe (MK) auf dem Endokard befindet. Angrenzend an die Klappenebene breitet sich die Kryoenergieläsion (innerhalb der gelben Markierung) auf Anteile der Vorhofmuskulatur (A) aus. Unterhalb der Mitralklappe beginnt das Ventrikelmyokard (V).

Abbildung 20: Histologie einer endokardialen Thrombusformation 48 Stunden nach doppelter Kryoablation

Bei der histologischen Untersuchung der Koronargefäße wurden in zwei Fällen Thrombusformationen innerhalb von Koronarvenen beobachtet. Diese nahmen einen Anteil von ca. 50 % des Gesamtlumens der Venen ein (Abbildung 21).



H.E.-Färbung mit Thrombusformation innerhalb einer großen Koronarvene (weißer Pfeil). Das Gefäßlumen der Vene wird zu ca. 50 % einengt. Des Weiteren erkennt man eine endokardiale Thrombusformation mit unregelmäßiger Oberfläche (oranger Pfeil), die sich nahe der Trikuspidalklappe (TK) befindet. Neben dem venösen Gefäß grenzt sich die unversehrte rechte Koronararterie (RCA) durch ihren muskulöseren Wandaufbau ab. Auf dem Anschnitt erkennt man das Arbeitsmyokard von Atrium (A) und Ventrikel (V).

Abbildung 21: Histologie einer doppletten Kryoläsion am atrialen Trikuspidalklappenansatz mit venöser und endokardialer Thrombusformation

3.5 Planimetrie und Volumetrie

Bei der nachfolgenden Auflistung der berechneten Läsionsausdehnungen folgt eine Unterteilung in atriale und ventrikuläre Läsionen.

Atriale Läsionen:

Von den insgesamt 31 Läsionen befanden sich 16 Läsionen im Vorhofmyokard (Tabelle 7).

Läsions- Nummer	Volumen in mm ³	Flächeninhalt in mm ²	Tiefe in mm
1	131,99	11,38	2,26
2	135,73	13,31	2,43
3	122,96	9,61	2,12
4	54,04	8,43	2,35
5	151,23	7,56	2,31
6	156,57	5,55	2
7	115,27	11,65	3,39
8	135,1	10,73	3,82
9	81,53	11,27	3,9
10	164,05	11,27	3,9
11	148,7	6,39	2,21
12	88,19	5,26	2,37
13	56,78	8,47	4,7
14	64,4	5,71	2,03
15	50,24	12,2	4
16	90,5	8,24	5,4

Tabelle 7: Läsionsausdehnungen der atrialen Kryoläsionen

Tabellarische Auflistung der gemessenen Ergebnisse der Planimetrie und Volumetrie für die insgesamt 16 atrialen Läsionen 48 Stunden nach doppelter Kryoenergieablation.

Unter Einbeziehung der 16 Einzelergebnisse folgte eine Mittelwertberechnung, die Angabe der Spannweite und Standardabweichung (siehe Tabelle 8). Die atrialen Läsionen wiesen ein mittleres Volumen von $109,21 \text{ mm}^3$ mit einer Streuung von minimal $50,24 \text{ mm}^3$ bis maximal $164,05 \text{ mm}^3$ auf. Die Vermessung ergab Flächenausdehnungen von $5,26 \text{ mm}^2$ bis $13,31 \text{ mm}^2$ (im Mittel $9,04 \text{ mm}^2$) mit Tiefenausdehnungen in das Gewebe von 2 mm bis $5,4 \text{ mm}$ (im Mittel $2,4 \text{ mm}$).

	Volumen in mm^3	Fläche in mm^2	Tiefe in mm
Mittel	109,21	9,19	3,07
Median	119,12	9,04	2,4
min	50,24	5,26	2
max	164,05	13,31	5,4
SD	39,61	2,56	1,08

Tabelle 8: Statistische Ergebnisse der atrialen Kryoläsionen

Mittelwertberechnung (= Mittel), Spannweite (= von min bis max), Standardabweichung (= SD)

Ventrikuläre Läsionen:

Von den 31 Läsionen befanden sich 15 Läsionen innerhalb des Ventrikelmyokards. Eine Auflistung der Einzelergebnisse der 15 Läsionen folgt in Tabelle 9.

Für die ventrikulären Läsionen ergab sich ein mittleres Volumen von $150,3 \text{ mm}^3$ mit einem Minimalwert von $87,92 \text{ mm}^3$ und einem Maximalwert von $246,78 \text{ mm}^3$. Es zeigten sich Flächenausdehnungen von $5,55 \text{ mm}^2$ bis $24,19 \text{ mm}^2$ (im Mittel $10,73 \text{ mm}^2$) mit Tiefenausdehnungen von $2,23 \text{ mm}$ bis $6,55 \text{ mm}$ (im Mittel $3,56 \text{ mm}$).

Läsions- nummer	Volumen in mm ³	Flächeninhalt in mm ²	Tiefe in mm
1	223,68	12,03	3,21
2	109,59	11,42	4,45
3	183,43	13,99	6,43
4	141,72	13,99	4,09
5	101,3	7,79	6,55
6	101,62	5,76	2,5
7	98,2	2,91	1,2
8	246,78	9,63	2,83
9	91,18	6,7	2,23
10	227,19	24,19	3,4
11	137,33	11,12	2,26
12	156,57	16,71	3,51
13	87,922	10,73	2,6
14	174,02	9,06	2,93
15	174,02	9,06	2,93

Tabelle 9: Läsionsausdehnungen der ventrikulären Kryoläsionen

Ergebnisse der Planimetrie und Volumetrie für die insgesamt 15 ventrikulären Läsionen 48 Stunden nach doppelter Kryoenergieablation.

	Volumen in mm ³	Fläche in mm ²	Tiefe in mm
Mittel	150,3	11,18	3,56
Median	141,72	10,73	3,21
min	87,922	5,55	2,23
max	246,78	24,19	6,55
SD	53,21	4,79	1,34

Tabelle 10: Statistische Ergebnisse der ventrikulären Kryoläsionen

Mittelwertberechnung (= Mittel), Spannweite (= von min bis max), Standardabweichung (= SD)

3.6 Statistische Analyse

Die nachfolgenden Kastengrafiken demonstrieren die Verteilung der Einzelergebnisse von Volumen- und Tiefenausdehnung (Abbildungen 22 und 23). Auf den Diagrammen repräsentiert die rechteckige Box den Bereich, in dem 50 % der Ergebnisse liegen. Die Box wird durch das obere und untere Quartil begrenzt und enthält als Markierung den Median. Die sog. Antennen verdeutlichen die Streuung der einzelnen Ergebnisse. Extremwerte befinden sich außerhalb der Antennen.

Die Verteilung der Volumenausbreitung verdeutlichte, dass die Läsionen innerhalb des Vorhofmyokards insgesamt kleiner als im Ventrikel waren (Abbildung 22). Der Median lag bei den atrialen Läsionen bei 119 mm^3 und bei den ventrikulären Läsionen bei 141 mm^3 . Die Streuung der Einzelergebnisse nahm bei den ventrikulären Läsionen eine größere Spannweite als bei den atrialen Läsionen ein.

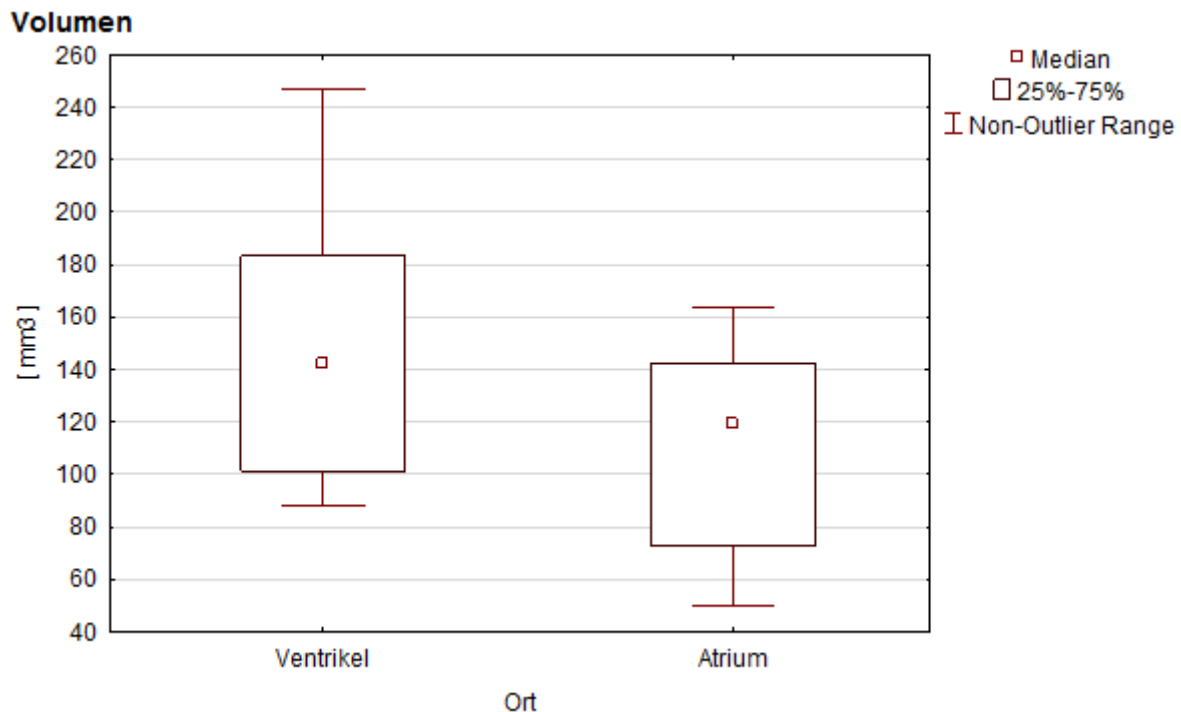


Abbildung 22: Boxplot-Darstellung der Volumenergebnisse

Graphische Darstellung der Volumenverteilung (y-Achse) nach doppelter Kryoablation mit Unterscheidung der Applikationsareale (x-Achse: Ventrikel und Atrium). Die jeweilige Box wird durch das untere Quartil und obere Quartil begrenzt und breitet sich für die atrialen Läsionen von ca. 73 mm^3 bis 142 mm^3 und für ventrikulären Läsionen von ca. 101 mm^3 bis

