

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Universitäres Herz- und Gefäßzentrum UKE Hamburg  
Klinik und Poliklinik für Kardiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Blankenberg

Cardiac glial cells release neurotrophic S100B  
upon catheter-based treatment of atrial fibrillation

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Katja Hedenus  
aus Rostock

Hamburg 2021

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Arne Hansen**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Heimo Ehmke**

**Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. Andreas Metzner**

**Datum der Disputation: 15.09.2021**

## Inhaltsverzeichnis

1. Originalarbeit der Publikationspromotion .....	4
2. Einleitung .....	25
2.1. Pulmonalvenenisolation als Therapiestrategie bei Vorhofflimmern.....	25
2.2. Das autonome intrakardiale Nervensystem.....	25
2.3. Die Herzfrequenzvariabilität spiegelt die autonome Funktion des Herzens wider .....	28
2.4. S100B als Biomarker für neuronalen Schaden.....	29
2.5. Zielsetzung .....	29
3. Methoden .....	30
3.1. Studiendesign .....	30
3.2. Messungen der Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität .....	31
3.3. Follow-up .....	31
3.4. Proteinanalysen .....	32
3.5. Immunhistochemischer Nachweis von S100B.....	32
3.6. <i>In vitro</i> Experimente .....	32
4. Ergebnisse .....	33
4.1. Charakterisierung des Patientenkollektivs.....	33
4.2. Expression von S100B im autonomen intrakardialen Nervensystem.....	33
4.3. Anstieg der S100B-Plasmakonzentrationen nach Pulmonalvenenisolation .....	34
4.4. Veränderungen der Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität .....	35
4.5. Follow-up: weniger Rezidive bei höherem S100B-Anstieg .....	35
4.6. Expression und Einfluss von S100B auf das autonome intrakardiale Nervensystem..	36
4.7. Adipozyten können als mögliche Quelle von S100B vernachlässigt werden .....	36
5. Diskussion.....	37
5.1. Das autonome intrakardiale Nervensystem als Substrat für Vorhofflimmern .....	37
5.2. S100B als Marker für die neuronale Modulation durch Pulmonalvenenisolation.....	38
5.3. Autonome Veränderungen nach Pulmonalvenenisolation .....	39
5.4. Schlussfolgerung .....	39
5.5 Zusammenfassung .....	40
5.6 Abstract .....	40
6. Literaturverzeichnis .....	42
7. Abkürzungsverzeichnis.....	51
8. Erklärung des Eigenanteils .....	52
9. Danksagung .....	53
10. Lebenslauf.....	54
11. Eidesstattliche Versicherung .....	55

# 1. Originalarbeit der Publikationspromotion

## ATRIAL FIBRILLATION

### Cardiac glial cells release neurotrophic S100B upon catheter-based treatment of atrial fibrillation

Katharina Scherschel<sup>1,2\*</sup>, Katja Hedenus<sup>1,2\*</sup>, Christiane Jungen<sup>1,2</sup>, Marc D. Lemoine<sup>1,2,3</sup>, Nicole Rübsamen<sup>4</sup>, Marieke W. Veldkamp<sup>5</sup>, Niklas Klatt<sup>1,2</sup>, Diana Lindner<sup>2,4</sup>, Dirk Westermann<sup>2,4</sup>, Simona Casin<sup>5</sup>, Pawel Kuklik<sup>1,2</sup>, Christian Eickholt<sup>1,2</sup>, Nikolaj Klöcker<sup>6</sup>, Kalyanam Shivkumar<sup>7</sup>, Torsten Christ<sup>2,3</sup>, Tanja Zeller<sup>2,4</sup>, Stephan Willems<sup>1,2</sup>, Christian Meyer<sup>1,2†</sup>

Atrial fibrillation (AF), the most common sustained heart rhythm disorder worldwide, is linked to dysfunction of the intrinsic cardiac autonomic nervous system (ICNS). The role of ICNS damage occurring during catheter-based treatment of AF, which is the therapy of choice for many patients, remains controversial. We show here that the neuronal injury marker S100B is expressed in cardiac glia throughout the ICNS and is released specifically upon catheter ablation of AF. Patients with higher S100B release were more likely to be AF free during follow-up. Subsequent *in vitro* studies revealed that murine intracardiac neurons react to S100B with diminished action potential firing and increased neurite growth. This suggests that release of S100B from cardiac glia upon catheter-based treatment of AF is a hallmark of acute neural damage that contributes to nerve sprouting and can be used to assess ICNS damage.

#### INTRODUCTION

Atrial fibrillation (AF) is an epidemic heart rhythm disorder resulting in increased morbidity and mortality (1). Catheter ablation is currently the most effective therapy for patients with symptomatic AF. During this treatment, the pulmonary veins are electrically isolated from the atrial myocardium by thermal tissue damage [pulmonary vein isolation (PVI)] (2). Besides abolishment of abnormal electrical impulses originating from the pulmonary veins, the mechanisms by which catheter ablation is beneficial are not fully understood because both myocardial and neural structures can be affected (3). It has been suggested that PVI modulates the intrinsic cardiac nervous system (ICNS), which could explain the beneficial effect of ablation because some of the key elements of the ICNS are located within epicardial fat pads in close proximity to ablation sites near the pulmonary veins (4). The ICNS—a complex network of multiple types of neurons, glial cells, and interconnecting and end organ–targeting fibers—regulates cardiac physiology on a beat-to-beat basis (5, 6). Collateral damage of this delicate network during catheter ablation of AF is well known (2), but how this affects patient outcome remains controversial. The relevance of ICNS activity in the pathophysiology of AF has long been established (7), and some studies have even suggested that targeted damage of the ICNS additionally to PVI reduces AF recurrences (8, 9). However, others have shown that targeted disruption of the ICNS has no additional benefit or might even be proarrhythmic

(10, 11). To elucidate the underlying mechanisms, sensitive methods are needed to evaluate acute intracardiac neural damage.

Neural injuries lead to the release of damage-associated molecular pattern proteins (DAMPs) (12). S100B is a DAMP that is abundantly expressed in glial cells and some neuronal populations in the central and peripheral nervous system (13). It exerts a variety of intra- and extracellular functions, mediating neurotrophic activity, survival, as well as neuronal electrical activity (14, 15). S100B is secreted constitutively but has also been characterized as a marker for several forms of neural damages because of its acute release immediately after injury (14, 16). S100B is required for regeneration in the peripheral nervous system (17), exerting effects via the receptor of advanced glycosylation end products (RAGE) (14, 18). Whether these observations applied to intracardiac neurons was previously unknown.

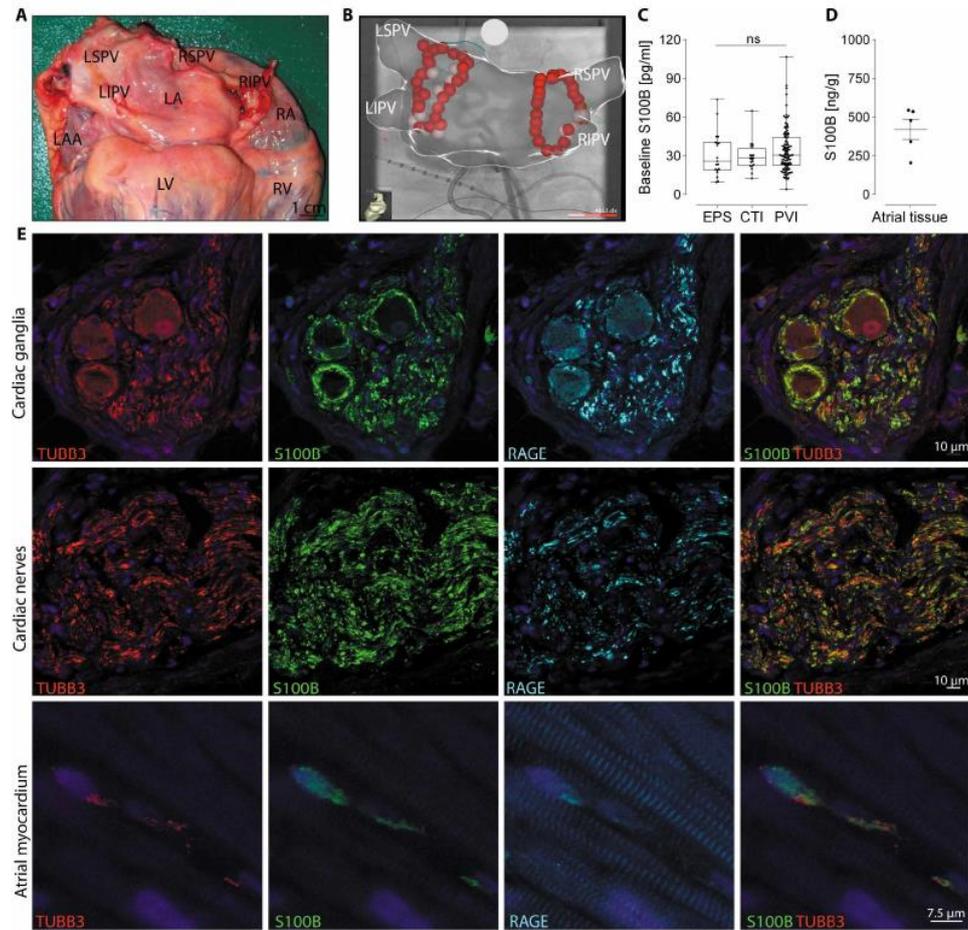
Nerve fibers disrupted by AF ablation can functionally recover (19). Thus, we aimed to characterize the neurotrophic factor S100B in intracardiac neural damage induced by AF ablation to elucidate the influence of intracardiac neural damage on patient outcome. Here, we show that S100B is expressed in glial cells of the ICNS and is specifically released into the blood of patients after ablation of AF. Patients with higher concentrations of S100B after ablation had less AF recurrences in a 6-month follow-up, supporting a beneficial effect of ICNS damage. S100B diminished action potential (AP) firing and induced neurite growth in intracardiac neurons *in vitro*, indicating a potentially proarrhythmic contribution to postprocedural nerve sprouting.

#### RESULTS

##### S100B expression in glial cells within the ICNS hierarchy

Key components of the ICNS are located in the proximity of the pulmonary veins (Fig. 1A), where their activity has been found to trigger AF (7) and where AF ablation is performed (Fig. 1B). Patients with AF receiving a catheter ablation (PVI group,  $n = 112$ ) did not show differences in baseline plasma S100B concentration compared with controls without AF receiving a sole electrophysiological study (EPS,  $n = 19$ ) or an ablation for typical atrial flutter in the right atrium

<sup>1</sup>Department of Cardiology-Electrophysiology, cNEP (cardiac Neuro- and Electrophysiology research group), University Heart Centre, University Hospital Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany. <sup>2</sup>DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), partner site Hamburg/Kiel/Lübeck, 13347 Berlin, Germany. <sup>3</sup>Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany. <sup>4</sup>Department of General and Interventional Cardiology, University Heart Center Hamburg, University Hospital Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany. <sup>5</sup>Department of Clinical and Experimental Cardiology, Heart Center, Academic Medical Center, 1105 AZ, Amsterdam, Netherlands. <sup>6</sup>Institute of Neural and Sensory Physiology, Medical Faculty, University of Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany. <sup>7</sup>Cardiac Arrhythmia Center and Neurocardiology Research Center of Excellence, Molecular, Cellular and Integrative Physiology Interdepartmental Program, UCLA, Los Angeles, CA 90095, USA. \*These authors contributed equally to this work. †Corresponding author. Email: cmey@web.de



**Fig. 1. S100B in the human ICNS.** (A) Photograph of a human heart showing a posterior view of the left atrium (LA) and the pulmonary veins where cardiac ganglia and nerves are located. (B) Anatomical three-dimensional map of the LA (posterior view). The red dots show the areas in which AF ablation via PVI is performed. (C) Preprocedural S100B plasma concentrations in patients receiving a sole diagnostic EPS versus patients receiving an ablation of the muscular CTI versus AF ablation (PVI) [EPS:  $n = 19$ , CTI:  $n = 20$ , PVI:  $n = 112$ ; data presented as box plots (minimum to maximum);  $P < 0.05$  was considered statistically significant; compared using Kruskal-Wallis test]. ns, not significant. (D) S100B content of human atrial pectinate muscles per gram of tissue ( $n = 5$  tissue samples, data presented as means  $\pm$  SEM). (E) Immunohistochemical staining of S100B, TUBB3, and RAGE in intracardiac ganglia, cardiac nerves, and delicate nerve fibers within the atrial myocardium. LSPV, left superior pulmonary vein; RSPV, right superior pulmonary vein; LIPV, left inferior pulmonary vein; RIPV, right inferior pulmonary vein; LAA, left atrial appendage; RA, right atrium; LV, left ventricle; RV, right ventricle.

[cavotricuspid isthmus (CTI) ablation,  $n = 20$ ; Fig. 1C]. S100B measured in human atrial pectinate muscles revealed a total content of  $422 \pm 65.4$  ng/g atrial tissue, confirming relevant amounts of S100B were present in cardiac tissue (Fig. 1D). To investigate S100B expression within the ICNS, we used immunohistochemical costaining with the neural marker  $\beta$ -III-tubulin (TUBB3; Fig. 1E). This revealed that S100B-expressing cells adjoin neural structures as follows: In intracardiac ganglia, S100B-expressing glial cells densely surround large neuronal cell bodies. In large cardiac nerves of the

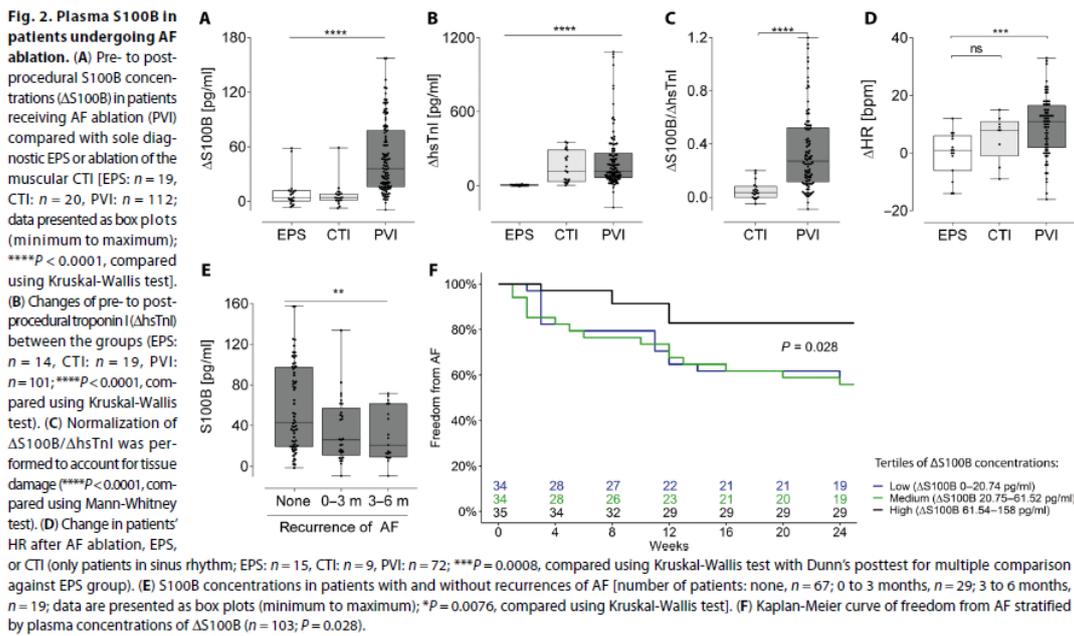
left atrial myocardium, S100B<sup>+</sup> glial cells are found within the nerve ensheathing the single fibers. On a cellular level, delicate nerve fibers innervating single cardiomyocytes were found adjacent to glial cells (fig. S1, A and B). Staining for Sox10, which is expressed in the nuclei of glia at all developmental stages (20), confirmed the identity of S100B<sup>+</sup> cells (fig. S1C). The S100B receptor RAGE was found to be expressed in the somata of intracardiac neurons as well as in nerve fibers, colocalizing with TUBB3, verifying the presence of the S100B receptor in intracardiac nerves (Fig. 1E).

**Increase in S100B plasma concentrations in patients after AF ablation**

To investigate whether intracardiac neural damage leads to changes in S100B plasma concentrations, we analyzed blood samples before and immediately after catheter-based treatment of AF. Baseline characteristics of all patients are given in table S1. In the PVI group, S100B plasma concentrations increased from  $33.8 \pm 1.5$  to  $81.9 \pm 4.1$  pg/ml ( $P < 0.0001$ ; Fig. 2A). In contrast, only small changes in S100B plasma concentrations were detectable in patients receiving an EPS (no ablation) ( $31.3 \pm 4.0$  to  $41.0 \pm 6.4$  pg/ml,  $P = 0.0276$ ). This was also the case in the CTI group receiving ablation of a sparsely innervated muscular sleeve in the right atrium, between the inferior caval vein and the tricuspid valve (21) ( $29.5 \pm 2.5$  to  $36.3 \pm 3.6$  pg/ml,  $P = 0.0032$ ). To compare myocardial damage between the groups, we used a high-sensitivity detection assay to quantify troponin I (hsTnI) (22). In the PVI group, hsTnI increased from  $4.1 \pm 0.3$  to  $151.5 \pm 11.39$  pg/ml ( $P < 0.0001$ , Wilcoxon test; Fig. 2B) after ablation, which was comparable to hsTnI change in the CTI group (from  $14.6 \pm 3.1$  to  $188.5 \pm 26.27$  pg/ml,  $P < 0.0001$ , Wilcoxon test). Only small increases were detected in the EPS group, from  $7.84 \pm 2.1.23$  to  $14.2 \pm 3.6$  pg/ml ( $P = 0.0017$ , Wilcoxon test). Normalization of  $\Delta S100B$  to  $\Delta hsTnI$  shows a 4.5 times higher S100B concentration in the PVI group compared with the CTI group, suggesting more neural damage in AF ablation with the same amount of myocardial damage ( $0.05 \pm 0.02$  to  $0.33 \pm 0.03$ ,  $P < 0.0001$ , Fig. 2C). Corresponding to the well-known cholinergic denervation resulting from AF ablation, the mean heart rate (HR) increased from  $60 \pm 1$  to  $69 \pm 1$  bpm ( $P = 0.0001$ ,  $n = 72$ ; Fig. 2D) within 24 to 48 hours after the procedure but did not increase in the control groups (EPS:  $61 \pm 3$  to  $62 \pm 3$  bpm,  $P = 0.8956$ ,  $n = 15$ ; CTI:  $60 \pm 3$

to  $66 \pm 3$  bpm,  $P = 0.0646$ ,  $n = 9$ ). To further characterize autonomic function, heart rate variability (HRV) was analyzed before and after PVI in short-term electrocardiogram (ECG) recordings (table S2). Parameters indicating parasympathetic function were reduced (SD of normal RR intervals:  $32.2 \pm 10.1$  to  $13.3 \pm 9.8$  ms,  $P = 0.0020$ ; the square root of the mean squared differences of successive NN intervals:  $19.4 \pm 8.8$  to  $8.8 \pm 8.3$  ms,  $P = 0.0049$ ). Low-frequency (LF) component, a parameter used in several studies as an indirect parameter of sympathetic function (23, 24), was lower after PVI ( $257.8 \pm 166.7$  to  $74.8 \pm 187.5$  ms<sup>2</sup>,  $P = 0.0322$ ), indicating ablation damaged sympathetic structures in addition to parasympathetic structures. Reduction in the LF/HF ratio, a parameter for sympathovagal balance, was reduced (from  $2.8 \pm 2.4$  to  $1.1 \pm 0.7$ ,  $P = 0.0426$ ), indicating a stronger damage of parasympathetic cell bodies and fibers. Supporting this, immunohistochemical costaining of S100B with the sympathetic marker tyrosine hydroxylase (fig. S2) in the human atrial myocardium showed that sympathetic fibers are also ensheathed by S100B-expressing glial cells. This is in line with other studies showing intertwined sympathetic and parasympathetic nerve fibers in human atrial myocardium (25, 26).

Six months of follow-up was available for 103 patients in the PVI group (92.0%). Of these, 29 patients (28.2%) had a documented AF episode within the first 3 months after ablation. A total of 19 patients (18.4%) had a documented AF episode between 3 and 6 months after ablation. Independent of the time of recurrences, patients without AF episodes had a higher S100B release after ablation (no recurrences:  $57.3 \pm 5.1$  pg/ml; recurrence 0 to 3 months after ablation:  $35.0 \pm 5.8$  pg/ml; recurrence 3 to 6 months after ablation:  $30.7 \pm 5.9$  pg/ml;  $P = 0.0135$ ; Fig. 2E). Outcome of ablation for the 6 months



Downloaded from <http://stm.sciencemag.org/> by guest on May 23, 2019

of follow-up is depicted in the Kaplan-Meier curve (Fig. 2F). Patients with higher  $\Delta$ S100B showed a better outcome compared with the patients with lower  $\Delta$ S100B concentrations ( $P = 0.028$ ).

### S100B release from the ICNS

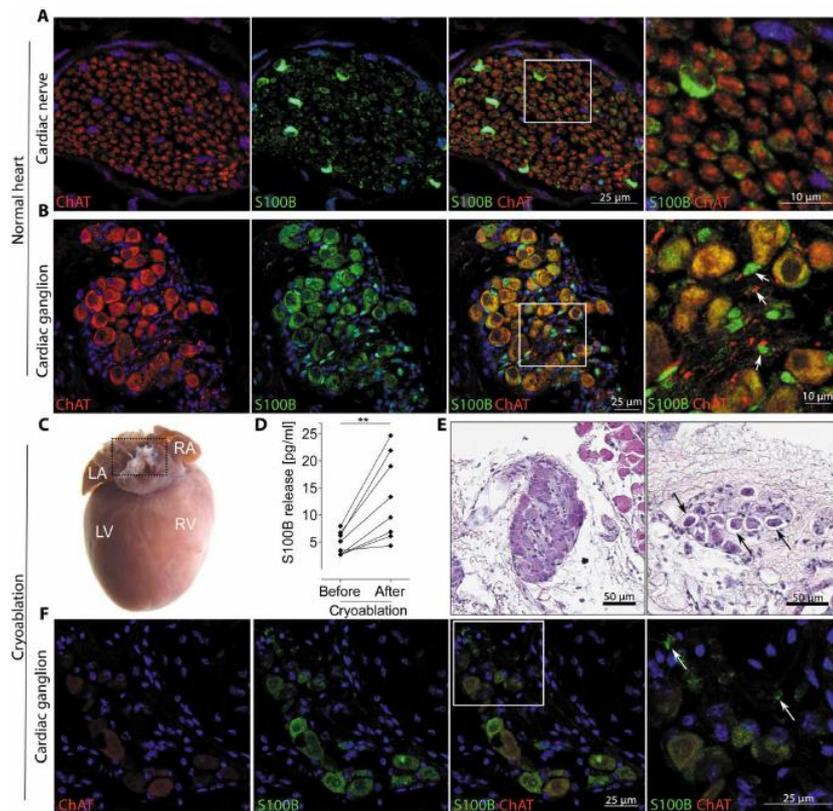
Because S100B released from the central nervous system might be a potential confounder for the increase in plasma concentrations, we used ex vivo mouse hearts without central innervation to verify S100B release specifically from cardiac nerves. We confirmed the expression of S100B in nerves (Fig. 3A) and ganglia (Fig. 3B) within murine hearts. Next, we induced cryothermal damage to mouse hearts at the posterior wall of the left atrium, where neural structures are located (boxed area in Fig. 3C). S100B concentrations in the perfusion fluid of these hearts increased acutely after thermal damage ( $4.7 \pm 0.7$  pg/ml versus  $13.2 \pm 2.7$  pg/ml,  $P = 0.0045$ ; Fig. 3D). Hematoxylin and eosin (H&E) staining of cardiac sections after acute cryodamage showed some ganglia with acute signs of thermal damage and necrosis, whereas others appeared inconspicuous (Fig. 3E). Immunohistochemical detection of ChAT and S100B in ganglia with cryodamage was diffuse (Fig. 3F), indicating loss of structural integrity (27).

The release of S100B by peripheral nerves was further verified by data from one patient in whom a temporary phrenic nerve damage occurred during ablation. Nerve damage was detected during routine continuous monitoring throughout the procedure (fig. S3). S100B concentration in this patient was elevated compared with the mean increase in the PVI group ( $326.9$  pg/ml versus  $47.9$  pg/ml mean increase in the PVI group; fig. S3). To rule out adipocyte damage as a potential source for S100B (28), we investigated activin A, a marker for cardiac fat tissue (29). Activin A was increased in the PVI as well as in the CTI control group after the procedure (PVI:  $n = 34$ ,  $243.2 \pm 19.4$  to  $2035.1 \pm 70.8$  pg/ml,  $P < 0.0001$ ; CTI:  $n = 5$ ,  $274.3 \pm 49.3$  to  $1897.4 \pm 238.0$  pg/ml,  $P = 0.0014$ ; fig.

S4). Because S100B was increased in the PVI but not in the CTI group, this indicates that the release is specific to nerve and not to adipocyte damage.

### S100B affects electrophysiology of intracardiac neurons but not cardiomyocytes

S100B has been shown to alter central neuronal cellular electrophysiology in mollusks (30). To evaluate whether this also holds true for intracardiac neurons or the myocardium itself, we analyzed the effects of S100B on isolated murine intracardiac neurons, murine whole hearts, and human atrial myocardial tissue. The exposure of intracardiac neurons to recombinant S100B strongly diminished the AP firing rate during long-lasting depolarizing pulses ( $n = 5$ ;



**Fig. 3. S100B release from the ICNS in murine hearts ex vivo.** S100B expression in the murine ICNS in nerve fibers (A) and intracardiac ganglia (B), as shown by the costaining with choline acetyltransferase (ChAT). White boxed region is shown at higher magnification in the rightmost panel. S100B<sup>+</sup> glial cells are marked with white arrows in the magnification. (C) Photograph of a murine heart showing the area surrounding the pulmonary veins where cryogenic damage was generated (black box). (D) S100B measured in the perfusion fluid before and after cryogenic damage in ex vivo mouse hearts ( $n = 8$ ;  $**P = 0.0045$ , compared using paired *t* test). (E) Histological characterization of a murine heart after acute cryoablation. H&E staining of a murine cardiac ganglion without (left) and with acute signs of thermal damage (right) from a heart after ex vivo cryoablation. Cellular shrinkage marked by black arrows. (F) Staining of ChAT and S100B in cryodamaged ganglia. Glial cells are marked by white arrows. White boxed region in the merged panel is shown at higher magnification in the rightmost panel.

Fig. 4A). This effect developed within minutes and was not reversible upon washout during the duration of the experiment (Fig. 4B). Normalized firing frequency showed a significant reduction after 7 min of S100B treatment with a saturating effect after 15 min, when firing frequency was reduced to  $52 \pm 18\%$  of time-matched controls ( $P < 0.05$ ; Fig. 4C). The AP firing frequency in controls remained stable over a 20-min period ( $n = 6$ ), excluding rundown effects (Fig. 4C). We did not detect changes in AP shape in isolated human atrial pectinate muscles after 20 min of incubation with S100B (Fig. 4, D and E, and table S3). Similarly, electrophysiological parameters in murine whole hearts did not change upon exposure to S100B (Fig. 4F).

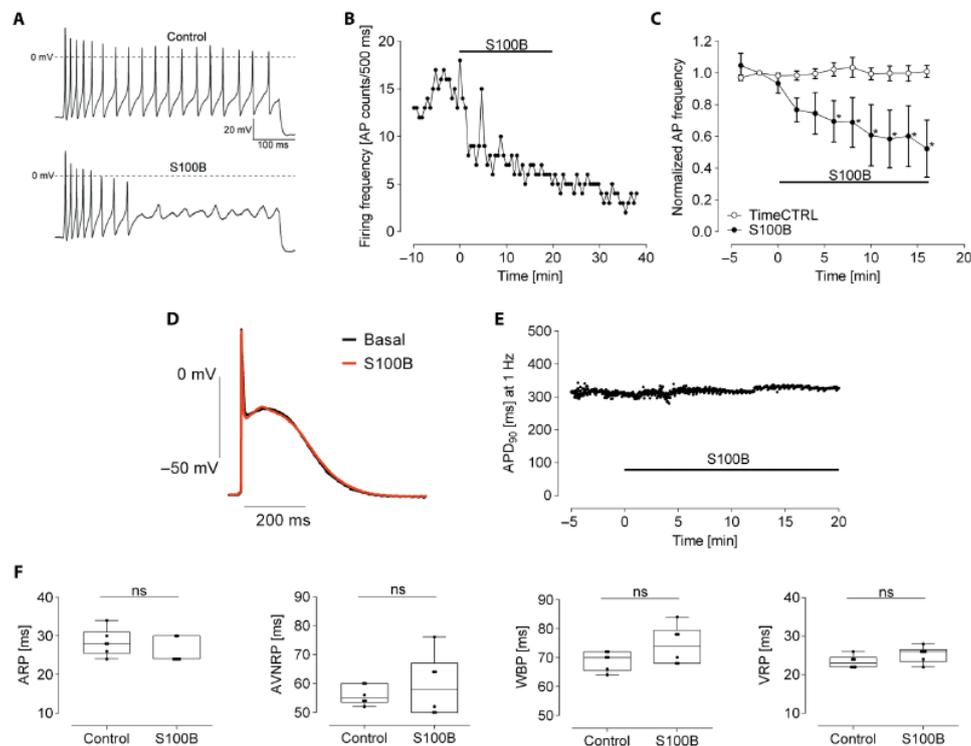
#### S100B induces neurite growth in intracardiac neurons

Because S100B is known to positively affect neurite growth (18), we aimed to evaluate its role in the ICNS. After infusion of S100B into murine hearts, an enrichment of S100B was found in cardiac nerves and ganglia, but not in the surrounding adipose tissue (Fig. 5A). We

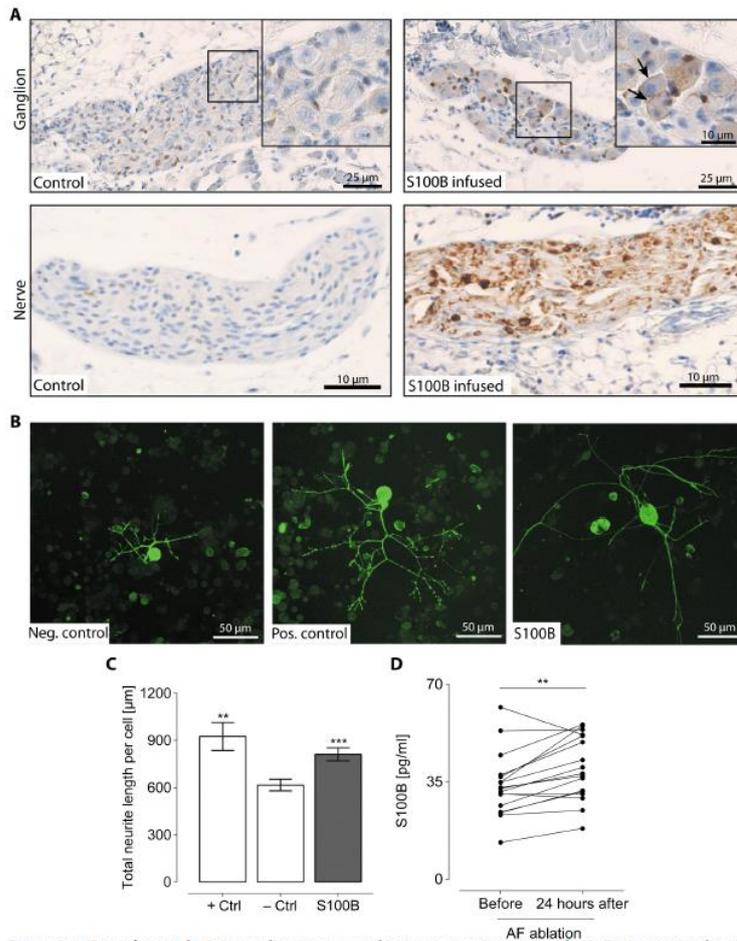
then cultivated intracardiac neurons from adult mice with recombinant S100B. After 16 hours in the presence of S100B (100 ng/ml), neurons had longer neurites compared with the negative control ( $812.1 \pm 41.9$  to  $616.1 \pm 37.2 \mu\text{m}$ ,  $P = 0.0009$ ; Fig. 5, B and C). In patients, we were still able to detect elevated S100B plasma concentrations on the day ( $19.8 \pm 4.1$  hours) after the ablation procedure ( $39.8 \pm 11.5$  pg/ml versus  $33.6 \pm 11.5$  pg/ml at baseline,  $n = 18$ ,  $P = 0.002$ ; Fig. 5D).

#### DISCUSSION

More than 100,000 catheter-based AF ablations are performed annually in Europe alone (31), and the number is increasing (32). Although the relevance of the ICNS in the pathophysiology of AF has long been established (7), the impact of intracardiac neural damage on cardiac electrophysiology during AF ablation remains unclear. We found that the neural damage marker S100B is released from cardiac glial cells upon ICNS damage and that S100B increases neurite



**Fig. 4. S100B diminishes neuronal, but not myocardial, AP firing.** (A) Exemplary trains of APs evoked by long-lasting (500 ms) depolarizing current pulses (150 pA, amplitude) in control conditions (upper trace), and 10 min after application of recombinant S100B (100 ng/ml) (lower trace) in single murine intracardiac neurons. (B) Plot showing the time course of the effect of S100B on firing frequency in single murine intracardiac neurons. (C) Averaged normalized AP frequency from intracardiac neurons as a function of time in the absence (TimeCTRL) and the presence of S100B [TimeCTRL  $n = 6$  cells, S100B  $n = 5$  cells;  $*P < 0.05$ , compared using two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA)]. (D) Exemplary AP shape in human atrial pectinate muscles at basal state and upon exposure to S100B (100 ng/ml) ( $n = 3$  independent experiments). (E) Continuous measurement of AP duration at 90% of repolarization ( $\text{APD}_{90}$ ) in human atrial myocardium (paced at 1 Hz) from 5 min before to 20 min after the superfusion with S100B (100 ng/ml). (F) Cardiac electrophysiological parameters in control hearts and hearts infused with recombinant S100B ( $n = 6$  per group; data are presented as box plots (minimum to maximum); compared using Mann-Whitney or unpaired  $t$  test as appropriate;  $P < 0.05$  was considered statistically significant). ARP, atrial refractory period; WBP, Wenckebach period; AVNRP, AV nodal recovery period; VRP, ventricular refractory period.



**Fig. 5. S100B is taken up by intracardiac neurons and increases neurite outgrowth.** (A) Ex vivo murine hearts stained for S100B showing enrichment in intracardiac nerves and ganglia after infusion of recombinant S100B (100 ng/ml, 90 min). Boxed regions are shown at higher magnification. (B) Images and (C) quantification of neurite lengths in murine intracardiac neurons cultivated for 18 hours with recombinant S100B (100 ng/ml) [positive control; 5% fetal calf serum  $n = 29$ , negative control  $n = 108$ , S100B (100 ng/ml)  $n = 113$ ; data are presented as means  $\pm$  SEM and represent five independent experiments with two to four replicates per condition; \*\* $P = 0.0011$ , \*\*\* $P = 0.0009$ ; groups were compared with Kruskal-Wallis and Dunn's posttest for multiple comparisons against negative control]. (D) Quantification of S100B in plasma from patients before and 1 day after ablation ( $n = 17$ ; \*\* $P = 0.002$ , compared using paired  $t$  test).

growth, thus potentially contributing to intracardiac nerve sprouting after ablation.

The S100 protein family consists of more than 20 calcium-binding proteins, each with unique characteristics such as cell-specific expression and specific intra- and extracellular functions (14, 15). Among the first to be discovered in 1965 was S100B (33), a protein expressed and secreted by glial cells, which was shown to functionally modulate neuronal survival and outgrowth 20 years later (34). Because of its immediate release after neural damage, S100B is the

member of the family that is most extensively characterized as a biomarker for central neural damage (14) and was recently added to the Scandinavian guidelines for the management of traumatic head injuries (35). Even though most clinical studies focus on the release of S100B in central neural damage, it is also widely considered a marker for glial cells of the peripheral nervous system (36). Here, we established that S100B is prominently expressed in glial cells adjoining neural structures throughout the ICNS hierarchy in humans and mice. Together with the release of S100B into the blood of patients after ablation of the left atrium, this indicates that S100B is released because of ICNS damage. Still, S100B from central sources, for example due to asymptomatic cerebral emboli as a side effect of ablation, might be a potential confounder (37). Although the rate of such events varies broadly among studies—from 1.7% (38) to 38% (39) depending on catheter type, energy source, and anticoagulation—more than 98% of patients in our cohort presented an increase in S100B concentration. Several other arguments point toward a relevant cardiac origin of S100B: (i) We showed that S100B is released upon damage from ex vivo mouse hearts devoid from central innervation; (ii) one patient showed a temporary attenuation in phrenic nerve activity during the ablation procedure, and this patient had the highest S100B increase among all patients, fortifying relevant S100B releases from peripheral nerves; (iii) releases of S100B up to 48 hours after coronary bypass procedures were shown to indicate central damage (40). Our study focused on the immediate increase in S100B after AF ablation; thus, the timing supports that S100B originates from the ICNS and not the central nervous system.

Although the destruction of neuronal cell bodies is permanent, neurite regrowth is an established concept in the peripheral nervous system and leads to reinnervation of the target organ and regain of functional control after damage (41). Glial cells are involved in peripheral nerve sprouting via secretion of neurotrophic factors (42). Reinnervation in the ICNS after AF ablation is evidenced via indirect measurements of autonomic function as HRV and HR turbulence (19); nevertheless, specific mechanisms were not known yet. Our data indicate that S100B contributes to this process: We provide evidence that S100B is taken up by cardiac nerves and can induce neurite outgrowth in intracardiac neurons. The neurotrophic effect of S100B has been attributed

to downstream signaling of its receptor RAGE (18), which we show is expressed in human intracardiac neurons. It is well described that S100B influences neuronal electrical activity (30, 43, 44). Enes *et al.* (45) demonstrated that AP firing is an intrinsic negative signal suppressing neurite growth, which is in line with our findings. However, intracellular and extracellular S100B were shown to have different downstream effects: direct binding and phosphorylation of cytoskeletal and growth-associated proteins (15), as well as direct inhibition of EAG1 potassium channels regulating neuronal excitability (43). Therefore, reduced firing and neurite growth are not necessarily connected.

S100B released from glial cells might serve as a first-line signal to induce nerve sprouting in the ICNS. This has been described, for example, for nerve growth factor, which is released 1 day after AF ablation (46) and leads to outgrowth of sympathetic nerves. S100B<sup>+</sup> glial cells were found in the presence of parasympathetic and sympathetic nerves, indicating that S100B release marks damage of both types of nerves. Disruption of sympathetic neurons during ablation of AF has been previously described by us (47) and other groups (48) and is also in line with anatomical studies showing that adrenergic fibers proceed, together with parasympathetic fibers, via intracardiac ganglia to supply the ventricles (25, 26). Because local neurons in the heart are mostly parasympathetic, these were the focus of our study.

The benefits of accidental or targeted disruption of the ICNS on patient outcome are a matter of discussion that has not been resolved to date (8, 10, 11). This could be due to challenges associated with evaluating acute intracardiac neural damage, because clinically feasible methods are limited: Autonomic responses evoked by ablation itself or high-frequency stimulation can only detect the approximate localization of ganglia (49) and are therefore limited during subsequent ICNS modification. Recently, intraprocedural parameters such as RR interval, Wenckebach cycle length, and atrial-His interval shortening have been suggested as end points for the targeted ablation of ganglionated plexi (50) but can only reflect selected parts of the ICNS immediately during the procedure. Even though direct recordings of intrinsic cardiac nerve activity in humans have recently been reported (51), this method required electrode placement to be performed during open heart surgery. In contrast, the use of blood-based markers is reliable and has been shown to be useful, for example, blood-based marker analysis predicted successful sympathetic denervation of renal arteries during 6-month follow-up (52). A marker for neuronal damage induced by ablation is of utmost interest. Higher S100B release after ablation was associated with less AF recurrences during follow-up, supporting a beneficial effect of ICNS damage. Still, to decide whether targeted ICNS disruption, in addition to PVI, is desirable was beyond the scope of the current study. Nerve sprouting and heterogeneity after cardiac injury in the ventricles are related to arrhythmogenesis (53). Whether the neurotrophic effects of S100B are sufficient to create potential proarrhythmic substrates in patients after AF ablation and how that affects outcome remain to be elucidated.

Our study has some limitations: First, we chose patients with an ablation of the CTI as a control group because functional data indicate sparse innervation in that region (21), but detailed neuroanatomical studies are lacking. S100B concentrations increased marginally in this group, supporting that innervation of this area is scarce. Second, although S100B is not expressed in healthy cardiomyocytes, its expression is initiated in ventricular cardiomyocytes after myocardial infarction (54). We cannot exclude the possibility that atrial cardio-

myocytes react similarly; however, no differences were detectable in S100B concentrations from patients with and without a history of myocardial infarction in our cohort. Last, although reduced neuronal AP firing has been mechanistically linked to neurite outgrowth after peripheral damage (45), we do not know whether this is relevant during the regeneration processes in our patients. The correlation between S100B and patient outcome shown in our study might also be based on the amount of nerve damage rather than regeneration processes. Therefore, whether and to what degree subcellular effects of S100B influence patient outcome cannot be fully assessed yet.

In summary, our findings suggest that S100B release from cardiac glial cells is a hallmark of acute intracardiac neural damage in AF ablation. S100B contributes to sprouting of local neurons, reducing neuronal electrical activity, and increasing neurite growth. Further studies should assess the value of targeting the ICNS during ablation and impact on patient outcomes.