183 mm³ aus. Als Markierung enthalten die Boxen den Median, der bei den ventrikulären Läsionen 141 mm³ und bei den atrialen Läsionen 119 mm³ betrug.

Bei der Tiefenausdehnung ergaben sich Quartilengrenzen von ca. 2,6 mm bis 4,1 mm für die ventrikulären Läsionen und von ca. 2,2 mm bis 3,9 mm für die atrialen Läsionen. Der Median lag bei 3,2 mm für die Ventrikel und bei 2,4 mm für die Vorhöfe. Bei der ventrikulären Tiefenausdehnung wurden potentielle Ausreißerwerte veranschaulicht.

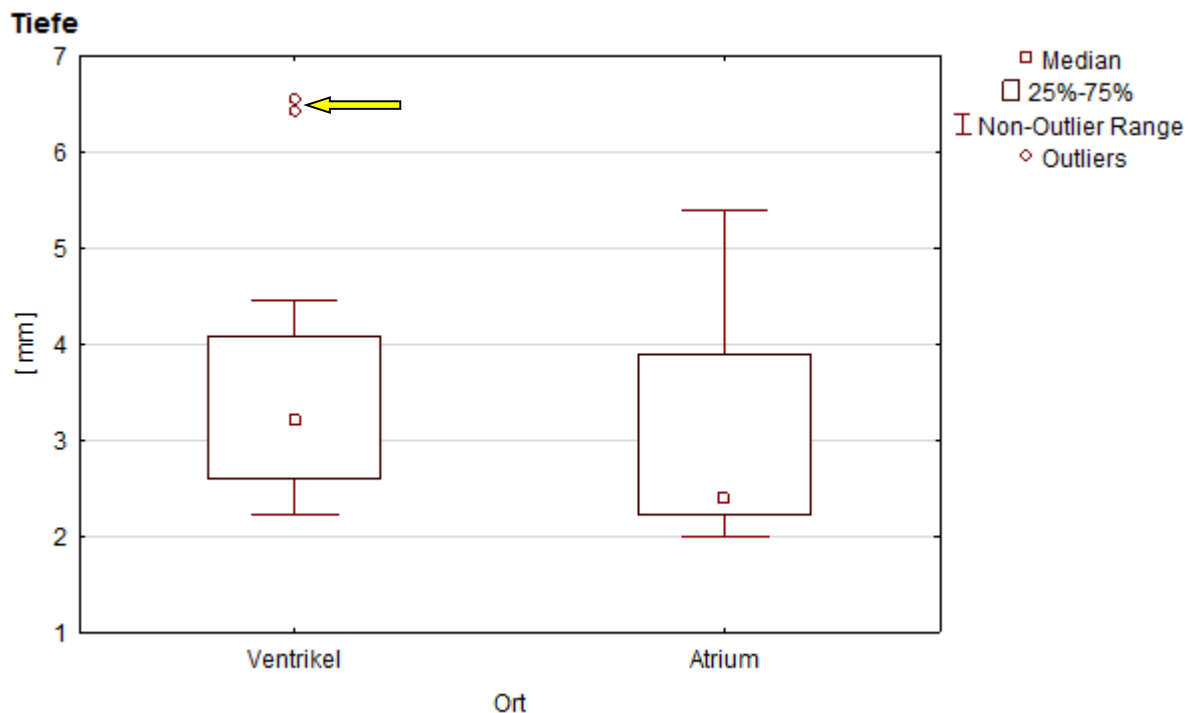


Abbildung 23: Boxplot-Darstellung der Tiefenausdehnung

Graphische Darstellung der Verteilung der Ergebnisse für die Tiefenausdehnung (y-Achse) mit Unterscheidung der Applikationsareale (x-Achse: Ventrikel und Atrium). Innerhalb der Box ist als Markierung der Median (bei 3,2 mm für die Ventrikel und 2,4 mm für die Atrien) abgebildet. Bei der Tiefenausdehnung fallen den ventrikulären Läsionen Extremwerte bis zu 6,55 mm auf (gelber Pfeil), die außerhalb der Antennen der Box liegen.

Es wurde überprüft, ob sich die Ergebnisse von Vorhof- und Ventrikelmyokard signifikant unterschieden (Tabelle 11). Hierbei ergab die Berechnung des t-Tests einen signifikanten Unterschied der Volumenverhältnisse (p-Wert 0,02) und bezüglich des Auftretens von transmuraler Läsionsausdehnung (p-Wert 0,0001). Es konnte keine signifikante Aussage über Unterschiede der maximalen Tiefenausdehnung (p-Wert 0,27) oder über das Auftreten von Thrombusformationen (p-Wert 0,17) gemacht werden.

Ablationsort	Volumen [mm³]	Maximale Tiefe [mm]	Transmurale Ausdehnung	Thrombus- formation
alle Läsionen n = 31	129,09 ± 50,41	3,2 ± 1,2	16/31 (51,6 %)	6/31 (19,4 %)
ventrikuläre Läsionen n = 15	150,30 ± 53,21 (87,92 – 246,78)	3,56 ± 1,3 (2,2 – 6,6)	2/15 (13,3 %)	1/15 (6,7 %)
atriale Läsionen n = 16	109,21 ± 39,61 (50,24 – 164,05)	3,07 ± 1,08 (2 – 5,4)	14/16 (87,5%)	5/16 (31,3%)
p-Wert	0,02	0,27	0,0001	0,17

Tabelle 11: Gesamtergebnisse mit Signifikanzberechnung

4 Diskussion

Zur Analyse der akuten Auswirkungen der doppelten Kryoenergieapplikation auf wachsendes Myokardgewebe und die Koronarperfusion wurden an einem etablierten Tiermodell angiographische und detaillierte mikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Für die Einschätzung der potentiellen Effektivität des experimentellen Therapieansatzes zur Behandlung von SVT im Kindesalter und Bewertung des Komplikationsrisikos werden im Folgenden die Ergebnisse im Kontext mit den in den letzten Jahren veröffentlichten Ergebnissen anderer Studien über die Auswirkungen von kathetergesteuerten Ablationsanwendungen diskutiert.

4.1 Unerwünschte Nebenwirkungen nach Katheterablation

4.1.1 Koronaraffektion

Nach Katheterablation bei Kindern und Jugendlichen mit SVT können in seltenen Fällen die Koronararterien mit ernstzunehmenden Folgen verletzt werden. Dies verdeutlichen Publikationen von Kugler und Zhou, die Koronarstenosen nach RFA mit letalem Ausgang bei einem 13- und 17-jährigen Patienten beschrieben (Kugler et al. 1997; Zhou et al. 1999).

Nach klinischen Anwendungen von Kryoablation auf Myokardgewebe wurden bisher keine klinisch relevanten Koronarstenosen oder die Induktion eines AV-Blocks beschrieben. Es wird davon ausgegangen, dass die Kryoablation eine sichere Therapiealternative zur Unterbrechung von akzessorischen Leitungsbahnen gegenüber RFA darstellt (Brugada et al. 2013; Kriebel et al. 2005).

Unsere Arbeitsgruppe stellte nach RFA am wachsenden Myokard junger Schweine bei vier von fünf Tieren eine Infiltration der Wandstrukturen der rechten Koronararterie nach 48 Stunden histologisch fest. Nach sechs Monaten zeigte sich bei zwei von fünf Schweinen Intimaproliferationen mit Obstruktion des Gefäßlumens von 25 und 40 % (Paul et al. 1997). In einer Studie von Sturm et al. wurden sechs und 12 Monate nach RFA bei drei von insgesamt acht Tieren Intimaplaques (Fläche im Mittel $2,2 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ und Lumeneinengung (im Mittel von $30,4 \pm 4 \%$) in der rechten Koronararterie mittels ICUS und histologisch festgestellt (Sturm et al. 2004).