## MATERIALS AND METHODS

### Study design

The current study aimed to characterize the neurotrophic factor S100B in intracardiac neural damage. To this end, we used three different approaches: (i) In neuroanatomical studies, we characterized S100B expression in the human and murine ICNS. (ii) In an observational study, we analyzed S100B plasma concentration and autonomic function in patients undergoing catheter-based treatment of AF. (iii) Using *in vitro* experiments, we studied release and uptake of S100B as well as its cellular effects on human and murine tissues and cells.

For the observational study, plasma samples were obtained from femoral venous sheaths before and after ablation from patients receiving catheter-based treatment of AF [PVI group,  $n = 113$ ; 1 patient was excluded from all analyses because of reduction in compound motor action potential (CMAP) amplitude; fig. S3]. Two groups served as controls: patients who underwent an EPS without ablation ( $n = 19$ ) and patients with typical atrial flutter undergoing sole CTI ( $n = 21$ ; 1 patient was excluded from all analyses because of a diagnosis of AF), due to the limited autonomic innervation in that region (21). Sample sizes were chosen on the basis of pilot data in the beginning of the study. For *in vitro* experiments, Langendorff perfusion of murine hearts was performed to study the effect of S100B release and uptake without central neural influences. Effects of recombinant S100B on electrophysiology were studied in murine hearts, human atrial pectinate muscles, and murine isolated intracardiac neurons. Studies on neurite outgrowth were performed in cell culture using murine intracardiac neurons. Analyses of neurite lengths were performed blinded with regard to the treatment. We excluded outliers that were identified with the robust regression and outlier removal method. All specimens were assigned randomly to their respective treatment.

### Patient recruitment

Patients eligible for this study (clinicaltrials.gov: NCT03388333) had symptomatic AF and an indication for AF ablation without previous catheter-based or surgical ablations (PVI group), a diagnosis of right atrial flutter (CTI group), or an indication for an EPS (EPS group) for suspected atrial or ventricular tachyarrhythmia. Patients who received an ablation upon successful stimulation were excluded. Informed consent was obtained from all patients. Human tissues used were anonymized. This study was approved by the review

committee of the Medical Association of Hamburg, Germany, and conforms to all principles outlined by the Declaration of Helsinki.

#### EPSs and catheter ablation

All procedures in patients were performed under sedation with propofol, fentanyl, and, if necessary, midazolam as described previously (55). For the EPS group, diagnostic procedures were performed in patients with suspected supraventricular or ventricular arrhythmias according to institutional protocol. For the CTI group, diagnostic of typical atrial flutter, as well as CTI ablation, was performed using irrigated tip ablation catheters at 38 W with complete bidirectional block of the CTI as end point.

#### AF ablation group

AF ablation was performed via isolation of the PVs with either radiofrequency (RF;  $n = 62$ ) or cryoballoon ( $n = 50$ ). RF ablation was performed three dimensionally navigated point by point around ipsilateral veins with an adequate distance from the ostia using a 3.5-mm irrigated tip ablation catheter with a maximal power up to 25 W at the posterior wall and up to 30 W at the anterior wall. Esophageal temperature was measured throughout the procedure using a multipolar temperature-sensing catheter. For cryoballoon-based AF ablation, target application time in this study was 240 s per application. To assess integrity of the phrenic nerve during ablation, electrical stimulation was performed from the superior vena cava evoking a CMAP. The freezing cycle was immediately terminated if CMAP amplitude decreased by one-third, indicating loss of phrenic nerve capture or if temperature in the esophagus fell below 15°C. Electrical isolation for RF- and cryoballoon-based ablation was confirmed using a decapolar diagnostic catheter for circumferential mapping of the PVs.

#### HR and HRV

HR was analyzed from resting ECGs performed before and within 24 hours after the procedure in patients in sinus rhythm. To assess autonomic modulation, HRV analysis was performed according to the guidelines of the European Society of Cardiology and established protocols (23, 56) in randomly selected patients with AF ( $n = 10$ ) in sinus rhythm before and 24 hours ( $23.8 \pm 7.3$  hours) after the procedure. Patients had a 5-min resting period before a 5-min ECG was recorded. HRV analysis was performed using the public domain software Kubios HRV [Biosignal Analysis and Medical Imaging Group, Department of Physics and Mathematics, University of Eastern Finland, Finland (57)].

#### Follow-up

Patients were scheduled for visits in our outpatient clinic within 6 months after the procedure. Twelve-lead ECG and/or 24-hour Holter monitoring was performed when patients complained about symptoms. If patients missed a visit, they were contacted via phone to inquire for symptoms and asked to present at an outpatient clinic. Recurrence of AF was defined as an ECG-based episode of AF lasting at least 30 s.

#### Neuroanatomical methods

Human tissues for neuroanatomical studies were obtained from patients receiving open heart surgery (left atrial appendages and left appendage-atrial junction (58)) as well as from an explanted heart of a patient receiving transplantation (atrioventricular groove). Speci-

mens were cut into 1- to 2-cm blocks before fixation in neutral-buffered formalin for at least 48 hours at room temperature (RT). Murine hearts were Langendorff perfused to remove erythrocytes before fixation for 24 to 48 hours. After routine processing for paraffin embedding, specimens were sectioned at 4  $\mu$ m.

Immunohistochemistry was performed as described previously (47, 59). Sections were deparaffinized in Histo-Clear and a descending series of ethanol. Heat-induced antigen retrieval was performed with citrate buffer (pH 6) except for Sox10 (tris-EDTA, pH 9). Auto-fluorescence was quenched with 0.25% Sudan black/70% ethanol for 30 min. After permeabilization in 0.2% Triton X-100 in tris-buffered saline (TBS) for 10 min, sections were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) in TBS for 1 hour at RT. Primary antibodies (table S4) were incubated overnight at 4°C. After washing three times for 10 min each in TBS, secondary antibodies (table S5) were incubated for 2 hours at RT in TBS. Slides were mounted in DAPI Fluoromount-G (SouthernBiotech).

Images were taken using a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems) with  $\times 10$  numerical aperture (NA) = 0.3 HC PL Fluotar,  $\times 20$  NA = 0.7 HC PL APO CS Imm/Corr oil, and  $\times 40$  NA = 1.3 HCX PL APO CS objectives. Three-dimensional images were collected over the full range of the signal, and a maximum projection image was created using the Leica LAS AF software.

Chromogenic staining for S100B was performed with the Ventana BenchMark XT (Roche) slide preparation system with antigen retrieval performed in EDTA buffer (pH 8.0). The antibody was diluted 1:500 and visualized using the ultraView Universal DAB Detection Kit (Roche).

H&E staining of paraffin sections from cryoablated hearts was performed according to routine procedures.

#### Recombinant S100B

Because neurotrophic effects of S100B depends on its dimeric form, recombinant protein (MyBioSource) was dimerized using 5 mM sodium tetrathionate and 1 mM CaCl<sub>2</sub> (60). Dimerized protein was dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS) for 3 days.

#### In vitro EPSs in human atrial preparations

Right atrial pectinate muscles obtained from patients receiving open heart surgery were used for AP measurements (61). All specimens were placed in cardioplegic solution (100 mM NaCl, 50 mM taurine, 20 mM glucose, 10 mM KCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM MOPS, and 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) containing 30 mM myosin adenosine triphosphatase inhibitor BDM (2,3-butanedione monoxime) at RT immediately after excision and transferred to the laboratory, where pectinate muscles were isolated. APs were recorded with standard intracellular microelectrodes. Bath solution contained the following: 127 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.05 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 11 mM glucose, 22 mM NaHCO<sub>3</sub>, and 0.42 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, equilibrated with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> at  $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (pH 7.4). Preparations were field stimulated for at least 30 min (1 Hz) before data acquisition. S100B (100 ng/ml) was added to the superfusing solution for at least 20 min. APs were analyzed offline using the Lab-Chart software (ADInstruments).

#### Animals

C57BL/6 mice (8 to 16 weeks of age; stock number 000664, male and female, Jackson Laboratories) were used in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the

U.S. National Research Council Committee (8th edition, updated 2011) and approved by the regional regulatory authorities.

#### **In vitro EPs in murine whole hearts**

Langendorff preparation was performed with male mice as previously described (47). A 2F octapolar electrophysiology catheter (CIB'ER Mouse, NuMED Inc.) was inserted into the right ventricle for electrical stimulation with a cycle length of 100 ms for the initial 20-min equilibration period. To determine a direct effect of S100B on cardiac electrophysiology, human recombinant S100B (100 ng/ml) (30) was added to the perfusion buffer (modified Krebs-Henseleit solution: 119 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.6 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 8.3 mM glucose, and 2 mM Na pyruvate; pH 7.4, 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) after equilibration. Hearts perfused without S100B were used as a negative control. Electrophysiological parameters were determined 10 min later using an established protocol (47). Programmed stimulation was applied using a designated digital stimulus generator (STG4002, Multi Channel Systems) at twice the atrial or ventricular pacing threshold.

#### **In vitro cryoablation in murine whole hearts**

An in vitro ablation was performed to evaluate S100B release in an ex vivo Langendorff heart without central innervation. After equilibration, cryogenic damage was induced using a nitrogen-cooled metal probe on the posterior wall of the atria (62). Perfusion buffer for S100B measurements was collected on ice and stored at -80°C. Hearts were formalin fixed for histology.

#### **In vitro EPs in murine intracardiac neurons**

To evaluate the effect of S100B on the electrophysiology of intracardiac neurons, cells were isolated as described previously (63). For AP measurements, extracellular solution consisted of normal Tyrode's solution, and the pipette solution contained the following: 110 mM K-gluconate, 30 mM KCl, 5 mM NaCl, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.22 mM amphotericin B, 10 mM Hepes, pH 7.2 (KOH). Trains of APs were elicited by applying long-lasting (500 ms) depolarizing current pulses of increasing amplitude. AP firing frequency was expressed as the count of the total number of APs occurring during the 500-ms lasting depolarization. AP frequency was normalized to  $t = -2$ -min values. APs were recorded at 36.5°C with the amphotericin B-perforated or ruptured patch-clamp technique, using an Axopatch 200B Clamp amplifier (Molecular Devices Corporation). Signals were low-pass filtered (cutoff frequency, 5 kHz) and digitized at 20 kHz, and potentials were corrected for liquid junction potential. To rule out the possibility of a time-dependent decrease in firing frequency contributing to the observed S100B effect, a set of time-matched controls was performed.

#### **Culture of murine intracardiac neurons**

Intracardiac neurons were isolated from six to eight mice per independent experiment ( $n = 5$ ) according to a protocol adapted from Hasan and Smith (64). Animals were euthanized with CO<sub>2</sub> before transcatheter perfusion with heparinized PBS (10 U/ml) to remove blood cells. Heart-lung packages were dissected in ice-cold 0.25% BSA (Serva) in Hanks' buffered saline (Thermo Fisher Scientific). After removal of lungs, trachea, ventricles, and atrial appendages, the remaining tissue, ganglia-containing epicardial fat pads and atrial wall, was cut mechanically followed by enzymatic digestion with

collagenase type 1 (1 mg/ml; Worthington Biochemical) and dispase 2 (5 U; Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C. Every 8 min, tissue was triturated 10 times using 10-ml pipettes. Final trituration was performed with Pasteur pipettes before the suspension was filtered through a 40- $\mu$ m cell strainer, and cells were pelleted for 5 min at 350g. After removal of the supernatant, cells were washed with Neurobasal-A medium (NB-A; Life Technologies) supplemented with 0.5 mM L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, and B27 (20  $\mu$ l/ml) (Thermo Fisher Scientific), pelleted again, and plated on Matrigel-coated  $\mu$  angiogenesis slides (Ibidi).

#### **Neuronal growth assay in murine intracardiac neurons**

For morphometrical studies on neurite growth, factors were added 2 hours after plating in NB-A supplemented with B27 (0.4  $\mu$ l/ml) in the following concentrations: S100B, 100 ng/ml; fetal calf serum, 5% (positive control), no additional factors (negative control). Cells were grown for 16 hours before fixation with 4% (v/v) formaldehyde/PBS (Thermo Fisher Scientific) for 10 min at RT. Permeabilization was performed in 0.2% Triton X-100/PBS. After blocking for 1 hour in 3% BSA/PBS, cells were incubated for 1 hour in mAb  $\alpha$   $\beta$ -III-tubulin in 1% BSA/PBS. Secondary antibody incubation was performed for 1 hour in 1% BSA/PBS. Cells were mounted in DAPI Fluoromount-G. Cells were photographed using a Leica TCS SP5 (Leica Microsystems) with a  $\times 20$  NA = 0.7 HC PL APO CS Imm/Corr oil over the full range of the signal. Five to 20 cells were analyzed per well. Only cells that were clearly distinguishable from neighboring cells bearing at least one neurite with the length of two cell diameters were analyzed. Neurite lengths were measured using Fiji's simple neurite tracer (65).

#### **Protein analyses**

Plasma samples were processed immediately and stored at -80°C for analysis. Human plasma, Langendorff perfusion fluid, and human atrial pectinate muscles were assessed using commercially available assays according to the manufacturer's instructions. Tissues were lysed using a glass tissue homogenizer in PBS with 0.2% Triton X-100 and protease inhibitors. S100B was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Merck Millipore) with a sensitivity of 2.7 pg/ml and an inter- and intra-assay variation between 1.9 and 4.8%. HsTnI concentrations were determined using a highly sensitive troponin I immunoassay (Architect i2000SR, Abbott Diagnostics). Activin A was measured using Quantikine sandwich ELISAs (R&D Systems).

#### **Statistical analysis**

All values are described in mean  $\pm$  SEM if not stated otherwise. For human studies, continuous variables were described as quartiles, whereas categorical variables were described as absolute numbers and percentages. The Wilcoxon rank sum (for continuous variables) or the  $\chi^2$  (for categorical variables) test was used for between-group comparisons. Experimental data were tested for normality using D'Agostino-Pearson omnibus test. Group comparisons for firing frequency in intracardiac neurons were performed using two-way repeated-measures ANOVA with the Holm-Sidak post hoc test. Survival curves stratified by terciles of  $\Delta$ S100B were produced using the Kaplan-Meier method. Survival curve differences were tested with the log-rank test.  $P$  values <0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.07 (GraphPad Software).

## SUPPLEMENTARY MATERIALS

stm.sciencemag.org/cgi/content/full/11/493/eaav7770/DC1

Fig. S1. S100B-expressing glial cells ensheathing nerve fibers are interspersed within the human atrial myocardium.

Fig. S2. S100B-expressing glial cells ensheathing sympathetic nerve fibers.

Fig. S3. Patient with reduced phrenic nerve activity during ablation presents a higher increase in S100B plasma concentration.

Fig. S4. Activin A increase independent of ablation type.

Table S1. Baseline characteristics of patients.

Table S2. Changes in HR variability parameters in patients after AF ablation.

Table S3. Electrophysiological measurements in human atrial pectinate muscles after exposure to S100B.

Table S4. Primary antibodies used in this study.

Table S5. Secondary antibodies used in this study.

Reference (66)

## REFERENCES AND NOTES

- C. T. January, L. S. Wann, J. S. Alpert, H. Calkins, J. E. Cigarroa, J. C. Cleveland Jr., J. B. Conti, P. T. Ellnor, M. D. Ezekowitz, M. E. Field, K. T. Murray, R. L. Sacco, W. G. Stevenson, P. J. Tchou, C. M. Tracy, C. W. Yancy; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: A report of the American college of Cardiology/American heart association task force on practice guidelines and the heart rhythm society. *J. Am. Coll. Cardiol.* **64**, e1–e76 (2014).
- H. Calkins, G. Hindricks, R. Cappato, Y.-H. Kim, E. B. Saad, L. Aguinaga, J. G. Akar, V. Badhwar, J. Brugada, J. Camm, P.-S. Chen, S.-A. Chen, M. K. Chung, J. Cosedis Nielsen, A. B. Curtis, D. W. Davies, J. D. Day, A. d'Avila, N. M. S. Natasja de Groot, L. di Biase, M. Duytschaever, J. R. Edgerton, K. A. Ellenbogen, P. T. Ellnor, S. Ernst, G. Fenelon, E. P. Gerstenfeld, D. E. Haines, M. Haisaguerre, R. H. Helm, E. Hylek, W. M. Jackman, J. Jalife, J. M. Kalman, J. Kautzner, H. Kottkamp, K. H. Kuck, K. Kumagai, R. Lee, T. Lewalter, B. D. Lindsay, L. Macle, M. Mansour, F. E. Marchlinski, G. F. Michaud, H. Nakagawa, A. Natale, S. Nattel, K. Okumura, D. Packer, E. Pokushalov, M. R. Reynolds, P. Sanders, M. Scanavacca, R. Schilling, C. Tondo, H.-M. Tso, A. Verma, D. J. Wilber, T. Yamane; Document Reviewers. 2017 HRS/EHRA/ECAS/APHS/SOLAECE expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation. *Europace* **20**, e1–e160 (2018).
- K. Shivkumar, E. Buch, N. G. Boyle. Nonpharmacologic management of atrial fibrillation: role of the pulmonary veins and posterior left atrium. *Heart Rhythm* **6**, S5–S11 (2009).
- J. F. Nonidez. Identification of the receptor areas in the venae cavae and pulmonary veins which initiate reflex cardiac acceleration (Bainbridge's reflex). *Am. J. Anat.* **61**, 203–231 (1937).
- J. A. Armour, D. A. Murphy, B.-X. Yuan, S. Macdonald, D. A. Hopkins. Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system. *Anat. Rec.* **247**, 289–298 (1997).
- C. Meyer, O. R. Rana, E. Saygili, C. Gemein, M. Becker, K. W. Nolte, J. Weis, T. Schimpf, C. Knackstedt, K. Mischke, R. Hoffmann, M. Keim, D. Pauza, P. Schauerte. Augmentation of left ventricular contractility by cardiac sympathetic neural stimulation. *Circulation* **121**, 1286–1294 (2010).
- M. J. Shen, E.-K. Choi, A. Y. Tan, S.-F. Lin, M. C. Fishbein, L. S. Chen, P.-S. Chen. Neural mechanisms of atrial arrhythmias. *Nat. Rev. Cardiol.* **9**, 30–39 (2011).
- D. G. Katritsis, E. Pokushalov, A. Romanov, E. Giazitoglou, G. C. M. Siontis, S. S. Po, A. J. Camm, J. P. A. Ioannidis. Autonomic denervation added to pulmonary vein isolation for paroxysmal atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, 2318–2325 (2013).
- Y. Hou, B. J. Scherlag, J. Lin, Y. Zhang, Z. Lu, K. Truong, E. Patterson, R. Lazzara, W. M. Jackman, S. S. Po. Ganglionated plexi modulate extrinsic cardiac autonomic nerve input: effects on sinus rate, atrioventricular conduction, refractoriness, and inducibility of atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 61–68 (2007).
- J. Mao, X. Yin, Y. Zhang, Q. Yan, J. Dong, C. Ma, X. Liu. Ablation of epicardial ganglionated plexi increases atrial vulnerability to arrhythmias in dogs. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* **7**, 711–717 (2014).
- A. H. G. Driessen, W. R. Berger, S. P. J. Krul, N. W. E. van den Berg, J. Neefs, F. R. Piersma, D. R. P. Chan Pin Yin, J. S. S. G. de Jong, W. J. P. van Boven, J. R. de Groot. Ganglion plexus ablation in advanced atrial fibrillation: The AFACT study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **68**, 1155–1165 (2016).
- M. Braun, K. Vaibhav, N. M. Saad, S. Fatima, J. R. Vender, B. Baban, M. N. Hoda, K. M. Dhandapani. White matter damage after traumatic brain injury: A role for damage associated molecular patterns. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1863**, 2614–2626 (2017).
- V. Vives, G. Alonso, A. C. Solal, D. Joubert, C. Legraverend. Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. *J. Comp. Neurol.* **457**, 404–419 (2003).
- G. Sorci, R. Bianchi, F. Riuzzi, C. Tubaro, C. Arcuri, I. Giambanco, R. Donato. S100B protein, a damage-associated molecular pattern protein in the brain and heart, and beyond. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* **2010**, 656481 (2010).
- R. Donato, B. R. Cannon, G. Sorci, F. Riuzzi, K. Hsu, D. J. Weber, C. L. Geczy. Functions of S100 proteins. *Curr. Mol. Med.* **13**, 24–57 (2013).
- K. A. Willoughby, A. Kleindienst, C. Müller, T. Chen, J. K. Muir, E. F. Ellis. S100B protein is released by in vitro trauma and reduces delayed neuronal injury. *J. Neurochem.* **91**, 1284–1291 (2004).
- O. Sbai, T. S. Devi, M. A. B. Melone, F. Feron, M. Khrestchatsky, L. P. Singh, L. Perrone. RAGE-TXNIP axis is required for S100B-promoted Schwann cell migration, fibronectin expression and cytokine secretion. *J. Cell Sci.* **123**, 4332–4339 (2010).
- A. Villarreal, R. X. Aviles Reyes, M. F. Angelo, A. G. Reines, A. J. Ramos. S100B alters neuronal survival and dendrite extension via RAGE-mediated NF- $\kappa$ B signaling. *J. Neurochem.* **117**, 321–332 (2011).
- A. Bauer, I. Deisenhofer, R. Schneider, B. Zrenner, P. Barthel, M. Karch, S. Wagenpfeil, C. Schmitt, G. Schmidt. Effects of circumferential or segmental pulmonary vein ablation for paroxysmal atrial fibrillation on cardiac autonomic function. *Heart Rhythm* **3**, 1428–1435 (2006).
- M. Finszsch, S. Schreiner, T. Kichko, P. Reeh, E. R. Tamm, M. R. Bosl, D. Meijer, M. Wegner. Sox10 is required for Schwann cell identity and progression beyond the immature Schwann cell stage. *J. Cell Biol.* **189**, 701–712 (2010).
- A. Li, K. Kuga, A. Suzuki, M. Endo, B. Niho, M. Enomoto, M. Kanemoto, I. Yamaguchi. Effects of linear ablation at the isthmus between the tricuspid annulus and inferior vena cava for atrial flutter on autonomic nervous activity - Analysis of heart rate variability. *Circ. J.* **66**, 53–57 (2002).
- E. M. Antman, M. J. Tanasijevic, B. Thompson, M. Schactman, C. H. McCabe, C. P. Cannon, G. A. Fischer, A. Y. Fung, C. Thompson, D. Wybenga, E. Braunwald. Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* **335**, 1342–1349 (1996).
- Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology. Guidelines, heart rate variability, standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur. Heart J.* **17**, 354–381 (1996).
- S. K. Agarwal, F. L. Norby, E. A. Whitsel, E. Z. Soliman, L. Y. Chen, L. R. Loehr, V. Fuster, G. Heiss, J. Coresh, A. Alonso. Cardiac autonomic dysfunction and incidence of atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **69**, 291–299 (2017).
- V. Petraitiene, D. H. Pauza, R. Benetos. Distribution of adrenergic and cholinergic nerve fibres within intrinsic nerves at the level of the human heart hilum. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **45**, 1097–1105 (2014).
- A. Y. Tan, P.-S. Chen, L. S. Chen, M. C. Fishbein. Autonomic nerves in pulmonary veins. *Heart Rhythm* **4**, S57–S60 (2007).
- J. G. Andrade, P. Khairy, M. Dubuc. Catheter cryoablation: Biology and clinical uses. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* **6**, 218–227 (2013).
- C. A. Goncalves, M. C. Leite, M. C. Guerra. Adipocytes as an important source of serum S100B and possible roles of this protein in adipose tissue. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* **2010**, 790431 (2010).
- N. Venticlef, V. Guglielmi, E. Balse, B. Gaborit, A. Cotillard, F. Atassi, J. Amour, P. Leprince, A. Dutour, K. Clément, S. N. Hatem. Human epicardial adipose tissue induces fibrosis of the atrial myocardium through the secretion of adipo-fibrokinases. *Eur. Heart J.* **36**, 795–805a (2015).
- H. Kubista, R. Donato, A. Hermann. S100 calcium binding protein affects neuronal electrical discharge activity by modulation of potassium currents. *Neuroscience* **90**, 493–508 (1999).
- M. J. P. Raatikainen, D. O. Armar, B. Merkely, J. C. Nielsen, G. Hindricks, H. Heidbuechel, J. Camm. A decade of information on the use of cardiac implantable electronic devices and interventional electrophysiological procedures in the european society of cardiology countries: 2017 report from the european heart rhythm association. *Europace* **19**, ii1–ii90 (2017).
- S. M. Hosseini, G. Rozen, A. Saleh, J. Vaid, Y. Biton, K. Moazzami, E. K. Heist, M. C. Mansour, M. I. Kaadan, M. Vangel, J. N. Ruskin. Catheter ablation for cardiac arrhythmias: Utilization and in-hospital complications, 2000 to 2013. *JACC Clin. Electrophysiol.* **3**, 1240–1248 (2017).
- B. W. Moore. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **19**, 739–744 (1965).
- D. Kligman, D. R. Marshak. Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 7136–7139 (1985).
- J. Undén, T. Ingebrigtsen, B. Romner; Scandinavian Neurotrauma Committee, Scandinavian guidelines for initial management of minimal, mild and moderate head injuries in adults: An evidence and consensus-based update. *BMC Med.* **11**, 50 (2013).
- Z. Liu, Y.-Q. Jin, L. Chen, Y. Wang, X. Yang, J. Cheng, W. Wu, Z. Qi, Z. Shen. Specific marker expression and cell state of schwann cells during culture in vitro. *PLOS ONE* **10**, e0123278 (2015).
- M. Sramko, P. Peichl, D. Wichterle, J. Tintera, R. Maxian, J. Weichet, L. Knesplová, J. Franeková, S. Pánsisínová, J. Kautzner. A novel biomarker-based approach for the