Bei einem gleichen Versuchsaufbau analysierte unsere Arbeitsgruppe 2009 die Auswirkungen nach einfacher Kryoablation. Hierbei wurden die Folgen der Kryoablation nach einmaliger vierminütiger Applikation bei $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ untersucht. 22 Kryoläsionen wurden nach 48 Stunden und 21 Läsionen nach sechs Monaten per ICUS, selektiver Angiographie sowie histologisch überprüft und zeigten dabei keinen Hinweis auf pathologische Veränderungen der Koronararterien. Bei dem Vergleich von einfacher Kryoablation gegenüber RFA wurde davon ausgegangen, dass die einfache Kryoablation insgesamt schonender für das umliegende Gewebe war und keine bedeutsamen Koronararterienaffektionen hervorgerufen wurden (Kriebel et al. 2009).

Die aktuellen Ergebnisse verdeutlichen, dass der Einsatz der doppelten Kryoablation auf wachsendes Myokardgewebe leichte Veränderungen der Koronararterien verursachen kann. Histologisch wurden Koronararterienwandveränderungen mit Ausdünnungen und Nekroseanteilen der Lamina media und adventitia bei zwei von 31 Läsionen (6,5 %) festgestellt. Im Vergleich der einfachen Kryoablation gegen die von uns genutzte doppelte Kryoablation scheint es durch die zusätzliche Auftau- und Anfrierphase zu einem erhöhten Risiko für Koronararterienverletzung zu kommen. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Versuchen mit pathologischen Veränderungen der Koronararterien nach RFA blieb die Lamina intima sowohl nach einfacher wie auch nach doppelter Kryoablation unversehrt intakt.

Unsere Beobachtungen decken sich mit den Studienergebnissen der Arbeitsgruppe von Aoyama et al., die 2005 die Auswirkungen nach Kryo- und Radiofrequenzablationen innerhalb des Koronarsinus an Hundeherzen verglichen. Aoyama et al. analysierten die akuten Auswirkungen nach 48 Stunden, einer Woche und nach drei Monaten. Nach einfacher Kryoablation wurden weniger Nekrosen der Lamina media beobachtet als nach doppelter Kryoablation (zwei von sieben Läsionen vs. acht von 14 Läsionen). Sowohl nach einfacher als auch nach doppelter Kryoablation wurde nach einer Woche keine Verletzung der Lamina intima festgestellt. Nach drei Monaten zeigten die Kryoläsionen milde Proliferationen der Lamina intima, die zu keiner Stenose führten. Demgegenüber traten nach RFA Medianekrosen bei sieben von zehn Läsionen auf, die zu Stenosen der linken Koronararterie von 20 – 50 % (Median 32,5 %) führten. Zusätzlich wurde nach RFA eine Verletzung der Lamina intima bei fünf von sieben Läsionen angegeben. Die Koronaraffektionen konnten bei der Untersuchungsreihe von Aoyama et al. eine Woche nach RFA mittels ICUS festgestellt werden, wobei Wandverdickungen mit Lumeneinengung des Ramus circumflexus der linken Koronararterie von 25 – 75 % beobachtet wurden (Aoyama et al. 2005).

In der vorliegenden aktuellen Studie waren die Koronarwandaffektionen nach doppelter Kryoablation so geringfügig, dass weder mittels selektiver Angiographie noch durch ICUS akute Veränderungen der Koronarien wie Obstruktionen, Plaqueformationen, Gefäßwandproliferationen oder andere Auffälligkeiten der Gefäße beobachtet wurden.

4.1.2 Thrombusformationsbildung nach Katheterablation

Nach doppelter Kryoablation traten bei 19,4 % der Läsionen Thrombusformationen auf. Unsere Ergebnisse sind mit Studienergebnissen der Arbeitsgruppe von Khairy et al. vergleichbar, die an 22 Hundeherzen die Inzidenz von thromboembolischen Ereignissen nach Radiofrequenz- und Kryoenergieablation analysierten. Dabei fanden sich sieben Tagen nach Ablation signifikant mehr Thrombusformationen bei RFA (75,8 %) als nach Kryoablation (30,1 %) (Khairy et al. 2003). In einer weiteren Studie über das Wachstumsverhalten nach Ablationsverfahren an wachsenden Herzen junger Schweine beschrieben Khairy et al. ebenfalls, dass es nach Kryoenergie zu weniger Thrombusformationen kam (27,3 % bei RFA versus 13,6 % bei Kryo) (Khairy et al. 2011). Die Arbeitsgruppe von Khairy et al. gab nach RFA ein fünffach erhöhtes Risiko für Thrombusformationsbildung im Vergleich zu einfacher Kryoablation an (Khairy et al. 2003).

Nach doppelter Kryoablation wurde bei unserer Studie die Mehrzahl der endokardialen Thromben innerhalb der atrialen Läsionen beobachtet. Dies könnte sich durch die endokardialen Oberflächeneigenschaften erklären lassen, da sich möglicherweise durch den unregelmäßigeren Blutfluss um die Musculi pectinati innerhalb der Vorhöfe leichter Thromben formieren als innerhalb der Ventrikel.

4.1.3 Läsionscharakteristika und Mechanismen der Gewebsverletzung

Nach dem Einsatz der doppelten Kryoablation stellten sich die Läsionen durch strukturelle Auflockerung der Gewebsstruktur mit Ödembildung, Einblutungen, Nekrosearealen und Leukozytenansammlung dar. Makroskopisch und histologisch beobachteten wir eine klar markierte Abgrenzung zwischen den Läsionen und dem gesunden Myokardgewebe.

Die Läsionen nach RFA aus vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe wiesen eine ausgeprägte Verletzung des Myokards mit unscharf markierten Läsionsgrenzen vor. Es wurde diskutiert, dass die Kryoenergie schonender für das umliegende Gewebe ablief. Dieser Effekt könnte durch die im Vergleich zu RFA kleinere Kontaktfläche der Katheterspitze zum Endokard zu erklären sein. Durch die Kryoadhäsion kann eine Dislokation der Katheterspitze zum Endokard verhindert werden und die Kryoablation ohne Verrutschen des der Katheterspitze gewährleistet werden (Kriebel et al. 2009).

Analog zu den Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe beschrieben Khairy et al., dass sich Kryoenergieläsionen glatt berandet vom normalen gesunden Gewebe abgrenzen ließen und weniger intraläsionale hämorrhagische Areale zeigten als bei Läsionen, die durch Radiofrequenz hervorgerufen wurden (Khairy et al. 2011).

Die Beobachtung, dass es nach Kryoablation zu einer weniger ausgeprägten Schädigung der extrazellulären Matrix und weniger Endokardverletzungen kommt, kann in Verbindung zur geringeren Rate von Thrombusformationsbildung gebracht werden.

In einer Veröffentlichung aus dem Jahre 1983 von Holman et al. wurden Hämorrhagien innerhalb der Lamina adventitia als einzige akute Veränderungen nach Einsatz von Serienkryoablationen an einem Tiermodell beschrieben. In dem experimentellen Ansatz wurden Kryoablationen in unmittelbarer Nähe von benachbarten Koronargefäßen und im Bereich des Koronarsinus appliziert. Im Anschluss wurden die Koronarien histologisch überprüft. Die innersten Gefäßwände stellten sich intakt und ohne akute aneurysmatische Dilatationen dar. Bei den Untersuchungen der weiteren Folgen zeigten sich 48 Stunden nach den Ablationen Entzündungsreaktionen des angrenzenden epikardialen Gewebes sowie innerhalb der Lamina adventitia und media (Holman et al. 1983). Bei unseren Experimenten beobachteten wir ebenfalls 48 Stunden nach doppelter Kryoablation Leukozytenansammlungen innerhalb der Läsionen. Bei den zwei Läsionen mit Verdünnungs- und Nekrosearealen der rechten Koronararterien wurden Leukozyteninfiltrationen bis in die Lamina media und adventitia festgestellt.

4.2 Morphometrische Analyse

Experimente über Kryoablationen zeigten, dass eine Zunahme der Läsionsvolumina durch eine Erniedrigung der Temperatur, größere Ablationselektroden, Ablationsdauer oder durch den Einsatz von Serienablationen erzielt werden konnte (Dubuc et al. 1999; Holman et al. 1983; Khairy et al. 2008). In der Mehrheit der vorangegangenen Studien ermittelte man die Volumina durch Extrapolierung der endokardialen Läsionsausdehnung. Durch die von uns verwendete detaillierte dreidimensionale Volumetrie wurde eine exakte Bestimmung der Größenverhältnisse der Läsionen erreicht.

4.2.1 Läsionsvolumina im Vergleich der unterschiedlichen Energiemodalitäten

Durch vorangegangene Studien unserer Arbeitsgruppe nach einfacher Kryoablation kann ein Vergleich der Auswirkungen einer zusätzlichen Auftau- und Anfrierphase sowie der

Vergleich gegenüber RFA-Läsionen an einem bereits etablierten Schweinmodell mit gleichen Versuchsaufbau gezogen werden (Kriebel et al. 2009; Kriebel et al. 2010; Paul et al. 1997).

Nach einfacher Kryoablation bei minus 75 °C über für vier Minuten wurden 48 Stunden nach Ablation Volumina von $52 \pm 45 \text{ mm}^3$ in den Vorhöfen und von $144 \pm 203 \text{ mm}^3$ in den Herzkammern gemessen (siehe Tabelle 12) (Kriebel et al. 2009). Im Vergleich dazu stellen sich die Läsionen innerhalb der Vorhöfe nach doppelter Kryoablation signifikant größer als nach einfacher Kryoablation dar. Innerhalb der Ventrikel war nach doppelter Kryoablation eine geringfügige, jedoch nicht signifikante Volumenzunahme zu erkennen. Im Kontext bestätigt sich die Annahme einer größeren Läsionsausdehnung nach doppelter gegenüber einfacher Kryoablation.

Beim Vergleich der Größenverhältnisse 48 Stunden nach Radiofrequenzablation ergaben sich ähnliche Größenverhältnisse wie nach einfacher Kryoablation (Kriebel et al. 2010) (siehe Tabelle 12). Dabei wurden nach RFA im Vorhofmyokard Volumina von $49 \pm 14 \text{ mm}^3$ und $150 \pm 5,2 \text{ mm}^3$ im Ventrikel beschrieben (Paul et al. 1997).

Energiemodalität	Mittleres Volumen der Vorhofläsionen	Mittleres Volumen der Ventrikelläsionen
RFA	$48,9 \pm 13,5 \text{ mm}^3$	$150,2 \pm 5,2 \text{ mm}^3$
Einfache Kryoablation	$52 \pm 45 \text{ mm}^3$	$144 \pm 203 \text{ mm}^3$
Doppelte Kryoablation	$109,21 \pm 39,61 \text{ mm}^3$	$150,30 \pm 53,21 \text{ mm}^3$

Tabelle 12: Läsionsvolumina im Vergleich der unterschiedlichen Energiemodalitäten

4.2.2 Tiefenausdehnung von Kryoablationsläsionen

Wadhwa et al. führten histologische Untersuchungen nach Kryoablationen mit unterschiedlichen Temperaturen an Hundeherzen durch und kamen zu der Schlussfolgerung, dass die Tiefenausdehnung von der Endtemperatur abhängig war. Durch Erniedrigung der Endtemperatur wurden zunehmende Eindringtiefen beobachtet (Wadhwa et al. 2000).

Khairy et al. verglichen 2008 die Auswirkungen von einfacher Kryoablation mit unterschiedlich großen Spitzenelektroden. An Schweineherzen wurden Spitzenelektroden mit unterschiedlicher Größe von Größe von 4 mm, 6 mm und 8 mm verwendet. Die histologische Analyse ergab, dass der Einsatz der größeren Elektroden eine Zunahme der Flächenausdehnung und der Volumina zur Folge hatte. Unabhängig von der Elektrodengröße beobachtete man eine ähnliche Tiefenausdehnung mit mittleren Eindringtiefen von $4,3 \pm 2,1$ mm (Khairy et al. 2008).

Die 2011 veröffentlichten Daten der Arbeitsgruppe von Khairy et al. zur einfachen Kryoablation ergaben mit Eindringtiefen von $3,2 \pm 0,3$ mm vergleichbare Werte wie bei unseren Experimenten mit Eindringtiefen von $3,2 \pm 1,2$ mm nach zweifacher Ablation (Khairy et al. 2011). Unter Berücksichtigung der Publikationen von Khairy et al., Wadhwa et al. und unserer Arbeitsgruppe lässt sich interpretieren, dass die Endtemperatur den ausschlaggebenden Einflussfaktor für die Tiefenausdehnung darstellt. Dies könnte erklären, dass es bei einer konstanten Temperatur durch zusätzliche Ablation an derselben Stelle zu keinem signifikanten Unterschied der Tiefenausdehnung kam.

Für die Bewertung der potentiellen therapeutischen Effektivität zur Behandlung von SVT wurden die Läsionen auf transmurale Ausdehnung untersucht. Es ist anzunehmen, dass die Effektivität bzw. die Wahrscheinlichkeit, sämtliche Fasern von pathologischen akzessorischen Leitungsbahnen zu unterbrechen, bei einer komplett transmuralen Läsionsausdehnung am größten ist. Unsere Ergebnisse ergaben mit 87,5 % (14 von 16) der atrialen und 13,3 % (zwei von 15) der ventrikulären Läsionen einen signifikanten Unterschied zwischen der transmuralen Läsionsausdehnung von Vorhof- gegenüber Kammermyokard. Khairys Arbeitsgruppe beschrieb nach einmaliger Kryoablation mit 70,1 % ebenfalls eine höhere Rate an transmuraler Läsionsausbreitung in den Atrien als mit 38,8 % innerhalb der Ventrikel (Khairy et al. 2011). Eine mögliche Erklärung für die deutlich höhere Anzahl an transmuralen Ausdehnungen innerhalb der Herzvorhöfe beruht sehr wahrscheinlich darauf, dass das Vorhofmyokard eine dünnere Muskeldicke als das Kammermyokard vorweist.

4.3 Klinische Bedeutung

Einen entscheidenden Nachteil von Kryoenergieverfahren gegenüber RFA zur Behandlung von supraventrikulären Tachykardien stellt bisher die geringere Effektivität dar. Durch Einsatz der Kryoenergie lässt sich jedoch das Risiko einer Koronararterienaffektion minimieren (Aoyama et al. 2005; Brugada et al. 2013; Kriebel et al. 2009).

Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass der Einsatz der doppelten Kryoenergieablation eine größere Volumenausdehnung der Läsionen als nach einfacher Kryoenergie- und nach Radiofrequenzstromablation hervorruft. Dies erhöht einerseits die Wahrscheinlichkeit, pathologische Leitungsbahnen zu unterbrechen und kann so mit einer Steigerung der Effektivität einhergehen, andererseits kann sich durch die zusätzliche Auftau- und Anfrierphase eine erhöhte Rate von unerwünschten Nebenwirkungen ergeben. Insbesondere besteht ein leicht erhöhtes Risiko für gering ausgeprägte Verletzungen der Koronargefäße.

Die histologischen Veränderungen mit Ausdünnung der Lamina media und adventitia in zwei von 31 Läsionen wurden in unseren Experimenten jeweils innerhalb der rechten Koronararterie nach Ablation im Bereich des atrialen Ansatzes des Trikuspidalklappenannulus beobachtet. Vermutlich ist dies auf den geringen Abstand der rechten Koronararterie zu den endokardialen Applikationsarealen zurückzuführen. Es stellt sich die Frage, ob bestimmte Regionen mit einem besonderen Risiko für Koronaraffektionen behaftet sind.

4.3.1 Anatomische Regionen mit erhöhtem Komplikationsrisiko

Zur Einschätzung des individuellen Risikos von Ablationsverfahren ist die Kenntnis der anatomischen Verhältnisse notwendig. Da die akzessorischen Leitungsbahnen und Koronargefäße bei jedem Individuum anders verlaufen, sind Voruntersuchungen wie Koronarangiographien und EPU von besonderer Bedeutung.

Im klinischen Einsatz wurde insbesondere bei Ablationen von posteroseptal lokalisierten Leitungsbahnen das Auftreten von Koronararterienstenosen beschrieben (Bertram et al. 2001; Blafox und Saul 2004; de Paola et al. 2003; Khanal et al. 1999; Nakagawa und Jackman 2007; Strobel et al. 2001).

Die Ablation von septal verlaufenden akzessorischen Leitungsbahnen wurde als technisch schwieriger als bei anderen Regionen beschrieben. Des Weiteren war die Rate von

wiederkehrenden SVT und das Risiko einer AV-Block-Induktion nach RFA in dieser anatomischen Region am höchsten (Kuck et al. 1991; Schlüter et al. 1991; Tai et al. 1999).

In einer zusammenfassenden Studie der Arbeitsgruppe von Macedo et al. wurden ebenfalls Schwierigkeiten und besonderen Risiken bei Ablationen von septal verlaufenden Leitungsbahnen thematisiert. Aufgrund der anatomischen Eigenschaften bei pädiatrischen Patienten kann sich das Komplikationsrisiko vergrößern. Die Schwierigkeiten bei der Ablation seien durch die kleine Herzgröße, schnelle AV-Überleitung und die unmittelbare Nähe der Koronargefäße bedingt (Macedo et al. 2010).

In einer Publikation von Al-Ammouri et al. wurde das Risiko von Koronararterienverletzung nach Katheterablation bei pädiatrischen Patienten hervorgehoben. Dabei wurde nach postmortal durchgeführten Untersuchungen bei pädiatrischen Patienten die kürzeste Distanz zwischen der endokardialen Oberfläche und der Koronargefäßverläufe im Bereich des posterioren Trikuspidalklappenansatzes angegeben. Im Detail wurden Abstände von weniger als 4 mm bei 76 % und weniger als 5 mm bei 96 % als kürzeste Distanzen der endokardialen Oberfläche bis zur äußeren Wand der Koronarien bei Kindern < 7 Jahre beschrieben (Al-Ammouri und Perry 2006).