- detection of asymptomatic brain injury during catheter ablation of atrial fibrillation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **25**, 349–354 (2014).
38. A. Verma, P. Debruyne, S. Nardi, T. Deneke, Y. DeGreef, S. Spitzer, J. O. Balzer, L. Boersma; ERACE Investigators. Evaluation and reduction of asymptomatic cerebral embolism in ablation of atrial fibrillation, but high prevalence of chronic silent infarction: Results of the evaluation of reduction of asymptomatic cerebral embolism trial. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* **6**, 835–842 (2013).
  39. T. Deneke, D.-I. Shin, O. Balta, K. Bünz, F. Fassbender, A. Mügge, H. Anders, M. Horlitz, M. Päsler, S. Karthikapallil, T. Arentz, D. Beyer, M. Bansmann. Postablation asymptomatic cerebral lesions: Long-term follow-up using magnetic resonance imaging. *Heart Rhythm* **8**, 1705–1711 (2011).
  40. H. Jönsson, P. Jönsson, C. Alling, S. Westaby, S. Blomquist. Significance of serum S100 release after coronary artery bypass grafting. *Ann. Thorac. Surg.* **65**, 1639–1644 (1998).
  41. X. Navarro, M. Vivó, A. Valero-Cabré. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog. Neurobiol.* **82**, 163–201 (2007).
  42. T. M. O'Shea, J. E. Burda, M. V. Sofroniew. Cell biology of spinal cord injury and repair. *J. Clin. Invest.* **127**, 3259–3270 (2017).
  43. N. Sahoo, J. Tröger, S. H. Heinemann, R. Schönherr. Current inhibition of human EAG1 potassium channels by the Ca<sup>2+</sup> binding protein S100B. *FEBS Lett.* **584**, 3896–3900 (2010).
  44. P. Morquette, D. Verdier, A. Kadala, J. Féthière, A. G. Philippe, R. Robitaille, A. Kolta, An astrocyte-dependent mechanism for neuronal rhythmogenesis. *Nat. Neurosci.* **18**, 844–854 (2015).
  45. J. Enes, N. Langwieser, J. Ruschel, M. M. Carballosa-Gonzalez, A. Klug, M. H. Traut, B. Ylera, S. Tahirovic, F. Hofmann, V. Stein, S. Moosmang, I. D. Hentall, F. Bradke. Electrical activity suppresses axon growth through Cav1.2 channels in adult primary sensory neurons. *Curr. Biol.* **20**, 1154–1164 (2010).
  46. S. Kangavari, Y.-S. Oh, S. Zhou, H.-J. Youn, M.-Y. Lee, W.-S. Jung, T. Rho, S.-J. Hong, S. Kar, W. F. Kerwin, C. D. Swerdlow, E. S. Gang, D. M. Gallik, J. S. Goodman, Y. D. Chen, P. S. Chen. Radiofrequency catheter ablation and nerve growth factor concentration in humans. *Heart Rhythm* **3**, 1150–1155 (2006).
  47. C. Jungen, K. Scherschel, C. Eickholt, P. Kuklik, N. Klatt, N. Bork, T. Salzbrunn, F. Alken, S. Angendohr, C. Klene, J. Mester, N. Klockner, M. W. Veldkamp, U. Schumacher, S. Willems, V. O. Nikolaeov, C. Meyer. Disruption of cardiac cholinergic neurons enhances susceptibility to ventricular arrhythmias. *Nat. Commun.* **8**, 14155 (2017).
  48. R. Lemery, S. Ben-Haim, G. Wells, T. D. Ruddy. I-123-Metaiodobenzylguanidine imaging in patients with atrial fibrillation undergoing cardiac mapping and ablation of autonomic ganglia. *Heart Rhythm* **14**, 128–132 (2017).
  49. T. Kuratobi, Y. Shimada, N. Kino, K. Ito, D. Tonomura, K. Yano, C. Tanaka, M. Yoshida, T. Tsuchida, H. Fukumoto. Features of intrinsic ganglionated plexi in both atria after extensive pulmonary isolation and their clinical significance after catheter ablation in patients with atrial fibrillation. *Heart Rhythm* **12**, 470–476 (2015).
  50. E. W. Rivarola, D. Hachul, T. Wu, C. Pisani, C. Hardy, F. Raimundi, S. Melo, F. Darrieux, M. Scanavacca. Targets and end points in cardiac autonomic denervation procedures. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* **10**, e004638 (2017).
  51. M. J. Shen, A. C. Coffey, S. Straka, D. E. Adams, D. B. Wagner, R. J. Kovacs, M. Clark, C. Shen, L. S. Chen, T. H. Everett IV, S.-F. Lin, P.-S. Chen. Simultaneous recordings of intrinsic cardiac nerve activity and skin sympathetic nerve activity from human patients during the postoperative period. *Heart Rhythm* **14**, 1587–1593 (2017).
  52. O. Dörr, S. Ewen, C. Liebetrau, H. Möllmann, L. Gaede, D. Linz, M. Hohl, C. Troldi, T. Bauer, M. Böhm, C. Hamm, F. Mahfoud, H. Nef. Neuropeptide Y as an indicator of successful alterations in sympathetic nervous activity after renal sympathetic denervation. *Clin. Res. Cardiol.* **104**, 1064–1071 (2015).
  53. J. M. Cao, L. S. Chen, B. H. KenKnight, T. Ohara, M. H. Lee, J. Tsai, W. W. Lai, H. S. Karagueuzian, P. L. Wolf, M. C. Fishbein, P. S. Chen. Nerve sprouting and sudden cardiac death. *Circ. Res.* **86**, 816–821 (2000).
  54. J. N. Tsoporis, S. Izhar, H. Leong-Poi, J. F. Desjardins, H. J. Huttunen, T. G. Parker. S100B interaction with the receptor for advanced glycation end products (RAGE): A novel receptor-mediated mechanism for myocyte apoptosis postinfarction. *Circ. Res.* **106**, 93–101 (2010).
  55. R. O. Akbulak, B. Schaffer, M. Jularic, J. Moser, D. Schreiber, T. Salzbrunn, C. Meyer, C. Eickholt, P. Kuklik, B. A. Hoffmann, S. Willems. Reduction of radiation exposure in atrial fibrillation ablation using a new image integration module: A prospective randomized trial in patients undergoing pulmonary vein isolation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **26**, 747–753 (2015).
  56. C. Eickholt, C. Jungen, T. Drexel, F. Alken, P. Kuklik, J. Muehlsteff, H. Makimoto, B. Hoffmann, M. Kelm, D. Ziegler, N. Klockner, S. Willems, C. Meyer. Sympathetic and parasympathetic coactivation induces perturbed heart rate dynamics in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Med. Sci. Monit.* **24**, 2164–2172 (2017).
  57. M. P. Tarvainen, J.-P. Niskanen, J. A. Lipponen, P. O. Ranta-Aho, P. A. Karjalainen. *IFMBE Proceedings* (Springer, Berlin, Heidelberg, 2008), vol. 22, pp. 1022–1025.
  58. D. H. Pauza, V. Skripka, N. Pauziene, R. Stropus. Morphology, distribution, and variability of the epicardial neural ganglionated subplexuses in the human heart. *Anat. Rec.* **259**, 353–382 (2000).
  59. S. Hinrichs, K. Scherschel, S. Krüger, J. T. Neumann, M. Schwarzl, I. Yan, S. Warnke, F. M. Ojeda, T. Zeller, M. Karakas, T. Keller, C. Meyer, S. Blankenberg, D. Westermann, D. Lindner. Precursor proadrenomedullin influences cardiomyocyte survival and local inflammation related to myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, E8727–E8736 (2018).
  60. C. Scotto, Y. Mely, H. Ohshima, J. Garin, C. Cochet, E. Chambaz, J. Baudier. Cysteine oxidation in the mitogenic S100B protein leads to changes in phosphorylation by catalytic CKII- $\alpha$  subunit. *J. Biol. Chem.* **273**, 3901–3908 (1998).
  61. A. Horváth, M. D. Lemoine, A. Löser, I. Mannhardt, F. Flenner, A. U. Uzun, C. Neuber, K. Breckwoldt, A. Hansen, E. Girdauskas, H. Reichenspurner, S. Willems, N. Jost, E. Wettwer, T. Eschenhagen, T. Christ. Low resting membrane potential and low inward rectifier potassium currents are not inherent features of hiPSC-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Rep.* **10**, 822–833 (2018).
  62. F. Weinberger, K. Breckwoldt, S. Pecha, A. Kelly, B. Geertz, J. Starbatty, T. Yorgan, K. Cheng, K. Lessmann, T. Stolen, M. Scherrer-crosbie, G. Smith, H. Reichenspurner, A. Hansen, T. Eschenhagen. Cardiac repair in guinea pigs with human engineered heart tissue from induced pluripotent stem cells. *Sci. Transl. Med.* **148**, 1–13 (2016).
  63. A. O. Verkerk, C. A. Remme, C. A. Schumacher, B. P. Scicluna, R. Wolswinkel, B. de Jonge, C. R. Bezzina, M. W. Veldkamp. Functional NaV1.8 channels in intracardiac neurons: The link between SCN10A and cardiac electrophysiology. *Circ. Res.* **111**, 333–343 (2012).
  64. W. Hasan, P. G. Smith. Decreased adrenoceptor stimulation in heart failure rats reduces NGF expression by cardiac parasympathetic neurons. *Auton. Neurosci.* **181**, 13–20 (2014).
  65. M. H. Longair, D. A. Baker, J. D. Armstrong. Simple Neurite Tracer: Open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinformatics* **27**, 2453–2454 (2011).
  66. J. Sosna, S. Voigt, S. Mathieu, D. Kabelitz, A. Trad, O. Janssen, C. Meyer-Schwesinger, S. Schütze, D. Adam. The proteases HtrA2/Omi and UCH-L1 regulate TNF-induced necroptosis. *Cell Commun. Signal.* **11**, 76 (2013).

**Acknowledgments:** We thank C. Meyer-Schwesinger for providing the PGP 9.5 antibody; J. P. Sperhake for providing the photograph of a human heart; the UKE Microscopy Imaging Facility (UmiF), University Hospital Centre Hamburg-Eppendorf for providing microscopes and support; H. Wieboldt for excellent technical support; S. Krasemann and K. Hartmann (UKE-HEXT Mouse Pathology Facility, Hamburg, Germany) for chromogenic immunohistochemistry; S. Dünker and S. Gerth for troponin measurements; and the team of the electrophysiology laboratory for their help in sample collection. **Funding:** This work is supported by the German Centre for Cardiovascular Research (DZHK) (FKZ 81Z4710141 to S.W. and C.M. and 81X2710149 to C.M. and K. Scherschel) and the National Institutes of Health (NIH) (OT2O023848 to K. Shivkumar). **Author contributions:** K. Scherschel designed and performed experiments (histology, ELISA, and cell culture) and wrote the manuscript. K.H. acquired data and wrote the manuscript. C.J. performed Langendorff experiments, M.D.L. and T.C. performed AP measurements in human atrial tissue, and N.R. performed statistical analyses. M.W.V. and S.C. performed AP measurements in intracardiac neurons. N. Klatt, C.E., and S.W. performed clinical procedures and critically discussed the manuscript. D.L., D.W., P.K., N. Klockner, K. Shivkumar, T.C., and S.W. provided conceptual advice and critically discussed the results and the manuscript. T.Z. performed hsTnI measurements and provided conceptual advice. C.M. designed and supervised the study, performed clinical procedures, and wrote the manuscript. All authors critically discussed the results and reviewed and approved the manuscript before submission. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data associated with this study are present in the paper or the Supplementary Materials.

Submitted 18 October 2018  
Accepted 12 April 2019  
Published 22 May 2019  
10.1126/scitranslmed.aav7770

**Citation:** K. Scherschel, K. Hedenus, C. Jungen, M. D. Lemoine, N. Rübbsamen, M. W. Veldkamp, N. Klatt, D. Lindner, D. Westermann, S. Casini, P. Kuklik, C. Eickholt, N. Klockner, K. Shivkumar, T. Christ, T. Zeller, S. Willems, C. Meyer. Cardiac glial cells release neurotrophic S100B upon catheter-based treatment of atrial fibrillation. *Sci. Transl. Med.* **11**, eaav7770 (2019).

## Cardiac glial cells release neurotrophic S100B upon catheter-based treatment of atrial fibrillation

Katharina Scherschel, Katja Hedenus, Christiane Jungen, Marc D. Lemoine, Nicole Rübsamen, Marieke W. Veldkamp, Niklas Klatt, Diana Lindner, Dirk Westermann, Simona Casini, Pawel Kuklik, Christian Eickholt, Nikolaj Klöcker, Kalyanam Shivkumar, Torsten Christ, Tanja Zeller, Stephan Willems and Christian Meyer

*Sci Transl Med* 11, eaav7770.  
DOI: 10.1126/scitranslmed.aav7770

### Treating the nervous ticker

Catheter ablation induces tissue damage in specific regions of the heart in patients with atrial fibrillation (rapid irregular heartbeat) to correct abnormal electrical signals. Although effective, the underlying mechanism remains incompletely understood. Scherschel *et al.* demonstrated that cryothermal ablation induced release of S100B, a marker of neuronal injury, from glial cells within mouse hearts. S100B stimulated nerve growth and reduced neuronal electrical activity. In patients receiving ablations, higher serum concentration of S100B after the procedure was associated with lower recurrence of atrial fibrillation. Further study is warranted to understand how ablation-induced injury to the intrinsic cardiac autonomic nervous system contributes to patient outcomes.

ARTICLE TOOLS	<a href="http://stm.sciencemag.org/content/11/493/eaav7770">http://stm.sciencemag.org/content/11/493/eaav7770</a>
SUPPLEMENTARY MATERIALS	<a href="http://stm.sciencemag.org/content/suppl/2019/05/20/11.493.eaav7770.DC1">http://stm.sciencemag.org/content/suppl/2019/05/20/11.493.eaav7770.DC1</a>
RELATED CONTENT	<a href="http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/11/481/eaau6447.full">http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/11/481/eaau6447.full</a> <a href="http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/8/363/363ra148.full">http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/8/363/363ra148.full</a> <a href="http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/7/311/311ra172.full">http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/7/311/311ra172.full</a> <a href="http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/10/435/eaah5457.full">http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/10/435/eaah5457.full</a>
REFERENCES	This article cites 65 articles, 19 of which you can access for free <a href="http://stm.sciencemag.org/content/11/493/eaav7770#BIBL">http://stm.sciencemag.org/content/11/493/eaav7770#BIBL</a>
PERMISSIONS	<a href="http://www.sciencemag.org/help/reprints-and-permissions">http://www.sciencemag.org/help/reprints-and-permissions</a>

Use of this article is subject to the [Terms of Service](#)

---

*Science Translational Medicine* (ISSN 1946-6242) is published by the American Association for the Advancement of Science, 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. 2017 © The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works. The title *Science Translational Medicine* is a registered trademark of AAAS.