In einer klinischen Studie von Schneider et al. zur Behandlung von AVNRT und akzessorischen Leitungsbahnen wurden Koronararterienaffektionen nach RFA innerhalb der posteroseptalen Region beobachtet (Schneider et al. 2009). Dabei wurde bei zwei von 117 pädiatrischen Patienten (1,7 %) eine subklinische Koronararterienverengung 30 Minuten nach RFA mittels selektiver Angiographie festgestellt. Bei beiden Patienten mit ansonsten strukturell gesunden Herzen lag ein WPW-Syndrom mit einer rechts posteroseptalen akzessorischen Leitungsbahn vor. In einem Fall wurde 30 Minuten nach RFA eine 40 %-Stenose der rechten Koronararterie und im anderen Fall eine 35 %-Verengung innerhalb der linken Koronararterie mittels selektiver Angiographie festgestellt. Zusätzlich zeigten sich zwischenzeitige ST-Streckenveränderungen und T-Negativierungen im EKG, die sich innerhalb einer Woche normalisierten. Die Koronararterienaffektionen und passageren EKG-Veränderungen traten nach Ablation von rechts posteroseptalen verlaufenden Leitungsbahnen im Bereich des Koronarvenensinus auf (Schneider et al. 2009).

4.3.2 Klinische Konsequenz

Bei Ablationsanwendungen im Bereich der posteroseptalen Region scheint ein erhöhtes Risiko für Verletzungen der Koronararterien zu bestehen. Da nach Kryoablation mit weniger Komplikationen als nach RFA zu rechnen ist, könnte man insbesondere für Ablationen innerhalb der posteroseptalen Regionen die Kryoenergie anstelle von RFA für klinische Anwendungen in der Pädiatrie in Erwägung ziehen.

Die Arbeitsgruppe von Castano et al. beschrieben ebenfalls, dass Kryoablationen unter bestimmten Voraussetzungen eine sicherere Alternative zu RFA darstellen. Dies war vor allem der Fall, wenn Koronararterien in enger Nachbarschaft zu Ablationsarealen verliefen oder wenn Patienten während RFA ST-Strecken-Hebungen im EKG vorwiesen (Castano et al. 2011; Spar et al. 2010).

Aoyama et al. schilderten, dass Kryoablationen innerhalb des Koronarvenensinus mit im Abstand von zwei Millimetern angrenzend verlaufenden Koronargefäßen sicherer als RFA waren (Aoyama et al. 2005). Weitere Studien bestätigten, dass nach Einsatz von Kryoablation weniger Komplikationen als bei Durchführung mittels RFA auftraten (Bertram et al. 2001; Blaufox et al. 2004; Skanes et al. 2002).

Schneider et al. diskutierten, dass Koronarangiographien vor Ablationen hilfreich waren, um das Risiko von Koronarauffektionen einzuschätzen. Im Falle einer posteroseptal lokalisierter akzessorischer Leitungsbahn mit in enger Nachbarschaft verlaufender Koronararterie, bestünde die Option die Kryoenergie als sicherere alternative Energiequelle gegenüber RFA zu wählen (Schneider et al. 2009). Macedo et al. thematisierten ebenfalls, dass sich das Komplikationsrisiko bei Ablation von septal verlaufenden akzessorischen Leitungsbahnen durch angiographische Untersuchung besser einschätzen ließ. Sofern mehr als 5 mm Abstand von der Ablationsstelle zum Koronararteriengefäßverlauf vorliegt, sei die RFA sicher. Bei kürzeren Abständen bestünde die Möglichkeit die Untersuchung durch ICUS zu ergänzen und im Falle einer unmittelbaren Nähe der Koronarien die Kryoablation anstelle der RFA zu nutzen (Asirvatham 2008; Macedo et al. 2010).

4.4 Zukünftige Forschungsrichtungen und alternative Therapieoptionen

Unsere Experimente wurden an sich im Wachstum befindenden Schweineherzen vorgenommen. Die Langzeitfolgen der doppelten Kryoablation sind derzeit noch nicht im Detail bekannt. Für eine umfassendere Bewertung und Berücksichtigung der chronischen Auswirkungen sind Nachbeobachtungen nötig. Langzeitergebnisse könnten Hinweise auf

weitere Risiken nach kathetergesteuerten Ablationsanwendungen bringen. Von Interesse wäre hierbei beispielsweise, ob sich durch subklinische Gewebsproliferation der Gefäßwände ein erhöhtes Risiko für arteriosklerotische Veränderungen ergibt.

In der vorliegenden Studie wurde im Vergleich zu einfacher Kryoablation eine zusätzliche Auftau- und Anfrierphase genutzt. Hierdurch wurde eine Volumenzunahme der Läsionen erreicht. Es stellt sich die Frage, ob sich durch weitere Bonusläsionen an derselben Stelle eine weitere Volumenvergrößerung ergibt und welches Ausmaß das Nebenwirkungsprofil annimmt. Zur Untersuchung der Auswirkungen von mehrfachen Serienablationen auf wachsendes Myokard plant unsere Arbeitsgruppe die Folgen nach dreifacher Kryoablation zu analysieren.

In einer zusammenfassenden Arbeit über Katheterablationen von Castano et al. wurden neben der Kryoablation weitere neue Therapiealternativen angegeben (Castano et al. 2011). Zu den neuen Verfahren zählt beispielweise eine sogenannte High-intensive Ultrasound (HIFU)-Methode. In ähnlicher Wirkweise wie bei RFA erzielt man bei HIFU thermische Läsionen, die pathologische Leitungsbahnen unterbrechen sollen. Bei dieser Energieform werden auf molekularer Ebene Vibrationen und Spannungsreibungen hervorgerufen, die eine thermale Koagulationsnekrose bewirken (Kennedy et al. 2003). Andere Forschungsansätze befinden sich derzeit ebenfalls in der Entwicklung. Gegenstand der Forschung sind hierbei Anwendungen mittels Laser, Mikrowellentechnologie oder Einsatz von Beta-Strahlung (Castano et al. 2011). Auf Zell-biologischer Basis wird erforscht, ob sich Läsionen kreieren lassen ohne thermische Energie zu nutzen. Dabei versucht man die pathologische Erregungsleitung über die akzessorischen Bahnen durch Injektionen von autologen Fibroblasten in myokardiales Gewebe zu unterbrechen (Bunch et al. 2006).

4.5 Limitationen

Eine allgemeine Limitation ergibt sich aus der geringen Anzahl an Versuchstieren. Die statistische Analyse unserer Ergebnisse ergab Hinweise auf potentielle Ausreißerwerte. Für eine Verifizierung unserer Daten und der angegebenen Komplikationsraten könnte ein größeres Kollektiv an Versuchstieren hilfreich sein.

Eine weitere Limitierung besteht in der Beurteilung der Effektivität der genutzten doppelten Kryoeneregietechnik. Da die Experimente an- soweit bekannt -gesunden Schweineherzen

stattfanden, konnten keine real vorliegenden akzessorischen Leitungsbahnen unterbrochen werden. Die Einschätzung der potentiellen Effektivität stützt sich auf die exakte Läsionsvermessung und detaillierte histologische Überprüfung. Wir gingen im Falle einer transmuralen Läsionsausdehnung davon aus, dass sämtliche pathologischen Leitungsbahnen unterbrochen werden können.

Da es sich um eine tierexperimentelle Studie handelt, besteht die Frage, inwieweit sich das Schwein als Versuchstier eignet und in welchem Ausmaß die Ergebnisse vom Menschen und potentiellen klinischen Anwendungen in der Humanmedizin abweichen.

Für unsere Versuche wählten wir ein bereits etabliertes Tiermodell aus vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe (Kriebel et al. 2009; Paul et al. 1997). Die Wahl auf das Schwein als Versuchstier wurde getroffen, da das Schweineherz anatomisch stark dem menschlichen Herz ähnelt. Dabei findet man vergleichbare Anordnungen der Koronarien mit Dominanz der Blutversorgung durch die rechte Koronararterie und die Fähigkeit, nach myokardialer Ischämie Kollateralen zu bilden (Anderson und Becker 1992; Blumgart et al. 1950; Crick et al. 1998; Iaizzo 2015; Peng et al. 1983; Pluth 1983; White et al. 1986).

Die Arbeitsgruppe von Aoyama et al. verglich die Auswirkungen von RFA und Kryoablationen an Hundeherzen. Die angiographischen und histologischen Untersuchungen ergaben analog zu den Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe, dass nach RFA mehr Koronaraffektionen als nach Kryoablation auftraten (Aoyama et al. 2005).

Bisher ist der Stellenwert der beobachteten Arterienwandveränderungen nicht abschließend geklärt. Es stellt sich die Frage nach der Bedeutung der histologisch festgestellten subklinischen Veränderungen der Koronararterienwände mit Ausdünnungs- und Nekroseanteilen der Lamina media und adventitia bei intakter Lamina intima.

Bei unseren Versuchen wurden die akuten Auswirkungen 48 Stunden nach doppelter Kryoablation untersucht. In Publikationen über RFA von Paul et al. und Bökenkamp et al. wurde angegeben, dass die Zeitdauer, nach der Plaqueformation an der Gefäßinnenfläche nachgewiesen werden konnten, bis zu sechs Monate betrug (Bökenkamp et al. 2000; Paul et al. 1997; Sturm et al. 2004).

Bei Untersuchungen an Hundeherzen von Aoyama et al. konnte eine Woche nach Einsatz von einfacher und doppelter Kryoablation keine Verletzung der Lamina intima festgestellt

werden. Nach drei Monaten zeigten die Kryoläsionen milde Proliferationen der Lamina intima, die zu keiner Stenose führten (Aoyama et al. 2005).

Für eine bessere Einschätzung der Langzeitfolgen der doppelten Kryoablation wird in einer Folgestudie die Auswirkung auf das wachsende Myokard und die Koronarperfusion 6 Monate nach erfolgter doppelter Kryoablation untersucht.

5 Zusammenfassung

Ablationsverfahren werden zur kausalen Behandlung von supraventrikulären Herzrhythmusstörungen, die durch akzessorische Leitungsbahnen bedingt sind, eingesetzt. Abhängig von der genutzten Ablationstechnik ergeben sich Unterschiede in der Effektivität und der Komplikationsrate. In der vorliegenden Studie wurden die akuten Auswirkungen 48 Stunden nach doppelter Kryoablation auf wachsendes Myokard und die Koronarperfusion an einem bereits etablierten Schweinmodell analysiert. Um Rückschlüsse über die Sicherheit und über die Effektivität zu erlangen, wurden neben detaillierten mikroskopischen Untersuchungen die Koronararterien angiographisch und mittels intrakoronaren Ultraschalls untersucht.

Die histologische Überprüfung ergab in 2 von 31 Läsionen (6,5 %) innerhalb der rechten Koronararterie eine Ausdünnung der Lamina media und adventitia mit Verlust der Ultrastruktur und Koagulationsnekrosen. Die Lamina intima stellte sich intakt und ohne Nekrosen oder Proliferationsreaktionen dar. Insgesamt wurden bei 6 von 31 (19,4 %) Läsionen endokardiale sowie intravasale Thrombusformationen beobachtet. Die subklinischen Veränderungen konnten weder mittels selektiver Koronarangiographie noch durch die intrakoronaren Ultraschallaufnahmen detektiert werden. Die unerwünschten Nebenwirkungen traten im Vergleich zu Studienergebnissen vorangegangener Experimente mit Radiofrequenzstromablationen in einer geringeren Rate und geringerem Schweregrad auf.

Durch exakte volumetrische Vermessungen wurde ein mittleres Volumen von $129,09 \pm 50,41 \text{ mm}^3$ und eine mittlere Eindringtiefe von $3,2 \pm 1,2 \text{ mm}$ ermittelt. Darunter berechneten sich für die atrialen Läsionen ein mittleres Volumen von $109,21 \pm 39,61 \text{ mm}^3$ und eine mittlere Tiefe von $3,07 \pm 1,08 \text{ mm}$. Die ventrikulären Läsionen wiesen ein mittleres Volumen von $150,30 \pm 53,21 \text{ mm}^3$ und eine mittlere Tiefe von $3,56 \pm 1,3 \text{ mm}$ auf. Unter den 31 Läsionen wurde in 16 Fällen (51,6 %) eine transmurale Läsionsausdehnung festgestellt. Die Rate an transmuraler Läsionsausdehnung war in den Atrien mit 87,5 % (14 von 16 Läsionen) höher als in den Ventrikeln mit 13,3 % (2 von 15 Läsionen).

Aus den Erkenntnissen der aktuellen Studie und dem Bezug zu den Ergebnissen der in den letzten Jahren veröffentlichten Studien über die Auswirkungen von kathetergesteuerten Ablationsanwendungen lässt sich zusammenfassen, dass die Kryoenergie als eine sichere alternative Energiequelle zur Unterbrechung von akzessorischen Leitungsbahnen angesehen

wird. Einen entscheidenden Nachteil von Kryoenergieverfahren gegenüber RFA zur Behandlung von supraventrikulären Tachykardien stellt bisher die geringere Effektivität dar. Durch die von uns eingesetzte doppelte Kryoablation wurden größere Läsionsvolumina als nach einfacher Ablation hervorgerufen. Dies führt vermutlich zu einer Steigerung der Effektivität, jedoch bewirkt der zusätzliche Kälteeffekt der doppelten Kryoablation ein leicht erhöhtes Risiko von Koronararterienaffektion und Thrombusformationsbildung.

Hinsichtlich einer primär zu wählenden Energiequelle zur Behandlung von arrhythmogenen Substraten bei Kindern ergeben sich Unterschiede in Abhängigkeit von der anatomischen Region. Bei Ablationsanwendungen im Bereich der posteroseptalen Region scheint ein erhöhtes Risiko für Verletzungen der Koronararterien zu bestehen. Dies ist mutmaßlich auf die enge Nachbarschaft der Koronararterien zu den endokardialen Applikationsarealen zurückzuführen. Da nach Kryoablation mit weniger Komplikationen als nach RFA zu rechnen ist, könnte man insbesondere für Ablationen innerhalb der posteroseptalen Regionen die Kryoenergie anstelle von RFA für klinische Anwendungen in Erwägung ziehen.

Durch koronarangiographische und detaillierte elektrophysiologische Untersuchungen kann die Lagebeziehung von akzessorischen Leitungsbahnen zu kritischen Strukturen wie den Koronargefäßen und den damit verbundenen Komplikationsrisiken besser eingeschätzt werden.

Zur weiteren Analyse von Nutzen und Risiko der doppelten Kryoablation ist die Überprüfung und Interpretation der Langzeitfolgen notwendig.

6 Literaturverzeichnis

- Al-Ammouri I, Perry JC (2006): "Proximity of coronary arteries to the atrioventricular valve annulus in young patients and implications for ablation procedures." *Am J Cardiol* 97(12), 1752-1755
- Anderson RH, Becker AE: *The heart: structure in health and disease*. Gower Medical Publishing, London 1992
- Aoyama H, Nakagawa H, Pitha JV, 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* 16(11), 1218-1226
- Asirvatham SJ (2008): "Difficulties with ablation for arrhythmias in children." *Indian Pacing Electrophysiol J* 31(Suppl 1), S55-74
- Basso C, Corrado D, Rossi L, Thiene G (2001): "Ventricular preexcitation in children and young adults: atrial myocarditis as a possible trigger of sudden death." *Circulation* 103(2), 269-275
- Baust JM, Klossner DP, Robilotto A, Vanbuskirk RG, Gage AA, Mouraviev V, Polascik TJ, Baust JG (2012): "Vitamin D(3) cryosensitization increases prostate cancer susceptibility to cryoablation via mitochondrial-mediated apoptosis and necrosis." *BJU Int* 109(6), 949-958
- Berth-Jones J, Bourke J, Eglitis H, Harper C, Kirk P, Pavord S, Rajapakse R, Weston P, Wiggins T, Hutchinson PE (1994): "Value of a second freeze-thaw cycle in cryotherapy of common warts." *Br J Dermatol* 131(6), 883-886
- 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* 103(4), 538-543
- Blafox AD, Saul JP (2004): "Acute Coronary Artery Stenosis During Slow Pathway Ablation for Atrioventricular Nodal Reentrant Tachycardia in a Child." *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 15(1), 97-100

- Blaufox AD, Paul T, Saul JP (2004): "Radiofrequency catheter ablation in small children: relationship of complications to application dose." *Pacing Clin Electrophysiol* 27(2), 224-229
- Blumgart HL, Zoll Pm, Freedberg As, Gilligan Dr (1950): "The Experimental Production of Intercoronary Arterial Anastomoses and their Functional Significance." *Circulation* 1(1), 10-27
- Bokenkamp 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* 11(5), 565-571
- Borggreffe M, Budde T, Podczeck A, Breithardt G (1987): "High frequency alternating current ablation of an accessory pathway in humans." *J Am Coll Cardiol* 10(3), 576-582
- Brugada J, Blom N, Sarquella-Brugada G, Blomstrom-Lundqvist C, Deanfield J, Janousek J, Abrams D, Bauersfeld U, Brugada R, Drago F, et al. (2013): "Pharmacological and non-pharmacological therapy for arrhythmias in the pediatric population: EHRA and AEPC-Arrhythmia Working Group joint consensus statement." *Europace* 15(9), 1337-1382
- Bunch TJ, Mahapatra S, Bruce GK, Johnson SB, Miller DV, Horne BD, Wang XL, Lee HC, Caplice NM, Packer DL (2006): "Impact of transforming growth factor-beta1 on atrioventricular node conduction modification by injected autologous fibroblasts in the canine heart." *Circulation* 113(21), 2485-2494
- Castano A, Crawford T, Yamazaki M, Avula UM, Kalifa J (2011): "Coronary artery pathophysiology after radiofrequency catheter ablation: review and perspectives." *Heart Rhythm* 8(12), 1975-1980
- 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." *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 18(6), 592-597
- Cox J, Gallagher J, Cain M (1985): "Experience with 118 consecutive patients undergoing operation for the Wolff-Parkinson-White syndrome." *J Thorac Cardiovasc Surg* 90(4), 490-501