Supplementary Materials for

**Cardiac glial cells release neurotrophic S100B upon catheter-based treatment of atrial fibrillation**

Katharina Scherschel, Katja Hedenus, Christiane Jungen, Marc D. Lemoine, Nicole Rübsamen, Marieke W. Veldkamp, Niklas Klatt, Diana Lindner, Dirk Westermann, Simona Casini, Pawel Kuklik, Christian Eickholt, Nikolaj Klöcker, Kalyanam Shivkumar, Torsten Christ, Tanja Zeller, Stephan Willems, Christian Meyer\*

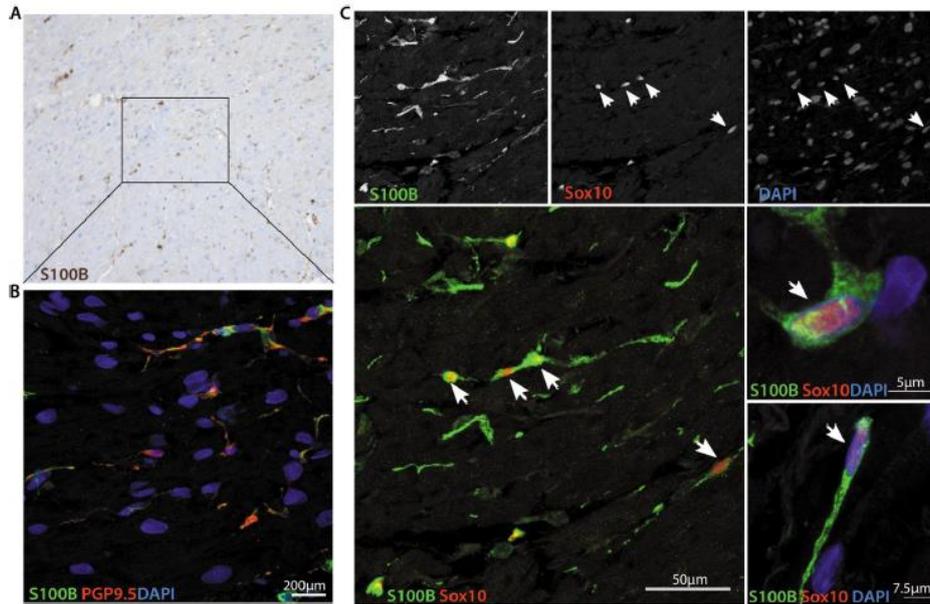
\*Corresponding author. Email: c.mey@web.de

Published 22 May 2019, *Sci. Transl. Med.* 11, eaav7770 (2019)  
DOI: 10.1126/scitranslmed.aav7770

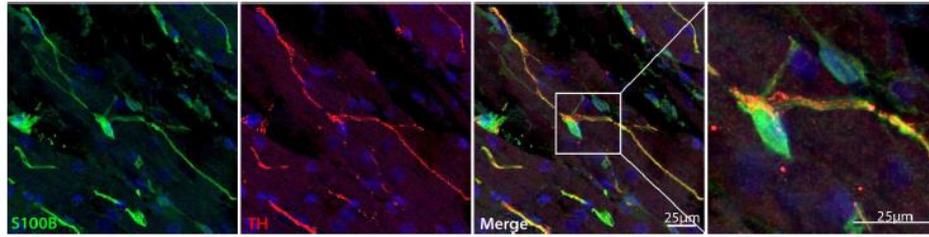
**This PDF file includes:**

- Fig. S1. S100B-expressing glial cells ensheathing nerve fibers are interspersed within the human atrial myocardium.
  - Fig. S2. S100B-expressing glial cells ensheathing sympathetic nerve fibers.
  - Fig. S3. Patient with reduced phrenic nerve activity during ablation presents a higher increase in S100B plasma concentration.
  - Fig. S4. Activin A increase independent of ablation type.
  - Table S1. Baseline characteristics of patients.
  - Table S2. Changes in HR variability parameters in patients after AF ablation.
  - Table S3. Electrophysiological measurements in human atrial pectinate muscles after exposure to S100B.
  - Table S4. Primary antibodies used in this study.
  - Table S5. Secondary antibodies used in this study.
  - Reference (66)
-

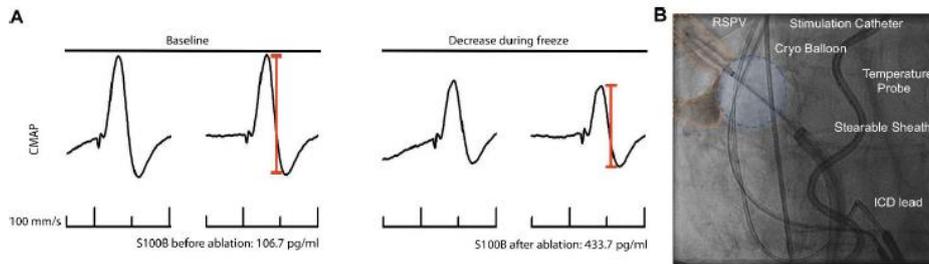
Supplemental Figures



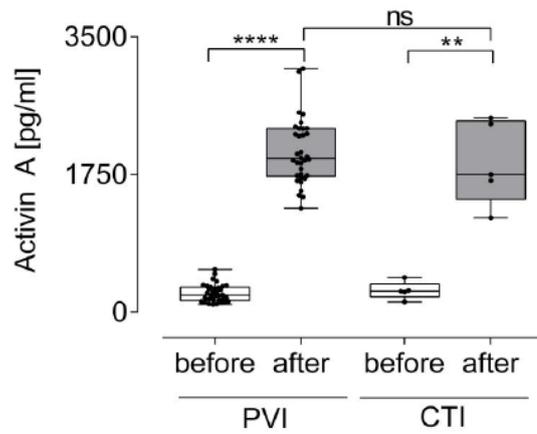
**Fig. S1. S100B-expressing glial cells ensheathing nerve fibers are interspersed within the human atrial myocardium.** (A) Chromogenic staining of S100B in the human atrial myocardium (brown) showing the magnitude of glial cells between cardiomyocytes. Boxed region shows localization of higher magnification in (B). (B) A co-staining of S100B (green) with the neural marker PGP9.5 (red). (C) The nuclei of S100B<sup>+</sup> glial cells (green) expressing Sox10 (red), a nuclear marker for glial cells at all developmental stages. Selected Sox10<sup>+</sup> nuclei are marked with white arrows. Exemplary magnifications show single cells co-expressing both markers. Data are representative of at least 3 independent experiments, from  $n = 3$  (Sox10) to 10 (S100B) samples of human atrial myocardium.



**Fig. S2. S100B-expressing glial cells ensheathing sympathetic nerve fibers.** Joint expression of S100B (green) and the sympathetic marker tyrosine hydroxylase (TH, red) in the human atrial myocardium (representative images for  $n = 3$  samples). The boxed region is shown at higher magnification (right).



**Fig. S3. Patient with reduced phrenic nerve activity during ablation presents a higher increase in S100B plasma concentration. (A)** Recordings of compound motor action potential (CMAP) at baseline and during cryoablation (freeze). CMAP is used for monitoring phrenic nerve activity to prevent injury during ablation. Change in CMAP amplitude is indicated by red calipers. **(B)** Fluoroscopic image of this patient showing the cryoballoon located in the right superior pulmonary vein (RSPV). This patient was excluded from further analyses. ICD, implantable cardioverter defibrillator.



**Fig. S4. Activin A increase independent of ablation type.** Plasma concentrations of the epicardial fat tissue marker activin A before and after AF ablation (PVI;  $n = 34$ ;  $P < 0.0001$ ; compared using paired t-test) versus the control group (ablation of the cavotricuspid isthmus, CTI;  $n = 5$ ;  $P = 0.0014$ ; compared using paired t-test). No differences are detectable between the groups (compared using unpaired t-test;  $P < 0.05$  was considered statistically significant).

**Table S1. Baseline characteristics of patients.** Data are expressed as absolute numbers and percentages (categorical variables) or quartiles (continuous variables). EPS, electrophysiological study group; CTI, cavotricuspid isthmus group; PVI, pulmonary vein isolation group; BMI, body mass index; AF, atrial fibrillation; the CHA2DS2-VASc score is an estimation for the stroke risk in patients with atrial fibrillation ranging from 0 to 9; EHRA score is a quantification of AF-related symptoms ranging from 1-4, N/A, not applicable; CKD, chronic kidney disease (glomerular filtration rate < 60 ml/min); ICD, implantable cardioverter defibrillator; TIA, transient ischemic attack; ACE, angiotensin converting enzyme; AT, angiotensin; DOAC, direct oral anticoagulant. \* 1 patient from this group is excluded due to a diagnosis of AF. \*\* 1 patient from this group is excluded due to reduction in CMAP amplitude (see fig. S3).

	EPS (n = 19)	CTI (n = 20*)	PVI (n = 112**)	P value
<b>Characteristics</b>				
Male sex no. (%)	11 (57.9)	17 (85.0)	66 (58.9)	0.079
Age (years)	50.0 (21.3, 59.8)	69.5 (60.2, 79.6)	65.0 (58.0, 71.0)	<0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.1 (22.2, 30.3)	25.8 (24.0, 29.0)	26.9 (24.6, 29.9)	0.17
Paroxysmal AF no. (%)	0 (0)	0 (0)	71 (63.4)	<0.001
CHA2DS2-VASc score	2.0 (2.0, 2.0)	2.5 (0.9, 4.1)	2.0 (1.0, 3.0)	0.79
EHRA score	N/A	N/A	2.0 (2.0, 3.0)	N/A
<b>Comorbidities no. (%)</b>				
Hypertension	10 (52.6)	10 (50.0)	71 (63.4)	0.41
Coronary artery disease	3 (15.8)	6 (30.0)	17 (15.2)	0.27
Myocardial infarction	2 (10.5)	5 (25.0)	13 (11.6)	0.41
Diabetes	1 (5.3)	4 (20.0)	5 (4.5)	0.035
CKD	1 (5.3)	6 (30.0)	17 (15.2)	0.099
<b>Medical history no. (%)</b>				
Previous stroke / TIA	1 (5.3)	2 (10.0)	11 (9.8)	0.81
Previous cancer diagnosis	1 (5.3)	6 (30.0)	11 (9.8)	0.024
ICD / pacemaker	2 (10.5)	3 (15.0)	7 (6.2)	0.37
<b>Medical treatment no. (%)</b>				
Beta-receptor blockers	13 (68.4)	12 (60.0)	83 (74.1)	0.41
Class I, III antiarrhythmic drugs	1 (5.3)	2 (10.0)	42 (37.5)	0.002
Calcium channel blockers	2 (10.5)	4 (20.0)	16 (14.3)	0.69
Diuretics	3 (15.8)	7 (35.0)	21 (18.8)	0.22
ACE blockers	5 (26.3)	9 (45.0)	24 (21.4)	0.081
AT1 receptor antagonists	5 (26.3)	3 (15.0)	21 (18.8)	0.65
Acetylsalicylic acid	5 (26.3)	4 (20.0)	5 (4.5)	0.002
Vitamin K antagonists	1 (5.3)	5 (25.0)	24 (21.4)	0.22
DOAC	1 (5.3)	12 (60.0)	75 (67.0)	<0.001

**Table S2. Changes in HR variability parameters in patients after AF ablation.** Data are expressed as mean±SD. Patients were investigated before and after AF ablation ( $n = 11$ ). SDNN, standard deviation of normal-to-normal RR intervals; RMSSD, root mean square of successive differences in normal-to-normal RR intervals; LF, low frequency; HF, high frequency; SD1, short-term RRI variability; rec, recurrence rate; DFA, detrended fluctuation analysis.

Parameter	AF ablation		P value
	before	after	
<b>Time-domain</b>			
SDNN [ms]	32.2±10.1	13.3±9.8	0.0020
RMSSD [ms]	19.4±8.8	8.8±8.3	0.0049
<b>Frequency-domain</b>			
<b>[AR]</b>			
LF [ms <sup>2</sup> ]	257.8±166.7	74.8±187.5	0.0322
HF [ms <sup>2</sup> ]	172.4±157.1	123.6±348.3	0.0537
LF/ HF	2.8±2.4	1.1±0.7	0.0426
<b>Non-linear</b>			
SD <sub>1</sub> [ms]	13.7±6.3	6.2±5.9	0.0049
Rec [%]	32.3±8.4	37.5±10.8	0.1869
DFA1	1.2±0.3	1.0±0.3	0.0667

**Table S3. Electrophysiological measurements in human atrial pectinate muscles after exposure to S100B.** Data are expressed in mean±SEM. RMP, resting membrane potential; APA, action potential amplitude; Vmax, maximum rate of rise of phase 0 depolarization; APD, action potential duration at 20, 50 and 90% of repolarization, respectively.

	Basal	100 ng/ml S100B	P value
RMP [mV]	-65.0±4.2	-64.7±4.3	0.590
APA [mV]	87.5±7.3	87.0±7.5	0.590
Vmax [V/s]	171.7±16.4	209.1±55.3	0.439
APD20 [ms]	8.0±2.4	6.9±2.2	0.257
APD50 [ms]	161.7±3.5	163.8±4.6	0.467
APD90 [ms]	317.8±7.8	319.2±8.6	0.634

**Table S4. Primary antibodies used in this study.** \*A kind gift from C. Meyer-Schwesinger

Antigen	Species	Company	Order number	Dilution
Tyrosine hydroxylase	Rabbit	Merck-Millipore	ab152	1:1000
S100B	Rabbit	Merck-Millipore	abn59	1:4000
Tyrosine hydroxylase	Chicken	Abcam	ab76442	1:500
Choline acetyltransferase	Goat	Merck-Millipore	ab144P	1:500
SOX10	Mouse	Dianova	BSH7659	1:100
TUBB3	Mouse	Dianova	T-1315	1:200
RAGE	Goat	R&D Systems	AF1145	1:100
PGP9.5	Rat	Sosna <i>et al.</i> , Cell Communication and Signaling (66) *	-	1:100

**Table S5. Secondary antibodies used in this study.** All secondary antibodies were used in a dilution of 1:500.

<b>Antigen</b>	<b>Species</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Company</b>	<b>Order number</b>
Rabbit IgG	Donkey	488	Life technologies	A21206
Mouse IgG1	Goat	568	Life technologies	A21124
Mouse IgG	Donkey	568	Life technologies	A10037
Chicken IgY	Donkey	647	Merck-Millipore	AP194SA6
Goat IgG	Donkey	568	Life technologies	A11057
Goat IgG	Donkey	647	Life technologies	A21447

## **2. Einleitung**

### **2.1. Pulmonalvenenisolation als Therapiestrategie bei Vorhofflimmern**

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste supraventrikuläre Herzrhythmusstörung (Heeringa J et al. 2006, Schnabel RB et al. 2015) mit einer Prävalenz von etwa 3% bei Erwachsenen (Björck S et al. 2013, Haim M et al. 2015) und ist durch eine unregelmäßige Erregung und Kontraktion der Vorhöfe charakterisiert. Trotz moderner Therapiestrategien in Form von Antikoagulation, Frequenz- und Rhythmuskontrolle (Willems S, Meyer C et al. 2019) haben Patienten mit VHF noch immer häufig ein erhöhtes Risiko für Schlaganfälle, Herzinsuffizienz und den plötzlichen Herztod (Marijon E et al. 2013). In der Mehrheit der betroffenen Patienten sind links-atriale Muskelfasern, die bis in die Pulmonalvenen (PV) hineinreichen, der Ursprungsort von vorzeitig einfallenden atrialen Erregungsimpulsen. Die in den PV entstehenden spontanen elektrischen Impulse sind verantwortlich für die Auslösung von VHF-Episoden (Haïssaguerre M et al. 1998). Die Katheter-basierte Ablation dieses arrhythmogenen myokardialen Substrates stellt daher ein wichtiges Ablationsziel zur Behandlung des VHF dar. Die Pulmonalvenenisolation (PVI), welche die elektrische Isolation der PV als Ziel hat, repräsentiert somit eine effektive Therapieoption zur Behandlung des VHF (Calkins H et al. 2017). Bei der weit antralen zirkumferenziellen PVI mittels Hochfrequenzstrom oder Kryotechnik werden begrenzte thermische Läsionen erzeugt, um die elektrische Überleitung aus dem Myokard der PV in den linken Vorhof zu blockieren. Bei der PVI mittels Hochfrequenzstrom erfolgt nach Platzierung eines Spiralkatheters zur Beurteilung der intrakardialen PV-Signale die Anlage linearer, transmuraler Läsionen um die jeweiligen ipsilateralen PV. Mit Hilfe einer dreidimensionalen Rekonstruktion des linken Vorhofs und der Pulmonalvenenostien durch ein elektroanatomisches Mappingsystem kann die röntgenologische Strahlendosis reduziert werden (Akbulak RÖ et al. 2015). Die PVI mittels Kryotechnik stellt einen alternativen therapeutischen Ansatz dar, bei dem die Ablation mittels Kälteapplikation durchgeführt wird. Bei diesem „single-shot“ Verfahren handelt sich um eine Methode, bei der durch eine einmalige Kälteanwendung ein zirkuläres Ablationsareal um das Ostium der PV erzeugt wird (Chun KR et al. 2009). Die Kryoballon geführte Ablation zeigte sich gegenüber der Ablation mit Hochfrequenzstrom in der Effektivität zur Behandlung des VHF in einer großen multizentrischen, randomisierten Studie als nicht unterlegen (Kuck KH et al. 2016).

### **2.2. Das autonome intrakardiale Nervensystem**

Das autonome intrakardiale Nervensystem (AINS) bzw. Ganglien spielen als möglicher Trigger atrialer ektopischer Schläge eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese des VHF (Shen MJ et al. 2011, Stavrakis S et al. 2015). Bei Ganglien handelt es sich um eine Ansammlung von Nervenzellkörpern im peripheren Nervensystem (PNS) mit der Funktion der Verarbeitung und Weiterleitung von Signalen. Die gezielte Ablation von Ganglien im Rahmen einer PVI hat

eine Modulation bzw. Denervation des AINS zur Folge (Zhang Y et al. 2012). Einige Studien sehen in der gezielten Modulation des AINS durch das Beenden von komplexen fraktionierten atrialen Elektrogrammen, die Trigger von VHF darstellen (Choi EK et al. 2010), einen wesentlichen Beitrag zur Effektivität der PVI mit dem Ergebnis einer geringeren Rezidivrate (Katraxis DG et al. 2013). Dabei handelt es sich um Elektrogramme mit hoch fraktionierten Potentialen oder mit einer sehr kurzen Zykluslänge (<120 ms) (Calkins H et al. 2017). Diese komplexen Elektrogramme sind charakteristisch für Areale mit einer verlangsamten Erregungsfortleitung, Eingangsbereiche für Reentry-Kreise oder Kollisionsbereiche unterschiedlicher Erregungsfronten. Die anatomischen Bereiche der *ganglionären Plexi* (GP) weisen dabei eine wesentlich höhere fraktionierte Aktivität auf (Katraxis D et al. 2009, Katraxis D et al. 2011) und bilden neben den Triggern aus den PV ein weiteres elektrophysiologisches Substrat für VHF.

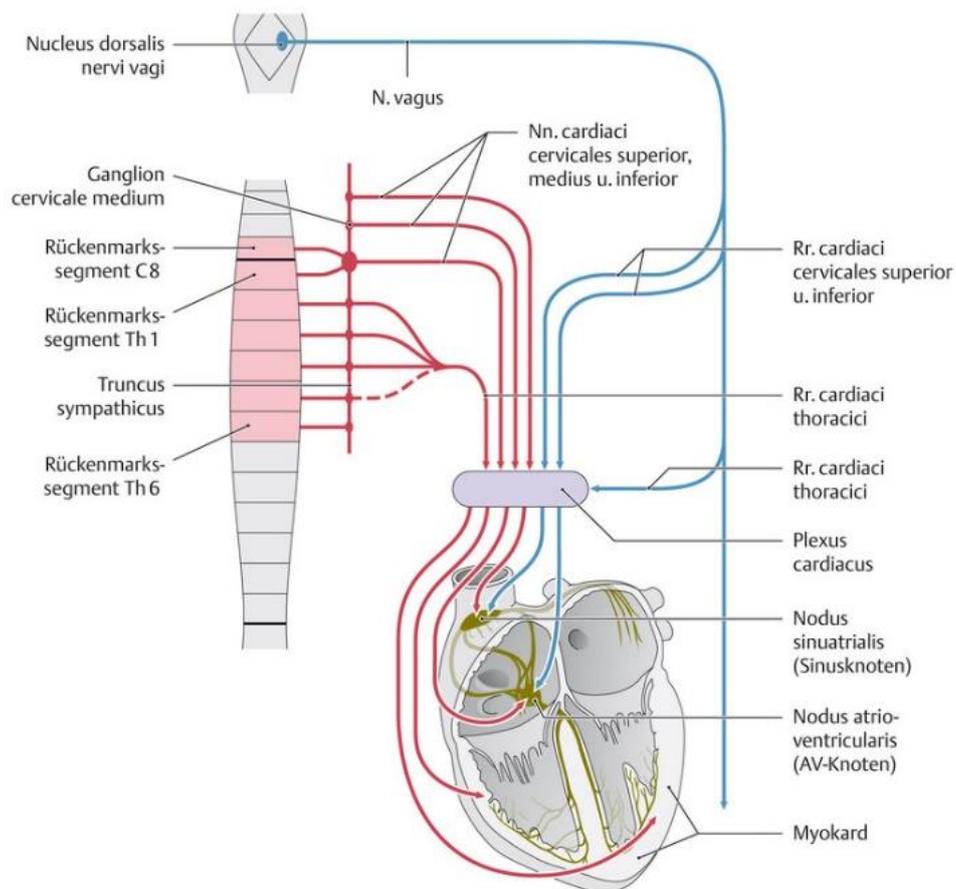
Andere Studien haben gezeigt, dass eine gezielte Denervation des AINS bei PVI keinen zusätzlichen Effekt hat, sondern sogar die Vulnerabilität für Arrhythmien durch eine Abnahme der effektiven Refraktärzeit und durch eine zu große Reinnervation der sympathisch-parasympathischen Nervenfasern erhöhen kann (Mao J et al. 2014). Der mangelnde Nutzen der Ablation von GP bei Patienten mit fortgeschrittenem VHF kann durch eine abnehmende Rolle des AINS bei der Pathogenese des VHF aufgrund des stärkeren Einflusses von atrialen remodelling und Fibrose erklärt werden (Stavrakis S et al. 2015). Die chirurgische Ablation von GP zeigte keinen nachweisbaren Effekt auf die Rezidivrate und hatte eine höhere Komplikationsrate (größere Blutungen, Störungen der Sinusknotenfunktion und die Implantation eines Herzschrittmachers) (Driessen AHG et al. 2016).

Das AINS ist an einer Vielzahl von kardialen Funktionen wie z.B. der Herzfrequenz (HR), atrialer und ventrikulärer Refraktärzeit, Erregungsleitung und Kontraktilität beteiligt (Tsuboi M et al. 2000, Meyer C et al. 2010). Sympathikus und Parasympathikus vermitteln dabei als Gegenspieler des autonomen Nervensystems über ihre Transmitter am Herzen antagonistische Wirkungen (Von Homeyer P et al. 2011, Montano N et al. 1998). Bei Transmittern handelt es sich um chemische Botenstoffe, mit denen Neurone und Zielzellen zur Auslösung rezeptorabhängiger Signalkaskaden kommunizieren. Eine Aktivierung sympathischer Nervenfasern hat über  $\beta$ -Rezeptoren eine Steigerung der HR, Erregungsleitung und Kontraktilität zur Folge, während eine parasympathische Aktivierung über muskarinerge Rezeptoren den gegenteiligen Effekt hat. So wird sichergestellt, dass die kardiale Funktion an die jeweilige körperliche Situation angepasst wird.

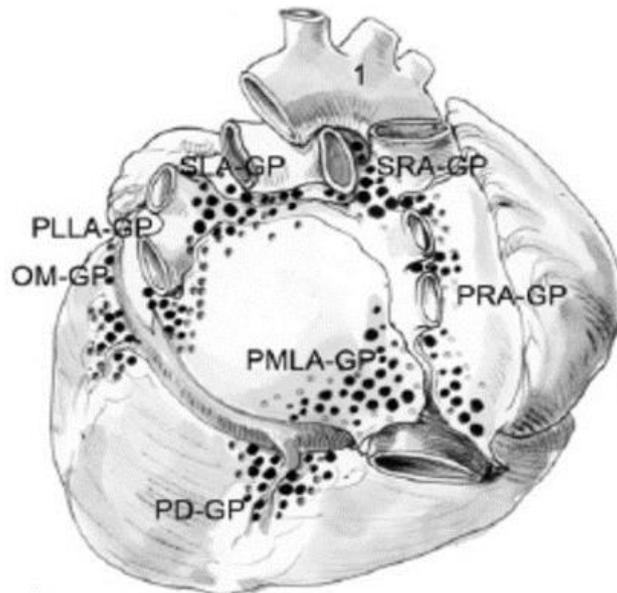
Die sympathischen Kerngebiete der präganglionären Neurone sind im thorakolumbalen Rückenmark lokalisiert. Dabei innervieren die Neurone der Segmente T1 - T7 v.a. thorakale Organe wie das Herz. Die Umschaltung auf das postganglionäre Neuron erfolgt im *Truncus*

*sympathicus*. Dieser besteht aus 22 paarigen Ganglien, die sich beidseitig entlang der Wirbelsäule von der Schädelbasis bis zum Steißbein erstrecken. Von dort ziehen dann die postganglionären Nervenfasern zu den *Nervi cardiaci inferior, medius* und *superior*. Die sympathische Wirkung wird über den Transmitter Noradrenalin vermittelt (Von Euler US, Hillarp NA 1956).

Die präganglionären Kerngebiete des Parasympathikus werden in einen kranialen (Hirnstamm) und einen sakralen (S2 - S4) Anteil eingeteilt. Die präganglionären Efferenzen werden Herznah auf postganglionäre Neurone umgeschaltet. Die postganglionären Nervenfasern des Parasympathikus bilden zusammen mit sympathischen Anteilen GP im AINS — ein komplexes Netzwerk aus Neuronen, Gliazellen und Nervenfasern, welches sich eingebettet im epikardialen Fettgewebe in unmittelbarer Nähe zu den PV befindet (Armour JA et al. 1997). Efferente Fasern des *Nervus vagus* sind für die parasympathische Innervation des Herzens verantwortlich, wobei Acetylcholin dabei als Transmitter agiert. Die cholinergen Nervenfasern verlaufen mit den sympathischen Fasern von den intrakardialen Ganglien über den Koronarvenensinus zu den Ventrikeln, wo ihnen eine wichtige Rolle in der Modulation der ventrikulären Elektrophysiologie zugeschrieben wird (Jungen et al. 2017).



**Abbildung 1:** Vegetative Innervation des Herzens (Schünke M, Schulte E, Schumacher U et al. 2009)



**Abbildung 2:** GP sind in unmittelbarer Nähe zu den PV lokalisiert (Corradie D et al. 2013)

Da sich atrial lokalisierte GP in lokalem Bezug zu den Pulmonalvenenostien befinden, ist ein gewisser Grad der autonomen Denervierung durch eine PVI nicht zu vermeiden. Spezialisierte Nervenendigungen und zahlreiche nicht-myelinisierte C-Fasern sind im Dach des linken Vorhofes und um die vier PV lokalisiert (Marron K et al. 1995). Die fokale Ablation der PV könnte daher zu einer Zerstörung der postganglionären parasympathischen Fasern oder spezialisierter Nervenendigungen in den PV führen, die für die Innervierung des Sinusknotens zuständig sind (Hsieh MH et al. 1999). Allerdings existieren kaum Möglichkeiten zur Evaluation des durch die PVI entstandenen neuronalen Schadens und die genauen Mechanismen der neuronalen Modulation sind noch nicht ausreichend verstanden.

### **2.3. Die Herzfrequenzvariabilität spiegelt die autonome Funktion des Herzens wider**

Eine Charakterisierung des autonomen Nervensystems ist durch die Bewertung der Herzfrequenzvariabilität (HRV) möglich (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology 1996). Die Bestimmung der HRV ist ein etabliertes nicht-invasives Verfahren, das durch die Erfassung der RR-Intervalle im EKG die Interaktion von Sympathikus und Parasympathikus und den Einfluss des autonomen Nervensystems auf das Herz mathematisch beschreibt. Die HRV ist damit ein indirektes Verfahren zur Untersuchung der autonomen Steuerung des Herzens. Bei der zeitbezogenen HRV-Analyse werden die RR-Intervalle mathematisch hinsichtlich ihrer Varianz beurteilt. Das heißt, dass die RR-Intervalle über die Zeit gemessen werden und daraus der Mittelwert, die Standardabweichung und andere Parameter erhoben werden. Die

frequenzbezogenen HRV-Analyse erfolgt über eine Spektralanalyse mittels *Fast-Fourier-Transformation* — eine mathematische Methode zur Umwandlung zeitbezogener in frequenzbezogene Daten.

Eine Steigerung der HR und Veränderungen der HRV-Parameter weisen auf eine autonome Dysfunktion nach PVI hin. Diese Änderungen sind aber nur vorübergehend, was die Erholung der autonomen Denervierung widerspiegeln könnte (Hsieh MH et al. 1999). Durch die Analyse postprozeduraler HRV-Parameter konnte gezeigt werden, dass die autonome Denervierung durch PVI einen antiarrhythmischen Effekt mit einem besseren Ergebnis für die Patienten hat (Pappone C et al. 2004).

#### **2.4. S100B als Biomarker für neuronalen Schaden**

Die durch PVI verursachte neuronale Modulation führt zur Freisetzung von sogenannten *damage-associated molecular patterns* Proteins (DAMP), eine vielfältige Gruppe von Molekülen, die bei neuronalen Verletzungen freigesetzt werden (Braun M et al. 2017). S100B ist ein hauptsächlich in Gliazellen vorkommendes, kalziumbindendes Protein aus der Gruppe der DAMPs, welches als Biomarker für die zerebrale Schädigung und Prognosebestimmung bei Patienten mit Apoplex (Monbailliu T et al. 2017), Schädelhirn-Trauma (Thelin EP et al. 2017), Subarachnoidalblutung (Chaudhry SR et al. 2018) und erfolgreicher Reanimation (Tat RM et al. 2019) verwendet wird.

Die biologische Funktion von S100B besteht in der Regulation von einer Vielzahl zellulärer Funktionen wie Zellwachstum und -differenzierung, Apoptose und Proteinphosphorylierung (Donato et al. 2009, Donato et al. 2013). Des Weiteren wirkt es als neurotropher Faktor, der die Proliferation von Gliazellen und Differenzierung unreifer Neurone anregt (Kligman D et al. 1985, Winningham-Major F et al. 1989, Haglid KG et al. 1997). Über den *receptor of advanced glycosylation end products* (RAGE) vermittelt S100B seine Wirkung bei Regenerationsprozessen im PNS (Sbai O et al. 2010). Ob diese Beobachtungen auch auf das AINS zutreffen, ist bis jetzt noch nicht untersucht worden.

#### **2.5. Zielsetzung**

Die Messung von S100B könnte eine Methode zur Evaluation des entstandenen neuronalen Schadens durch PVI darstellen, da sich dieses Protein bereits als Marker für die Verletzung von Nervenzellen etabliert hat. Dies könnte helfen, die zu Grunde liegenden Mechanismen der neuronalen Modulation und deren Auswirkung auf das Ablationsergebnis zu charakterisieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Rolle von S100B bei Schädigung des AINS durch PVI zu untersuchen und zu charakterisieren. Dies erfolgte in einem translationalen Ansatz unter Einsatz verschiedener Modelle. Nach Verifizierung der Expression von S100B im AINS und der Beschreibung dessen Einflusses auf das AINS erfolgte in einer

Beobachtungsstudie von Patienten mit durchgeführter PVI die Bestimmung von S100B in Plasmaproben.

### **3. Methoden**

#### **3.1. Studiendesign**

Zur Erfassung des Anstieges von S100B-Plasmaspiegeln nach PVI wurde bei Patienten mit VHF jeweils unmittelbar vor und nach durchgeführter Ablation ein Plasmaröhrchen Blut aus dem venösen Zugang der *Vena femoralis* abgenommen. Die erste Kontrollgruppe bildeten aufgrund nicht durchgeführter Ablation Patienten mit einer elektrophysiologischen Untersuchung (EPU) zur Detektion von unklaren ventrikulären oder supraventrikulären Herzrhythmusstörungen. Die zweite Kontrollgruppe bildeten Patienten mit Vorhofflattern und einer Ablation des cavotrikupidalen Isthmus (CTI) — einer spärlich innervierten Region zwischen *Vena cava inferior* und Trikuspidalklappenannulus (Li A et al. 2002) und damit eine gering erwartete lokale Denervierung durch Ablation. Bei den beiden Kontrollgruppen wurde ebenfalls direkt vor und nach der EPU bzw. Ablation ein Plasmaröhrchen Blut aus der venösen Schleuse abgenommen. In der vorliegenden Beobachtungsstudie wurden primär alle Patienten aufgenommen, die zwischen dem 08.03.2016 und dem 28.08.2017 in der Klinik für Kardiologie mit Schwerpunkt Elektrophysiologie des Universitäres Herz- und Gefäßzentrum UKE Hamburg wegen VHF erstmalig ablatiert wurden.

Die Ablation des VHF wurde mittels Hochfrequenzstroms (HF, n = 62) oder Kryotechnik (n = 50) durchgeführt. Ausschlusskriterium für die Studie war eine bereits früher durchgeführte Ablation bei Vorhofflimmern. Zum Ausschluss links-atrialer Thromben und zur Evaluation des links-atrialen Diameters wurde vor der Ablation eine transösophageale Echokardiographie durchgeführt. Die Ablation erfolgte unter Sedierung mittels 2%igen Propofol, Fentanyl und bei Bedarf Midazolam i.v. (Kottkamp H et al. 2011, Gunawardene et al. 2018). Ein kontinuierliches Monitoring der Vitalparameter (12-Kanal-EKG, nichtinvasive Blutdruckmessung, Sauerstoffsättigung) war über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg gewährleistet. Unter Röntgenkontrolle erfolgte der Zugang zu den PV nach Legen der venösen Schleusen in die *Venae femoralis* über eine transeptale Punktion mit anschließender Darstellung der PV mittels Kontrastmittel. Zur Erzeugung zirkulärer transmuraler Läsionen mittels thermischer Energie erfolgte die Isolation der lateralen und septalen PV im Fall von HF Punkt für Punkt dreidimensional gesteuert durch das 3D-System CARTO mit einem gekühlten Ablationskatheter. Durch Messung des Anpressdruckes während der Intervention mittels Thermocool SmartTouch Katheter (Biosense Webster) konnte die Steuerung der Läsionstiefe und damit das Ablationsergebnis verbessert werden (Ariyaratna N et al. 2018). Die Ablation in Kryotechnik erfolgte mittels eines Kryoballons, der unter fluoroskopischer Sicht in das

Ostium der PV bis zur vollständigen Okklusion platziert wurde. Anschließend entstand durch einmalige Kälteanwendung von 180 bis 240 Sekunden ein zirkuläres Ablationsareal um das Ostium der PV. Bei einer Reduktion des *compound motor action potential* (CMAP), welches die Überwachung der elektrischen Aktivität des Zwerchfellmuskels während der Stimulation des *Nervus phrenicus* sicherstellt, wurde die Kälteapplikation sofort abgebrochen.

Im Rahmen der EPU wurden Diagnostikkatheter in den hohen rechten Vorhof, in den rechtsventrikulären Apex und an das His-Bündel platziert, um dann im Anschluss nach Stimulationsprotokoll ventrikuläre oder supraventrikuläre Herzrhythmusstörungen auszulösen und deren Mechanismus zu analysieren.

Bei Ablation des Vorhofflatterns wurde der Bereich des CTI — eine schmale Muskelbrücke zwischen der *Vena cava inferior* und des Trikuspidalklappenrings als anatomisches Substrat des typischen Vorhofflatterns aufgesucht. Unter fluoroskopischer Sicht wurde ein steuerbarer Ablationskatheter über die *Vena femoralis* am CTI nahe dem Ostium des Koronarvenensinus positioniert. Mittels gezielter Applikation von HF wurde unter laufender Stimulation im Koronarvenensinus eine linienförmige Läsion zwischen Trikuspidalklappenannulus und *Vena cava inferior* bis zum Erreichen eines kompletten bidirektionalen Blockes gesetzt (Fischer B et al. 1996). Nach einer 30-minütigen Wartezeit erfolgte ein erneuter Nachweis des bidirektionalen Isthmusblocks.

### **3.2. Messungen der Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität**

Um die autonome Veränderung durch PVI auf funktioneller Ebene zu charakterisieren, wurden die HR und HRV analysiert. Dazu wurden EKG-Aufzeichnungen von Patienten im Sinusrhythmus vor und nach PVI, EPU und CTI-Ablation hinsichtlich der HR geprüft. Messungen der HRV wurden gemäß Richtlinien (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology 1996) durchgeführt. Nach einer fünfminütigen Ruhepause wurde in einer Untergruppe von Patienten (n=10) die HR und HRV mittels eines digitalen, mobilen HR-Monitors (Polar Flow V800®, Polar Electro Oy, Kempele, Finland) aufgenommen. Anschließend erfolgte die Auswertung der Daten durch die Software Kubios HRV (Version 2.2, Biosignal Analysis and Medical Imaging Group, Department of Physics and Mathematics, University of Eastern Finland) (Tarvainen MP et al. 2014).

### **3.3. Follow-up**

Die Patienten wurden innerhalb 6 Monate nach Ablation in der rhythmologischen Sprechstunde des Universitären Herz- und Gefäßzentrums UKE Hamburg untersucht und ein Ruhe-EKG wurde aufgezeichnet. Darüber hinaus wurde das Auftreten eines Rezidivs mit einer den Leitlinien entsprechenden Blanking-Periode von drei Monaten abgefragt (Camm et al.

2010). In dieser dreimonatigen Heilungs- und Stabilisierungsphase nach PVI wird ein frühes Rezidiv atrialer Arrhythmien auf die vorübergehenden entzündlichen und proarrhythmischen Veränderungen zurückgeführt (Koyama T et al. 2009, Lim HS et al. 2014). Gegebenenfalls wurden die Patienten telefonisch kontaktiert, wenn diese nicht zum Nachsorgetermin erschienen sind. Des Weiteren wurden Berichte und Langzeit-EKG-Auswertungen von Hausärzten, niedergelassenen Kardiologen oder anderer elektrophysiologischer Zentren, wo ggf. die Weiterbehandlung der Patienten übernommen wurde, eingeholt.

### **3.4. Proteinanalysen**

Der Nachweis von S100B in den humanen Plasmaproben erfolgte mittels eines kommerziell erwerblichen Assay nach Herstellerinformation. In den Gewebeproben wurde S100B mittels eines hochsensitiven ELISAS (Merck Millipore) nachgewiesen. Um den durch Ablation entstandenen myokardialen Schaden zwischen den 3 Patientengruppen vergleichen zu können, wurde hochsensitives Troponin I (hsTnl) mittels Immunoassay (Architect i2000SR, Abbott Diagnostics) bestimmt (Antman EM et al. 1996). Activin A, ein Marker für kardiales Fettgewebe (Venteclef N et al. 2015), wurde zum Ausschluss der S100B-Erhöhung nach PVI durch Zerstörung von Adipocyten (Gonçalves CA et al. 2010), mittels ELISA (R&D Systems) bestimmt.

### **3.5. Immunhistochemischer Nachweis von S100B**

Im Rahmen von neuroanatomischen Untersuchungen wurde sowohl kardiales Gewebe von Menschen (linkes Vorhofohr) als auch von Mäusen mittels Immunhistochemie hinsichtlich der Expression von S100B im AINS analysiert. Die menschlichen Gewebeproben stammen dabei von Patienten mit einem operativen Eingriff am offenen Herzen bzw. von einem explantierten Herzen von einer Herztransplantation. Eine detaillierte Darstellung der immunhistochemischen Methoden findet sich im Originalartikel.

### **3.6. *In vitro* Experimente**

Zur Messung von Aktionspotentialen (AP) mittels intrazellulären Mikroelektroden wurden isolierte humane rechtsatriale *Musculi pectinati* (Horváth A et al. 2018) verwendet, die sich für mindestens 20 Minuten in einer mit S100B versetzten (100ng/ ml) Lösung befanden.

Das Langendorff-Perfusionssystem diente für EPUs mittels programmierter Stimulation zur Prüfung eines direkten Effektes von S100B auf die kardiale Elektrophysiologie an Maus Herzen. Nach Zugabe von rekombinanten S100B (100 ng/ml) zum Perfusionspuffer und einer 10-minütigen Äquibrierungsphase wurden elektrophysiologische Parameter nach einem etablierten Protokoll (Jungen C et al. 2017) erhoben. Als Negativkontrollen dienten Maus Herzen, deren Perfusionslösung nicht mit S100B versetzt wurde.

Um eine Beteiligung des zentralen Nervensystem für den S100B-Anstieg nach PVI auszuschließen, wurden *ex vivo* Mausherzen im Langendorff-Perfusionssystem als Modell für Herzen ohne zentrale Innervation genutzt. Dabei wurde an der hinteren Wand vom linken Vorhof ein thermischer Kryoschaden nachinitiiert und das Perfusat für S100B-Bestimmungen aufgefangen.

Zellkulturen aus intrakardialen Neuronen von Mäusen wurden für 16 Stunden mit S100B (100 ng/ml) versetzt, um so die Rolle von S100B bei der Regeneration von Nervenfasern genauer zu untersuchen. Als Positivkontrollen dienten Zellkulturen versetzt mit 5%igen fetalem Kalbsserum, als Negativkontrollen Zellkulturen ohne die Zugabe von zusätzlichen Faktoren.

Die Durchführung der *in vitro* Experimente erfolgte durch die Mitglieder der cardiac Neuro- and Electrophysiology research group, Kooperationspartner und Mitarbeiter am Campus Forschung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Eine detaillierte Darstellung der experimentellen Methoden findet sich im Originalartikel.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Charakterisierung des Patientenkollektivs**

Insgesamt wurden 151 Patienten in die Studie aufgenommen. Die PVI-Gruppe bestand aus 112 Patienten, von denen 1 Patient aufgrund einer intraprozeduralen Reduktion des CMAP ausgeschlossen wurde. Die beiden Kontrollgruppen bestanden jeweils aus 19 (EPU) bzw. 20 Patienten (CTI), wobei ein Patient aus der CTI-Gruppe aufgrund eines diagnostizierten VHF ausgeschlossen wurde. Bei der Geschlechtsverteilung der Patienten gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $P = 0,079$ ). Darüber hinaus gab es auch beim BMI sowie bei den Begleiterkrankungen keine signifikanten Unterschiede. Allerdings bestand in der Altersverteilung ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ( $P < 0,001$ ).

In der PVI-Gruppe hatten 71% der eingeschlossenen Patienten paroxysmales VHF. 88,4% der Patienten mit VHF erhielten zum Zeitpunkt der PVI eine dauerhafte orale Antikoagulation mit Vitamin K Antagonisten oder direkten oralen Antikoagulantien.