- Crick SJ, Sheppard MN, HO SY, Gebstein L, Anderson RH (1998): "Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure." *Journal of anatomy* 193(01): 105-119
- de Paola AA, Leite LR, Arfelli E (2003): "Mechanical reperfusion of acute right coronary artery occlusion after radiofrequency catheter ablation and long-term follow-up angiography." *J Invasive Cardiol* 15(3), 173-175
- Deisenhofer I, Zrenner B, Yin YH, Pitschner HF, Kuniss M, Grossmann G, Stiller S, Luik A, Veltmann C, Frank J, et al. (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* 122(22), 2239-2245
- 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." *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology* 16(3), 191-198
- Dubuc M, Roy D, Thibault B, Ducharme A, Tardif J-C, Villemaire C, Leung T, Talajic M (1999): "Transvenous Catheter Ice Mapping and Cryoablation of the Atrioventricular Node in Dogs." *Pacing and Clinical Electrophysiology* 22(10), 1488-1498
- Friedman PL, Dubuc M, Green MS, Jackman WM, Keane DT, Marinchak RA, Nazari J, Packer DL, Skanes A, Steinberg JS, et al. (2004): "Catheter cryoablation of supraventricular tachycardia: results of the multicenter prospective "frosty" trial." *Heart Rhythm* 1(2), 129-138
- Galanty M, Lechowski R (1994): "Cryodestruction technique in the prostatic gland in dogs." *Arch Vet Pol* 34(1-2), 37-44
- Holman WL, Ikeshita M, Ungerleider RM, Smith PK, Ideker RE, Cox JL (1983): "Cryosurgery for cardiac arrhythmias: Acute and chronic effects on coronary arteries." *The American journal of cardiology* 51(1), 149-155
- Iaizzo A, Howard T, Iles L, Coles A, Sigg C. In: *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices. Reversible and irreversible damage of the myocardium: Ischemia / Reperfusion injury and cardioprotection.* In: Third edition; Springer 2015, 279 - 295
- Kennedy JE, Ter Haar GR, Cranston D (2003): "High intensity focused ultrasound: surgery of the future?" *Br J Radiol* 76(909), 590-599

- Khairy P, Chauvet P, Lehmann J, Lambert J, Macle L, Tanguay JF, Sirois MG, Santoianni D, Dubuc M (2003): "Lower incidence of thrombus formation with cryoenergy versus radiofrequency catheter ablation." *Circulation* 107(15), 2045-2050
- Khairy P, Rivard L, Guerra PG, Tanguay JF, Mawad W, Roy D, Talajic M, Thibault B, Macle L, Dubuc M (2008): "Morphometric Ablation Lesion Characteristics Comparing 4, 6, and 8 mm Electrode-Tip Cryocatheters." *Journal of cardiovascular electrophysiology* 19(11), 1203-1207
- Khairy P, Guerra PG, Rivard L, Tanguay JF, Landry E, Guertin MC, Macle L, Thibault B, Tardif JC, Talajic M, et al. (2011): "Enlargement of catheter ablation lesions in infant hearts with cryothermal versus radiofrequency energy: an animal study." *Circ Arrhythm Electrophysiol* 4(2), 211-217
- Khanal S, Ribeiro PA, Platt M, Kuhn MA (1999): "Right coronary artery occlusion as a complication of accessory pathway ablation in a 12-year-old treated with stenting." *Catheterization and Cardiovascular Interventions* 46(1), 59-61
- Kongsgaard E, Foerster A, Aass H, Madsen S, Amlie JP (1994): "Power and Temperature Guided Radiofrequency Catheter Ablation of the Right Atrium in Pigs." *Pacing and Clinical Electrophysiology* 17(10), 1610-1620
- 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* 16(9), 960-966
- Kriebel T, Schneider H, Paul T (2007): "Entstehungsweise und Beeinflussung von tachykarden Herzrhythmusstörungen im Kindesalter." *Somnologie - Schlafforschung und Schlafmedizin* 11(1), 9-15
- Kriebel T, Saul JP, Schneider H, Sigler M, Paul T (2007): "Noncontact mapping and radiofrequency catheter ablation of fast and hemodynamically unstable ventricular tachycardia after surgical repair of tetralogy of Fallot." *J Am Coll Cardiol* 50(22), 2162-2168
- Kriebel T, Hermann HP, 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* 32(9), 1197-1202

- 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* 7, S1
- Kuck K, Schluter M, Geiger M, Siebels J, Duckeck W (1991): "Radiofrequency current catheter ablation of accessory atrioventricular pathways." *Lancet* 337(8757), 1557-1561
- Kuck KH, Ernst S, Dorwarth U, Hoffmann E, Pitschner H, Tebbenjohanns J, Kottkamp H (2007): "[Guidelines for catheter ablation]." *Clin Res Cardiol* 96(11), 833-849
- Kugler JD, Danford DA, Houston K, Felix G (1997): "Radiofrequency Catheter Ablation for Paroxysmal Supraventricular Tachycardia in Children and Adolescents Without Structural Heart Disease." *The American journal of cardiology* 80(11), 1438-1443
- Lavergne T, Le Heuzey JY, Bruneval P, Guize L, Boutjdir M, Von Euw D, Peronneau P (1986): "Effects of physical parameters of fulguration on electrophysiological and anatomical properties of canine myocardium." *Pacing Clin Electrophysiol* 9(6 Pt 2), 1367-1375
- Lijnen HR, Collen D "Endothelium in hemostasis and thrombosis." *Progress in Cardiovascular Diseases* 39(4), 343-350
- Lindinger A, Heisel A, von Bernuth G, Paul T, Ulmer H, Kienast W, Pitschner H, Kuck K, Hoffmann W (1998): "Permanent junctional re-entry tachycardia. A multicentre long-term follow-up study in infants, children and young adults." *European Heart Journal* 19(6), 936-942
- Lustgarten DL, Keane D, Ruskin J (1999): "Cryothermal ablation: Mechanism of tissue injury and current experience in the treatment of tachyarrhythmias." *Progress in Cardiovascular Diseases* 41(6), 481-498
- Macedo PG, Patel SM, Bisco SE, Asirvatham SJ (2010): "Septal accessory pathway: anatomy, causes for difficulty, and an approach to ablation." *Indian pacing and electrophysiology journal* 10(7), 292
- Mazur P (1970): "Cryobiology: The Freezing of Biological Systems." *Science* 168(3934), 939-949
- Miyazaki A, Blafox AD, Fairbrother DL, Saul JP (2005): "Cryo-ablation for septal tachycardia substrates in pediatric patients: mid-term results." *J Am Coll Cardiol* 45(4), 581-588

- Morady F (2004): "Catheter Ablation of Supraventricular Arrhythmias." *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 15(1), 124-139
- Mulisch M, Romeis W, Aeschl E, Büchl-Zimmermann S, Burmester A, Dänhardt-Pfeiffer S, Desel C, Hamers C, Jach G, Kässens M, Makovitzky J, Mulisch M, Nixdorf-Bergweiler B, Pütz D, Riedelsheimer B, Van den Boom F, Wegerhoff R, Welsch U. In: *Mikroskopische Technik. Färbungen*. In: 18. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010, 181-297
- Nakagawa H, Jackman WM (2007): "Catheter Ablation of Paroxysmal Supraventricular Tachycardia." *Circulation* 116(21), 2465-2478
- Nordin P, Larko O, Stenquist B (1997): "Five-year results of curettage-cryosurgery of selected large primary basal cell carcinomas on the nose: an alternative treatment in a geographical area underserved by Mohs' surgery." *Br J Dermatol* 136(2), 180-183
- Papez AL, Al-Ahdab M, Dick M, 2nd Fischbach PS (2006): "Transcatheter cryotherapy for the treatment of supraventricular tachyarrhythmias in children: a single center experience." *J Interv Card Electrophysiol* 15(3), 191-196
- 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* 133(4), 436-440
- Peng CF, Kane JJ, Jones EM, Murphy ML, Straub KD, Doherty JE (1983): "The adverse effect of systemic hypertension following myocardial reperfusion." *Journal of Surgical Research* 34(1), 59-67
- Perry JC, Garson A, Jr. (1990): "Supraventricular tachycardia due to Wolff-Parkinson-White syndrome in children: early disappearance and late recurrence." *J Am Coll Cardiol* 16(5), 1215-1220
- Pisters LL, von Eschenbach AC, Scott SM, Swanson DA, Dinney CP, Pettaway CA, Babaian RJ (1997): "The efficacy and complications of salvage cryotherapy of the prostate." *J Urol* 157(3), 921-925
- Pluth JR (1983): "What is the status of coronary revascularization for acute myocardial infarction?" *Cardiovasc Clin* 13(1), 183-190
- Reents T, Springer B, Ammar S, Wu J, Fichtner S, Jilek C, Kolb C, Horndasch M, Zhu P, Hess J, et al. (2012): "Long-term follow-up after cryoablation for adolescent atrioventricular nodal reentrant tachycardia: recurrence is not predictable." *Europace* 14(11), 1629-1633