### **4.2. Expression von S100B im autonomen intrakardialen Nervensystem**

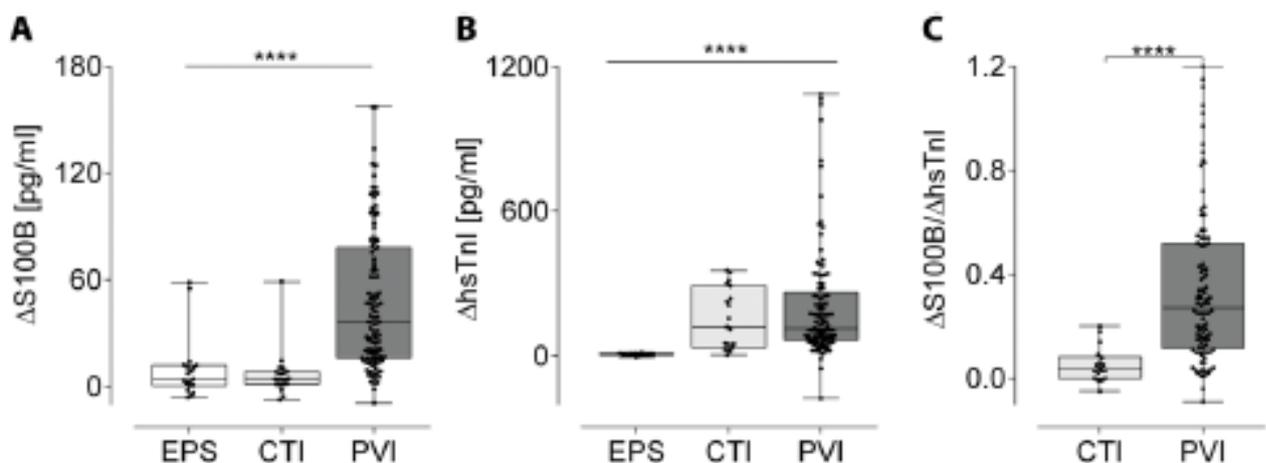
Die Messung von S100B in menschlichen *Musculi pectinati* bestätigt die Expression von S100B im kardialen Gewebe mit einem Anteil von  $422 \pm 65,4$  ng/g im atrialen Gewebe. Immunhistochemische Färbungen zeigten, dass sich S100B-exprimierende Gliazellen sowohl in unmittelbarer Nähe zu großen Nervenzellköpern in intrakardialen Ganglien als auch in den

Nerv umhüllenden Fasern im linksatrialen Myokard befinden. Die Expression von RAGE wurde in Zellkörpern von intrakardialen Neuronen und Nervenfasern bestätigt.

#### 4.3. Anstieg der S100B-Plasmakonzentrationen nach Pulmonalvenenisolation

Die Baseline S100B-Plasmakonzentrationen der Patienten, die eine PVI erhalten haben, zeigten keine Unterschiede zu den beiden Kontrollgruppen, die aus Patienten mit durchgeführter EPU (keine Ablation) und CTI-Ablation bestanden. In der PVI-Gruppe stiegen die S100B-Plasmakonzentrationen nach Ablation von  $33,8 \pm 1,5$  auf  $81,9 \pm 4,1$  pg/ml ( $P < 0,0001$ ) an, während bei den beiden Kontrollgruppen sich nur ein leichter Anstieg von S100B nachweisen lies (EPU: von  $31,3 \pm 4,0$  auf  $41,0 \pm 6,4$  pg/ml,  $P = 0,0276$ ; CTI: von  $29,5 \pm 2,5$  auf  $36,3 \pm 3,6$  pg/ml,  $P = 0,0032$ ). Auch am Tag nach der PVI ( $19,8 \pm 4,1$  Stunden) waren immer noch erhöhte S100B-Plasmakonzentrationen nachweisbar ( $39,8 \pm 11,5$  pg/ml versus  $33,6 \pm 11,5$  pg/ml als Baseline,  $n = 18$ ,  $P = 0,002$ ).

Die für den Vergleich des durch Ablation entstandenen myokardialen Schadens durchgeführten Messungen von hsTnI zeigten einen vergleichbaren Anstieg von hsTnI sowohl in der PVI- als auch CTI-Gruppe (PVI: von  $4,1 \pm 0,3$  auf  $151,5 \pm 11,39$  pg/ml,  $P < 0,0001$ ; CTI: von  $14,6 \pm 3,1$  auf  $188,5 \pm 26,27$  pg/ml,  $P < 0,0001$ ). In der EPU-Gruppe war nur ein geringer Anstieg von hsTnI nachweisbar (von  $7,84 \pm 2,1$  auf  $14,2 \pm 3,6$  pg/ml,  $P = 0,0017$ ). Die Normalisierung von  $\Delta S100B$  auf  $\Delta hsTnI$  in der PVI- im Vergleich zur CTI-Gruppe zeigte eine 4,5-fach höhere S100B-Konzentration in der PVI-Gruppe, was auf einen größeren neuronalen bei gleich großem myokardialen Schaden in der PVI-Gruppe hinweist (von  $0,05 \pm 0,02$  auf  $0,33 \pm 0,03$ ,  $P < 0,0001$ ).



**Abbildung 3:** Plasmakonzentrationen von S100B und hsTnI nach Ablation (Scherschel K et al. 2019)

- (A)  $\Delta$ S100B-Plasmakonzentrationen nach PVI, EPU und CTI-Ablation
- (B)  $\Delta$ hsTnI-Plasmakonzentrationen nach PVI, EPU und CTI-Ablation
- (C) Normalisierung von  $\Delta$ S100B auf  $\Delta$ hsTnI zum Vergleich zwischen neuronalen und myokardialen Schaden

#### 4.4. Veränderungen der Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität

Die HR stieg bei Patienten, die eine PVI bekommen haben, um durchschnittlich 9 Schläge in der Minute an (von  $60 \pm 1$  auf  $69 \pm 1$  Schläge pro Minute (SPM),  $P = 0,0001$ ,  $n = 72$ ), während bei Patienten mit einer CTI-Ablation die HR nicht signifikant anstieg (von  $60 \pm 3$  auf  $66 \pm 3$  SPM,  $P = 0,0646$ ,  $n = 9$ ) und nach EPS stabil blieb (von  $61 \pm 3$  auf  $62 \pm 3$  SPM,  $P = 0,8956$ ,  $n = 15$ ). Die Reduktion von sympathischen und parasympathischen HRV-Parametern nach PVI (siehe Tabelle 1) weisen auf einen Schaden von sowohl sympathischen als auch parasympathischen Zellkörpern und Nervenfasern durch die Ablation hin.

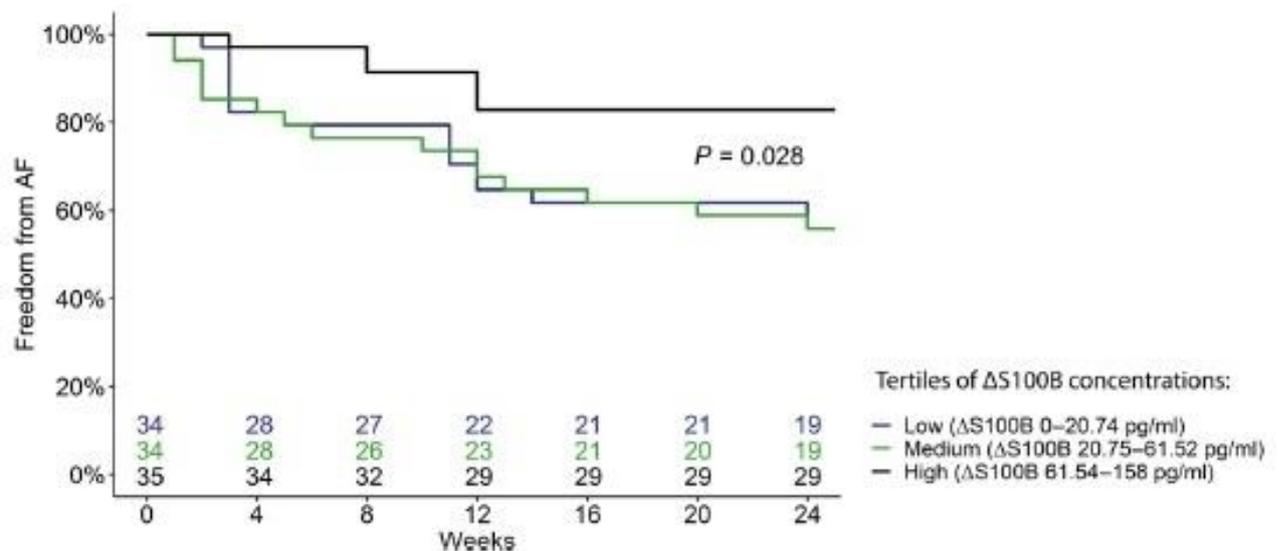
Parameter	Vor Ablation	Nach Ablation	P-Wert
<b>Time-domain</b>			
SDNN (ms)	$32,2 \pm 10,1$	$13,3 \pm 9,8$	0,0020
RMSSD (ms)	$19,4 \pm 8,8$	$8,8 \pm 8,3$	0,0049
<b>Frequency-domain</b>			
LF ( $\text{ms}^2$ )	$257,8 \pm 166,7$	$74,8 \pm 187,5$	0,0322
HF ( $\text{ms}^2$ )	$172,4 \pm 157,1$	$123,6 \pm 348,3$	0,0537
LF/ HF	$2,8 \pm 2,4$	$1,1 \pm 0,7$	0,0426
<b>Non-linear</b>			
SD <sub>1</sub> (ms)	$13,7 \pm 6,3$	$6,2 \pm 5,9$	0,0049
Rec (%)	$32,3 \pm 8,4$	$37,5 \pm 10,8$	0,1869
DFA1	$1,2 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,3$	0,0667

**Tabelle 1:** Veränderungen der HRV-Parametern nach PVI, SDNN: standard deviation of normal-to-normal RR intervals, RMSSD: root mean square of successive differences in normal-to-normal RR intervals, LF: low frequency, HF: high frequency, SD1: short-term RRI variability, rec: recurrence rate, DFA: detrended fluctuation analysis

#### 4.5. Follow-up: weniger Rezidive bei höherem S100B-Anstieg

Von den 103 Patienten, von denen eine sechs monatige Nachbeobachtungsphase vorhanden ist, wiesen 29 Patienten (28,2 %) innerhalb der ersten 3 Monaten und 19 Patienten (18,4%) zwischen dem 3. und 6. Monat nach PVI ein dokumentiertes VHF auf. Davon hatten die

Rezidiv-freien Patienten einen höheren S100B-Anstieg nach Ablation, unabhängig vom zeitlichen Auftreten des Rezidivs.



**Abbildung 4:** Kaplan-Meier-Kurve der Rezidivfreiheit in Abhängigkeit der  $\Delta$ S100B-Plasmakonzentrationen (Scherschel et al. 2019)

#### 4.6. Expression und Einfluss von S100B auf das autonome intrakardiale Nervensystem

Die Expression von S100B in Nerven und Ganglien von Mausherzen konnte durch immunhistochemische Färbungen erfolgreich bestätigt werden. Nach Setzen eines Kryoschadens an der posterioren Wand des linken Vorhofes an *ex vivo* Mausherzen im Langendorff-Perfusionssystem ließ sich ein akuter Anstieg der S100B-Konzentration im Perfusat nachweisen (von  $4,7 \pm 0,7$  pg/ml auf  $13,2 \pm 2,7$  pg/ml,  $P = 0,0045$ ). Histologische Färbungen nach Setzen des Kryoschadens zeigten Ganglien mit Anzeichen eines thermischen Schadens und Nekrose.

Mit rekombinantem S100B versetzte intrakardiale Neurone ( $n=5$ ) zeigten eine deutlich verminderte Rate an AP bei lang anhaltenden Depolarisationspulsen.

Mit S100B versetzte Zellkulturen aus intrakardialen Neuronen zeigten nach 16-stündiger Inkubation längere Neuriten als die Negativkontrollen ( $812,1 \pm 41,9$  versus  $616,1 \pm 37,2$   $\mu$ m,  $P = 0,0009$ ).

#### 4.7. Adipozyten können als mögliche Quelle von S100B vernachlässigt werden

Da sowohl die Activin A-Plasmakonzentrationen in der PVI- als auch in der CTI-Gruppe nach Ablation anstiegen, aber nur die PVI-Gruppe signifikante Erhöhungen der S100B-

Konzentrationen zeigte, sehen wir für die S100B-Freisetzung den Nerven- und nicht den Adipozytenschaden als maßgebend an.

## 5. Diskussion

Die wichtigsten Ergebnisse lassen sich zusammenfassend wie folgt darstellen:

- S100B, ein Marker für neuronale Verletzungen, wird in Nervenfasern und Ganglien von Herzen exprimiert und durch die neuronale Modulation durch PVI freigesetzt.
- Patienten mit einem höheren postprozeduralen S100B-Anstieg nach PVI zeigten im Follow-up weniger Rezidive.
- Die im Anschluss durchgeführten *in vitro* Versuche mit S100B ergaben eine verminderte Rate an AP sowie ein erhöhtes Wachstum von Neuriten in Zellkulturen.
- Die Messung von S100B könnte eine sensitive Methode zur genauen Evaluation des entstandenen neuronalen Schadens durch PVI darstellen und helfen die zu Grunde liegenden Mechanismen der neuronalen Modulation, wie z.B. durch S100B induziertes *nerve sprouting* und deren Auswirkung auf das Ablationsergebnis zu charakterisieren.

### 5.1. Das autonome intrakardiale Nervensystem als Substrat für Vorhofflimmern

Die zirkumferentielle, antrale PVI mit dem Endpunkt der Elimination aller Potentiale aus den PV (Haissaguerre et al. 2000) stellt heutzutage eine wichtige Therapiestrategie zur Behandlung des VHF dar. Die partielle atriale Denervierung des AINS, welches sich u.a. insbesondere am Übergang zum Pulmonalvenenantrum befinden, könnte dabei eine zentrale Rolle in der Effektivität der PVI spielen (Pappone C et al. 2004), da diese an der Entstehung und Aufrechterhaltung des VHF beteiligt sind. Das AINS besteht aus einem ausgedehnten epikardialen neuronalen Netzwerk von Neuronen, Axonen und autonomen Ganglien - nicht nur an den Vorhöfen, sondern auch an den Ventrikeln. Diese Ganglien, von denen die meisten in epikardialen Fettpolstern eingebettet sind, variieren in ihrer Größe - von denen, die nur wenige Neurone enthalten, bis zu denen, die über 200 Neurone enthalten (Armour JA et al. 1997). Eine hohe Dichte der autonomen Innervation zeigt dabei die posteriore Wand des linken Vorhofs, insbesondere am Übergang der PV zum Antrum (Pauza DH et al. 2000, Tan AY et al. 2006). Obwohl bekannt ist, dass die PV eine wichtige Rolle bei der Initiierung des VHF spielen, bleibt der genaue Mechanismus, durch den die ektopischen Schläge erzeugt werden, unklar. Ein möglicher Mechanismus sind paroxysmale Entladungen des AINS. Histologische Studien zeigen, dass die PV sowohl durch sympathische als auch parasympathische Nerven innerviert sind (Tan AY et al. 2006, Petraitiene V et al. 2014) und die erhöhte Aktivität dieser intrinsischen kardialen Nerven an der Auslösung von VHF beteiligt ist (Patterson E et al. 2005). Die neuronale Denervierung nach PVI wird mit einem geringeren Rezidivrisiko für erneut

auftretendes VHF in Verbindung gebracht (Pappone C et al. 2004) und unterstützt so einen Kausalzusammenhang zwischen der Aktivität des AINS und der Entstehung von VHF (Lu Z et al. 2009). Auch in unserer Arbeit hatten die Patienten mit einer höheren S100B-Freisetzung nach PVI, also einem größeren neuronalen Schaden, eine geringe Rezidivrate, was die Annahme eine zusätzliche neuronale Denervierung durch PVI zu erzielen, unterstützt. Allerdings sind die Auswirkungen der neuronalen Modulation auf die kardiale Elektrophysiologie und das Follow-up noch nicht ausreichend untersucht.

## **5.2. S100B als Marker für die neuronale Modulation durch Pulmonalvenenisolation**

Das in Gliazellen exprimierte Protein S100B (Gerlach R et al. 2006) könnte in Zukunft helfen, die zu Grunde liegenden Mechanismen der neuronalen Modulation durch PVI besser zu veranschaulichen. Seit der ersten Isolierung aus Rindergehirn (Moore BW 1965) hat sich das kalziumbindende Protein aus der S100-Familie als ein gut charakterisierter Marker für strukturelle Hirnverletzungen etabliert (Sorci G et al. 2010), unter anderem in den skandinavischen Leitlinien (Undén J et al. 2013). Trotz der vielen Studien zur Freisetzung von S100B bei Schädigung des Gehirns gilt S100B auch als Marker für Gliazellen im PNS (Liu Z et al. 2015), was in dieser Arbeit durch den erfolgreichen Nachweis von S100B in Gliazellen im kardialen AINS ebenfalls bestätigt wurde.

Doch als mögliche Ursache für den postprozeduralen S100B-Anstieg nach PVI sind auch sogenannte *silent cerebral lesions* (SCL) in Betracht zu ziehen (Sramko M et al. 2014). Dabei handelt es sich um neu im MRT-detektierte aufgetretene zerebrale Ischämien ohne ein klinisch fassbares neurologisches Defizit (Deneke T et al. 2015). Diese SCL treten nicht nur nach PVI auf (Deneke T et al. 2011, Haeusler KG et al. 2013, Wissner E et al. 2014), sondern auch im Rahmen von anderen kardiovaskulären Interventionen wie z.B. Koronarangiographien (Büsing KA et al. 2005) oder in der Herzklappen- und Bypasschirurgie (Sun X et al. 2012). Eine adäquate Heparinisierung mit einer *activated clotting time* (ACT) > 300 Sekunden kann das Auftreten von SCL reduzieren (Scaglione M et al. 2012), was in unseren Prozeduren durch eine viertelstündige Messung der ACT und ACT-gesteuerte Antikoagulation mit Heparin sichergestellt wurde.

Doch mehrere Argumente sprechen gegen eine Freisetzung aus dem zentralen Nervensystem, sondern befürworten das AINS als Ursprungsort für den S100B-Anstieg nach PVI in der von uns durchgeführten Studie. Nach Setzen eines thermischen Kryoschadens an der hinteren Wand des linken Vorhofes an *ex vivo* Mauserzen im Langendorff-Perfusionssystem ließ sich ein akuter Anstieg der S100B-Konzentration im Perfusat nachweisen. Außerdem hatte der Patient mit dem höchsten S100B-Anstieg nach PVI eine intraprozedurale Abnahme des CMAP — ein invasives Verfahren zur Überwachung der

diaphragmatischen elektromyographischen Signale — und eine temporäre Zwerchfellparese. Die postprozedurale Parese des *Nervus phrenicus* und der höchste S100B-Anstieg von allen Patienten bestärken die Annahme, dass das PNS Ursprungsort für die S100B-Freisetzung ist.

### **5.3. Autonome Veränderungen nach Pulmonalvenenisolation**

Die Messungen der HR und HRV, welche die Schwankungen der HR von Schlag zu Schlag widerspiegelt, stellen eine indirekte Messgröße der neurovegetativen Aktivität und der autonomen Funktion des Herzens dar. Eine Erhöhung der HR und Verringerung HRV-Parameter nach PVI weisen auf eine Modulation des ANS hin (Bauer A et al. 2006, Wang K et al. 2013). Diese transienten Veränderungen der autonomen Funktion könnten den möglichen Mechanismus der Palpitation (Sinustachykardie ohne Wiederauftreten des paroxysmalen VHF) nach PVI erklären (Hsieh MH et al. 1999). Durch die PVI kommt es zu einer Modulation von sowohl Sympathikus als auch Parasympathikus, da adrenerge und cholinerge Nervenfasern eng miteinander ko-lokalisiert sind und sich anatomisch betrachtet in unmittelbarem Bezug zum Antrum der PV befinden (Tan AY et al. 2006). Doch nicht nur die Vorhöfe sind durch die Modulation betroffen, sondern auch die Ventrikel. Durch die sympathisch-parasympathische Denervation steigt die Rate an vorzeitig einfallenden ventrikulären Schlägen und die Vulnerabilität für ventrikuläre Arrhythmien infolge einer reduzierten parasympathischen bei gleichzeitig dominanter sympathischer Aktivität (Jungen et al. 2017). Doch Messungen der HR und HRV stellen ähnlich wie vagale Reaktionen durch PVI (Ohkubo K et al. 2008) nur Surrogatmarker für den neuronalen Schaden dar. Daher wäre ein Laborparameter zur genauen Detektion und Quantifizierung des neuronalen Schadens durch Ablation von enormem Interesse. Ob S100B einen geeigneten Laborparameter darstellen könnte, müsste allerdings in weiteren Studien genauer untersucht werden. S100B könnte ähnlich wie *nerve growth factor* (Kangavari S et al. 2006) eine wichtige Rolle bei der Reinnervation des AINS nach PVI spielen, was ein verstärktes Neuritenwachstum von mit S100B-versetzten Zellkulturen zeigt. Dieses *nerve sprouting* wird durch die bei PVI gesetzten thermischen Läsionen hervorgerufen (Okuyama Y et al. 2004) und könnte die erhöhte HR nach PVI erklären. Doch ob dieser neurotrophe Effekt von S100B Auswirkungen auf die Bildung von möglichen Arrhythmien bei Patienten nach PVI hat und wie dies das Ablationsergebnis beeinflusst, muss in weiteren Studien genauer untersucht werden.