- Rodriguez LM, Leunissen J, Hoekstra A, Korteling BJ, Smeets JL, Timmermans C, Vos M, Daemen M, Wellens HJ (1998): "Transvenous cold mapping and cryoablation of the AV node in dogs: observations of chronic lesions and comparison to those obtained using radiofrequency ablation." *J Cardiovasc Electrophysiol* 9(10), 1055-1061
- Ruskin JN (1991): "Catheter ablation for supraventricular tachycardia." *N Engl J Med* 324(23), 1660-1662
- Schaffer MS, Gow RM, Moak JP, Saul JP (2000): "Mortality following radiofrequency catheter ablation (from the Pediatric Radiofrequency Ablation Registry). Participating members of the Pediatric Electrophysiology Society." *Am J Cardiol* 86(6), 639-643
- Schlüter M, Geiger M, Siebels J, Duckeck W, Kuck K-H (1991): "Catheter ablation using radiofrequency current to cure symptomatic patients with tachyarrhythmias related to an accessory atrioventricular pathway." *Circulation* 84(4), 1644-1661
- 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* 6(4), 461-467
- Schumacher G, Hess J, Bühlmeier K, Brodherr-Heberlein, A. Pflaumer, G. Hessling, A. Pflaumer, G. Hessling, B. Zrenner. In: *Klinische Kinderkardiologie: Diagnostik und Therapie der angeborenen Herzfehler. Herzrhythmusstörungen – Nichtinvasive Diagnostik und Therapie. Herzrhythmusstörungen – Elektrophysiologische Untersuchung und Ablation*. In: 4. Auflage; Springer 2008, 47 - 69 und 537 - 551
- Sealy WC, Gallagher JJ (1981): "Surgical treatment of left free wall accessory pathways of atrioventricular conduction of the Kent type." *J Thorac Cardiovasc Surg* 81(5), 698-706
- Skanes AC, Dubuc M, Klein GJ, Thibault B, Krahn AD, Yee R, Roy D, Guerra P, Talajic M (2000): "Cryothermal ablation of the slow pathway for the elimination of atrioventricular nodal reentrant tachycardia." *Circulation* 102(23), 2856-2860
- Skanes AC, Yee R, Krahn AD, Klein GJ (2002): "Cryoablation of Atrial Arrhythmias." *Cardiac Electrophysiology Review* 6(4), 383-388
- Spar DS, Silver ES, Hordof AJ, Torres A, Liberman L (2010): "Coronary artery spasm during radiofrequency ablation of a left lateral accessory pathway." *Pediatr Cardiol* 31(5), 724-727
- 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 and Clinical Electrophysiology* 24(6), 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* 93(11), 884-889
- Tai CT, Chen SA, Chiang CE, Chang MS (1999): "Characteristics and radiofrequency catheter ablation of septal accessory atrioventricular pathways." *Pacing and clinical electrophysiology* 22(3), 500-511
- Vedel J, Frank R, Grosogeat Y, Cabrol C, Facquet J (1976): "[Atrioventricular conduction by a bundle of Kent discovered after a surgical A.V.B]." *Arch Mal Coeur Vaiss* 69(4), 427-432
- Wadhwa MK, Rahme MM, Dobak J, Li H, Wolf P, Chen P, Feld GK (2000): "Transcatheter cryoablation of ventricular myocardium in dogs." *Journal of interventional cardiac electrophysiology* 4(3), 537-545
- White FC, Roth DM, Bloor CM (1986): "The pig as a model for myocardial ischemia and exercise." *Laboratory animal science* 36(4), 351-356
- Zhou L, Keane D, Reed G, Ruskin J (1999): "Thromboembolic complications of cardiac radiofrequency catheter ablation: a review of the reported incidence, pathogenesis and current research directions." *J Cardiovasc Electrophysiol* 10(4), 611-620

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wandproliferation nach RFA.....	9
Abbildung 2: Durchleuchtungsaufnahme während einer Kryoenergieapplikation.....	13
Abbildung 3: 3D-Monitoring des Navigationssystems.....	14
Abbildung 4: Röntgen-Aufnahme während einer ICUS-Untersuchung.....	15
Abbildung 5: Makroskopische Läsion.....	16
Abbildung 6: Koronarangiographie der linken Koronararterie.....	23
Abbildung 7: Koronarangiographie der rechten Koronararterie.....	24
Abbildung 8: ICUS-Aufnahme der rechten Koronararterie.....	25
Abbildung 9: Makroskopische Darstellung einer ventrikulären Kryoläsion.....	26
Abbildung 10: Makroskopische Darstellung einer atrialen Kryoläsion.....	26
Abbildung 11: Querschnitt durch eine Kryoenergieläsion mit Anteilen der unmittelbar benachbarten rechten Koronararterie.....	27
Abbildung 12: Mikroskopische Darstellung einer Kryoenergieläsion mit Anteilen der benachbarten rechten Koronararterie.....	28
Abbildung 13: Histologie einer doppelten Kryoläsion am ventrikulären Ansatz des Mitralklappenannulus.....	28
Abbildung 14: Immunhistologische Desmin-Färbung einer Kryoenergieläsion am atrialen Ansatz der Trikuspidalklappe.....	29
Abbildung 15: Histologie einer Kryoläsion am atrialen Ansatz des AV-Klappenringes mit intakter rechter Koronararterie.....	30
Abbildung 16: Histologie einer intakten rechten Koronararterie.....	31
Abbildung 17: Histologie einer Kryoläsion mit Verschmälerung der Arterienwand der rechten Koronararterie.....	32
Abbildung 18: Histologie einer rechten Koronararterie mit Verdünnung des Wandaufbaus der Lamina media und adventitia mit Koagulationsnekrosen.....	32
Abbildung 19: Immunhistologische Desminfärbungen mit Verlust von intaktem Muskelgewebe der rechten Koronararterienwand.....	33
Abbildung 20: Histologie einer endokardialen Thrombusformation.....	34
Abbildung 21: Histologie einer doppelten Kryoläsion am atrialen Trikuspidalklappenansatz mit venöser und endokardialer Thrombusformation.....	34
Abbildung 22: Boxplot-Darstellung der Volumenergebnisse.....	38
Abbildung 23: Boxplot-Darstellung der Tiefenausdehnung.....	39

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Histologische Aufarbeitung mit aufsteigenden Alkoholreihen.....	17
Tabelle 2: Histologische Aufarbeitung durch Alkoholfixierung.....	18
Tabelle 3: Histologische Aufarbeitung durch Entplastung	19
Tabelle 4: Histologische Aufarbeitung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	19
Tabelle 5: Histologische Aufarbeitung der Elastika-van-Gieson-Färbung	19
Tabelle 6: Histologische Aufarbeitung der immunhistologischen Färbungen.....	20
Tabelle 7: Läsionsausdehnungen der atrialen Kryoläsionen.....	35
Tabelle 8: Statistische Ergebnisse der atrialen Kryoläsionen	36
Tabelle 9: Läsionsausdehnungen der ventrikulären Kryoläsionen	37
Tabelle 10: Statistische Ergebnisse der ventrikulären Kryoläsionen	37
Tabelle 11: Gesamtergebnisse mit Signifikanzberechnung	40
Tabelle 12: Läsionsvolumina im Vergleich der unterschiedlichen Energiemodalitäten.....	45

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. T. Paul, Leiter der Pädiatrische Kardiologie und Intensivmedizin der Universitätsmedizin Göttingen sowie der Betreuerin meiner Dissertation, Frau Dr. med. Heike Schneider, für das Vertrauen und die Ermöglichung der Durchführung dieser Forschungsarbeit. Beide haben mein wissenschaftliches Arbeiten in hohem Maße gefördert und mich während der Arbeit kontinuierlich vorbildlich betreut und mich durch viele Diskussionen und Ratschläge von ihren großen wissenschaftlichen und klinischen Erfahrung profitieren lassen.

Einen weiteren Dank möchte ich den beteiligten Damen und Herren der pathologischen Abteilung der Universitätsmedizin Göttingen für die Nutzung sowie Hilfestellung im Umgang mit der virtuellen Mikroskopie und den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Statistik aussprechen.

Ich danke allen Kollegen, die meine Arbeit durch viele Anregungen und wertvolle Hinweise bereichert haben und für die angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Namentlich möchte ich in diesem Zusammenhang insbesondere Frau Andrea Poppe, Frau Karin Baer und Herr Dr. Thomas Quentin nennen, ohne deren Hilfe die histologischen Aufarbeitungen kaum möglich gewesen wären. Darüber hinaus danke ich Frau Anna Overwaul für die Einarbeitung in die Auswertungssoftware der virtuellen Mikroskopie und Einblicke in ihre Mitschriften zu den Forschungsprotokollen unserer Arbeitsgruppe.