### **5.4. Schlussfolgerung**

S100B – ein Protein, das in kardialen Gliazellen des AINS exprimiert wird und durch die sympathisch-parasympathische Modulation bei PVI freigesetzt wird, könnte in Zukunft helfen die kardiale Denervierung genauer zu evaluieren und die zu Grunde liegenden Mechanismen der neuronalen Modulation und deren Auswirkung auf das Ablationsergebnis zu charakterisieren.

## 5.5 Zusammenfassung

Eine effektive Therapieoption zur Behandlung des Vorhofflimmerns, der häufigsten supraventrikulären Herzrhythmusstörung, stellt die Pulmonalvenenisolation (PVI) dar, welche die elektrische Isolation der Pulmonalvenen (PV) als Ziel hat. In unmittelbarer Nähe zu den PV eingebettet im epikardialen Fettgewebe befindet sich das autonome intrakardiale Nervensystem (AINS) und bildet ein komplexes Netzwerk aus Neuronen, Gliazellen und Nervenfasern. Aufgrund der anatomischen Nähe zu den PV hat die PVI eine Modulation bzw. partielle Denervierung des AINS zur Folge. Jedoch existieren nur wenige Möglichkeiten zur Evaluation der kardialen Denervierung durch PVI. Auch sind die genauen Mechanismen noch nicht ausreichend verstanden. S100B ist ein Protein aus der Gruppe der Alarmine, das bereits als Marker für die Verletzung von Nervenzellen etabliert wurde. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Rolle von S100B bei der Modulation des AINS durch PVI zu untersuchen und zu charakterisieren. Nach Verifizierung der Expression von S100B im AINS und der Beschreibung dessen Einflusses auf das AINS erfolgte in einer Beobachtungsstudie von Patienten mit durchgeführter PVI die Bestimmung von S100B in Plasmaproben. Die S100B-Plasmakonzentration stieg signifikant nach PVI, aber nicht in den Kontrollgruppen, an. Patienten mit einem höheren postprozeduralen S100B-Anstieg nach PVI zeigten im Follow-up über 6 Monate weniger Rezidive. Die Analyse der Herzfrequenz (HR) und Herzfrequenzvariabilität (HRV) zeigte einen Anstieg der HR und eine Reduktion von sympathischen und parasympathischen HRV-Parametern nach PVI, was auf einen Schaden von sowohl sympathischen als auch parasympathischen Zellkörpern und Nervenfasern durch die Ablation hinweist. Zur genaueren Beschreibung des Einflusses von S100B auf das AINS zeigten die im Anschluss durchgeführten *in vitro* Versuche mit S100B eine verminderte Rate an Aktionspotentialen sowie ein erhöhtes Wachstum von Neuriten in Zellkulturen. Das bei PVI von Gliazellen freigesetzte Protein S100B könnte in Zukunft helfen die neuronale Denervierung genauer zu evaluieren und die zu Grunde liegenden Mechanismen der neuronalen Modulation und deren Auswirkung auf das Ablationsergebnis zu charakterisieren.

## 5.6 Abstract

An effective therapeutic option for the treatment of atrial fibrillation, the most common supraventricular arrhythmia, is the pulmonary vein isolation (PVI) with the endpoint of electrical isolation of the pulmonary veins (PV). The cardiac autonomic nervous system (ICNS) is a complex network of neurons, glial cells and nerve fibers and is embedded in epicardial fatty tissue in close proximity to the PV. Therefore, PVI results in modulation or partial denervation of the ICNS. However, there are few methods to evaluate the neuronal damage caused by

PVI. Also, the exact mechanisms are not yet sufficiently understood. S100B is an alarmin, which has already been established as a marker for neuronal damage making it an ideal candidate for our study. Therefore, the aim of the present work was to investigate and characterize the role of S100B in PVI-induced ICNS damage. After verifying the expression of S100B in the ICNS and describing its influence on the ICNS, the determination of S100B in plasma samples was performed in an observational study with patients undergoing PVI. S100B plasma concentration increased significantly after PVI, but not in control groups. Patients with a higher post-procedural S100B increase after PVI showed fewer recurrences in the follow-up-period over 6 months. Analysis of heart rate (HR) and heart rate variability (HRV) showed an increase in HR and a reduction in sympathetic and parasympathetic HRV parameters after PVI, indicating damage to both sympathetic and parasympathetic cell bodies and nerve fibers due to ablation. For a more detailed description of the influence of S100B on the ICNS, subsequent in vitro studies with S100B presented a reduced rate of action potentials and increased growth of neurites in cell cultures. Taken together, the alarmin S100B released by glial cells during PVI may help to evaluate neuronal damage more detailed in the future. Furthermore it may help to characterize the underlying mechanisms of neuronal modulation and its effect on ablation outcome.

## 6. Literaturverzeichnis

Akbulak RÖ, Schäffer B, Jularic M, Moser J, Schreiber D, Salzbrunn T, Meyer C, Eickholt C, Kuklik P, Hoffmann BA, Willems S (2015) *Reduction of Radiation Exposure in Atrial Fibrillation Ablation Using a New Image Integration Module: A Prospective Randomized Trial in Patients Undergoing Pulmonary Vein Isolation*. J Cardiovasc Electrophysiol. 2015 Jul;26(7):747-53.

Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, Schactman M, McCabe CH, Cannon CP, Fischer GA, Fung AY, Thompson C, Wybenga D, Braunwald E (1996) *Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes*. N Engl J Med. 1996 Oct 31;335(18):1342-9.

Ariyaratna N, Kumar S, Thomas SP, Stevenson WG, Michaud GF (2018) *Role of Contact Force Sensing in Catheter Ablation of Cardiac Arrhythmias: Evolution or History Repeating Itself?* JACC Clin Electrophysiol. 2018 Jun;4(6):707-723.

Armour JA, Murphy DA, Yuan BX, Macdonald S, Hopkins DA (1997) *Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system*. Anat Rec. 1997 Feb;247(2):289-98.

Bauer A, Deisenhofer I, Schneider R, Zrenner B, Barthel P, Karch M, Wagenpfeil S, Schmitt C, Schmidt G (2006) *Effects of circumferential or segmental pulmonary vein ablation for paroxysmal atrial fibrillation on cardiac autonomic function*. Heart Rhythm. 2006 Dec;3(12):1428-35.

Björck S, Palaszewski B, Friberg L, Bergfeldt L (2013) *Atrial fibrillation, stroke risk, and warfarin therapy revisited: a population-based study*. Stroke. 2013 Nov;44(11):3103-8.

Braun M, Vaibhav K, Saad NM, Fatima S, Vender JR, Baban B, Hoda MN, Dhandapani KM (2017) *White matter damage after traumatic brain injury: A role for damage associated molecular patterns*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2017 Oct;1863(10 Pt B):2614-2626.

Büsing KA, Schulte-Sasse C, Flüchter S, Süselbeck T, Haase KK, Neff W, Hirsch JG, Borggrefe M, Düber C (2005) *Cerebral infarction: incidence and risk factors after diagnostic and interventional cardiac catheterization--prospective evaluation at diffusion-weighted MR imaging*. Radiology. 2005 Apr;235(1):177-83.

Calkins H, Hindricks G, Cappato R, Kim YH, Saad EB, Aguinaga L, Akar JG, Badhwar V, Brugada J, Camm J, Chen PS, Chen SA, Chung MK, Nielsen JC, Curtis AB, Davies DW, Day JD, d'Avila A, de Groot NMSN, Di Biase L, Duytschaever M, Edgerton JR, Ellenbogen KA, Ellinor PT, Ernst S, Fenelon G, Gerstenfeld EP, Haines DE, Haissaguerre M, Helm RH, Hylek E, Jackman WM, Jalife J, Kalman JM, Kautzner J, Kottkamp H, Kuck KH, Kumagai K, Lee R, Lewalter T, Lindsay BD, Macle L, Mansour M, Marchlinski FE, Michaud GF, Nakagawa H,

Natale A, Nattel S, Okumura K, Packer D, Pokushalov E, Reynolds MR, Sanders P, Scanavacca M, Schilling R, Tondo C, Tsao HM, Verma A, Wilber DJ, Yamane T (2017) *2017 HRS/EHRA/ECAS/APHRS/SOLAECE expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation*. Heart Rhythm. 2017 Oct;14(10):e275-e444.

Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, Van Gelder IC, Al-Attar N, Hindricks G, Prendergast B, Heidbuchel H, Alfieri O, Angelini A, Atar D, Colonna P, De Caterina R, De Sutter J, Goette A, Gorenek B, Heldal M, Hohloser SH, Kolh P, Le Heuzey JY, Ponikowski P, Rutten FH; ESC Committee for Practice Guidelines (2010) *Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC)*. Europace. 2010 Oct;12(10):1360-420.

Chaudhry SR, Hafez A, Rezai Jahromi B, Kinfe TM, Lamprecht A, Niemelä M, Muhammad S (2018) *Role of Damage Associated Molecular Pattern Molecules (DAMPs) in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage (aSAH)*. Int J Mol Sci. 2018 Jul 13;19(7).

Choi EK, Shen MJ, Han S, Kim D, Hwang S, Sayfo S, Piccirillo G, Frick K, Fishbein MC, Hwang C, Lin SF, Chen PS (2010) *Intrinsic cardiac nerve activity and paroxysmal atrial tachyarrhythmia in ambulatory dogs*. Circulation. 2010 Jun 22;121(24):2615-23.

Chun KR, Schmidt B, Metzner A, Tilz R, Zerm T, Köster I, Fürnkranz A, Koektuerk B, Konstantinidou M, Antz M, Ouyang F, Kuck KH (2009) *The 'single big cryoballoon' technique for acute pulmonary vein isolation in patients with paroxysmal atrial fibrillation: a prospective observational single centre study*. Eur Heart J. 2009 Mar;30(6):699-709.

Corradi D, Callegari S, Gelsomino S, Lorusso R, Macchi E (2013) *Morphology and pathophysiology of target anatomical sites for ablation procedures in patients with atrial fibrillation: part II: pulmonary veins, caval veins, ganglionated plexi, and ligament of Marshall*. Int J Cardiol. 2013 Oct 3;168(3):1769-78.

Deneke T, Shin DI, Balta O, Bünz K, Fassbender F, Mügge A, Anders H, Horlitz M, Päsler M, Karthikapallil S, Arentz T, Beyer D, Bansmann M (2011) *Postablation asymptomatic cerebral lesions: long-term follow-up using magnetic resonance imaging*. Heart Rhythm. 2011 Nov;8(11):1705-11.

Deneke T, Jais P, Scaglione M, Schmitt R, Di Biase L, Christopoulos G, Schade A, Mügge A, Bansmann M, Nentwich K, Müller P, Krug J, Roos M, Halbfass P, Natale A, Gaita F, Haines D (2015) *Silent cerebral events/lesions related to atrial fibrillation ablation: a clinical review*. J Cardiovasc Electrophysiol. 2015 Apr;26(4):455-463.

Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I (2009) *S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal*. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun;1793(6):1008-22.

Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL (2013) *Functions of S100 proteins*. *Curr Mol Med*. 2013 Jan;13(1):24-57.

Driessen AHG, Berger WR, Krul SPJ, van den Berg NWE, Neefs J, Piersma FR, Chan Pin Yin DRPP, de Jong JSSG, van Boven WP, de Groot JR (2016) *Ganglion Plexus Ablation in Advanced Atrial Fibrillation: The AFACT Study*. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Sep 13;68(11):1155-1165.

Fischer B, Jaïs P, Shah D, Chouairi S, Haïssaguerre M, Garrigues S, Poquet F, Gencel L, Clémenty J, Marcus FI (1996) *Radiofrequency catheter ablation of common atrial flutter in 200 patients*. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1996 Dec;7(12):1225-33.

Gerlach R, Demel G, König HG, Gross U, Prehn JH, Raabe A, Seifert V, Kögel D (2006) *Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress*. *Neuroscience*. 2006 Sep 15;141(4):1697-701.

Gonçalves CA, Leite MC, Guerra MC (2010) *Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue*. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2010; 2010: 790431.

Gunawardene M , Hoffmann B , Schaeffer B , Chung D , Moser J , Akbulak RÖ , Jularic M , Eickholt C , Nuehrich J , Meyer C , Willems S (2018) *Influence of energy source on early atrial fibrillation recurrences: a comparison of cryoballoon vs. radiofrequency current energy ablation with the endpoint of unexcitability in pulmonary vein isolation*. *Europace* 2018 Jan 1;20(1):43-49.

Haim M, Hoshen M, Reges O, Rabi Y, Balicer R, Leibowitz M (2015) *Prospective national study of the prevalence, incidence, management and outcome of a large contemporary cohort of patients with incident non-valvular atrial fibrillation*. *J Am Heart Assoc*. 2015 Jan 21;4(1):e001486.

Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le Mouroux A, Le Métayer P, Clémenty J (1998) *Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins*. *N Engl J Med*. 1998 Sep 3;339(10):659-66.

Haïssaguerre M, Shah DC, Jaïs P, Hocini M, Yamane T, Deisenhofer I, Garrigue S, Clémenty J (2000) *Mapping-guided ablation of pulmonary veins to cure atrial fibrillation*. *Am J Cardiol*. 2000 Nov 2;86(9A):9K-19K.

Haeusler KG, Koch L, Herm J, Kopp UA, Heuschmann PU, Endres M, Schultheiss HP, Schirdewan A, Fiebach JB (2013) *3 Tesla MRI-detected brain lesions after pulmonary vein isolation for atrial fibrillation: results of the MACPAF study*. J Cardiovasc Electrophysiol. 2013 Jan;24(1):14-21.

Heeringa J, van der Kuip DA, Hofman A, Kors JA, van Herpen G, Stricker BH, Stijnen T, Lip GY, Witteman JC (2006) *Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study*. Eur Heart J. 2006 Apr;27(8):949-53.

Horváth A, Lemoine MD, Löser A, Mannhardt I, Flenner F, Uzun AU, Neuber C, Breckwoldt K, Hansen A, Girdauskas E, Reichenspurner H, Willems S, Jost N, Wettwer E, Eschenhagen T, Christ T. (2018) *Low Resting Membrane Potential and Low Inward Rectifier Potassium Currents Are Not Inherent Features of hiPSC-Derived Cardiomyocytes*. Stem Cell Reports. 2018 Mar 13;10(3):822-833. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.01.012. Epub 2018 Feb 8. PMID: 29429959; PMCID: PMC5918194.

Hsieh MH, Chiou CW, Wen ZC, Wu CH, Tai CT, Tsai CF, Ding YA, Chang MS, Chen SA (1999) *Alterations of heart rate variability after radiofrequency catheter ablation of focal atrial fibrillation originating from pulmonary veins*. Circulation. 1999 Nov 30;100(22):2237-43.

Jungen C, Scherschel K, Eickholt C, Kuklik P, Klatt N, Bork N, Salzbrunn T, Alken F, Angendohr S, Klene C, Mester J, Klöcker N, Veldkamp MW, Schumacher U, Willems S, Nikolaev VO, Meyer C (2017) *Disruption of cardiac cholinergic neurons enhances susceptibility to ventricular arrhythmias*. Nat Commun. 2017 Jan 27;8:14155.

Haglid KG, Yang Q, Hamberger A, Bergman S, Widerberg A, Danielsen N (1997) *S-100beta stimulates neurite outgrowth in the rat sciatic nerve grafted with acellular muscle transplants*. Brain Res. 1997 Apr 11;753(2):196-201.

Hsieh MH, Chiou CW, Wen ZC, Wu CH, Tai CT, Tsai CF, Ding YA, Chang MS, Chen SA (1999) *Alterations of heart rate variability after radiofrequency catheter ablation of focal atrial fibrillation originating from pulmonary veins*. Circulation. 1999 Nov 30;100(22):2237-43.

Kangavari S, Oh YS, Zhou S, Youn HJ, Lee MY, Jung WS, Rho TH, Hong SJ, Kar S, Kerwin WF, Swerdlow CD, Gang ES, Gallik DM, Goodman JS, Chen YD, Chen PS (2006) *Radiofrequency catheter ablation and nerve growth factor concentration in humans*. Heart Rhythm. 2006 Oct;3(10):1150-5.

Katritsis D, Giazitzoglou E, Sougiannis D, Vouridis E, Po SS (2009) *Complex fractionated atrial electrograms at anatomic sites of ganglionated plexi in atrial fibrillation*. Europace. 2009 Mar;11(3):308-15.

- Katritsis D, Sougiannis D, Batsikas K, Giazitzoglou E, Mersinias J, Katritsis G, Po SS (2011) *Autonomic modulation of complex fractionated atrial electrograms in patients with paroxysmal atrial fibrillation*. J Interv Card Electrophysiol. 2011 Sep;31(3):217-23.
- Katritsis DG, Pokushalov E, Romanov A, Giazitzoglou E, Siontis GC, Po SS, Camm AJ, Ioannidis JP (2013) *Autonomic denervation added to pulmonary vein isolation for paroxysmal atrial fibrillation: a randomized clinical trial*. J Am Coll Cardiol. 2013 Dec 17;62(24):2318-25.
- Kligman D, Marshak DR (1985) *Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Oct;82(20):7136-9.
- Kottkamp H, Hindricks G, Eitel C, Müller K, Siedziako A, Koch J, Anastasiou-Nana M, Varounis C, Arya A, Sommer P, Gaspar T, Piorkowski C, Dagres N (2011) *Deep sedation for catheter ablation of atrial fibrillation: a prospective study in 650 consecutive patients*. J Cardiovasc Electrophysiol. 2011 Dec;22(12):1339-43.
- Koyama T, Sekiguchi Y, Tada H, Arimoto T, Yamasaki H, Kuroki K, Machino T, Tajiri K, Zhu XD, Kanemoto M, Sugiyasu A, Kuga K, Aonuma K (2009) *Comparison of characteristics and significance of immediate versus early versus no recurrence of atrial fibrillation after catheter ablation*. Am J Cardiol. 2009 May 1;103(9):1249-54.
- Kuck KH, Brugada J, Fürnkranz A, Metzner A, Ouyang F, Chun KR, Elvan A, Arentz T, Bestehorn K, Pocock SJ, Albenque JP, Tondo C, FIRE AND ICE Investigators (2016) *Cryoballoon or Radiofrequency Ablation for Paroxysmal Atrial Fibrillation*. N Engl J Med. 2016 Jun 9;374(23):2235-45.
- Li A, Kuga K, Suzuki A, Endo M, Niho B, Enomoto M, Kanemoto M, Yamaguchi I (2002) *Effects of linear ablation at the isthmus between the tricuspid annulus and inferior vena cava for atrial flutter on autonomic nervous activity: analysis of heart rate variability*. Circ J. 2002 Jan;66(1):53-7.
- Lim HS, Schultz C, Dang J, Alasady M, Lau DH, Brooks AG, Wong CX, Roberts-Thomson KC, Young GD, Worthley MI, Sanders P, Willoughby SR (2014) *Time course of inflammation, myocardial injury, and prothrombotic response after radiofrequency catheter ablation for atrial fibrillation*. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2014 Feb;7(1):83-9.
- Liu Z, Jin YQ, Chen L, Wang Y, Yang X, Cheng J, Wu W, Qi Z, Shen Z (2015) *Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro*. PLoS One. 2015 Apr 10;10(4):e0123278.

Lu Z, Scherlag BJ, Lin J, Yu L, Guo JH, Niu G, Jackman WM, Lazzara R, Jiang H, Po SS (2009) *Autonomic mechanism for initiation of rapid firing from atria and pulmonary veins: evidence by ablation of ganglionated plexi*. *Cardiovasc Res*. 2009 Nov 1;84(2):245-52.

Marron K, Wharton J, Sheppard MN, Fagan D, Royston D, Kuhn DM, de Leval MR, Whitehead BF, Anderson RH, Polak JM (1995) *Distribution, morphology, and neurochemistry of endocardial and epicardial nerve terminal arborizations in the human heart*. *Circulation*. 1995 Oct 15;92(8):2343-51.

Mao J, Yin X, Zhang Y, Yan Q, Dong J, Ma C, Liu X (2014) *Ablation of epicardial ganglionated plexi increases atrial vulnerability to arrhythmias in dogs*. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2014 Aug;7(4):711-7.

Marijon E, Le Heuzey JY, Connolly S, Yang S, Pogue J, Brueckmann M, Eikelboom J, Themeles E, Ezekowitz M, Wallentin L, Yusuf S; RE-LY Investigators (2013) *Causes of death and influencing factors in patients with atrial fibrillation: a competing-risk analysis from the randomized evaluation of long-term anticoagulant therapy study*. *Circulation*. 2013 Nov 12;128(20):2192-201.

Meyer C, Rana OR, Saygili E, Gemein C, Becker M, Nolte KW, Weis J, Schimpf T, Knackstedt C, Mischke K, Hoffmann R, Kelm M, Pauza D, Schauer P (2010) *Augmentation of left ventricular contractility by cardiac sympathetic neural stimulation*. *Circulation*. 2010 Mar 23;121(11):1286-94.

Monbailliu T, Goossens J, Hachimi-Idrissi S (2017) *Blood protein biomarkers as diagnostic tool for ischemic stroke: a systematic review*. *Biomark Med*. 2017 May;11(6):503-512.

Montano N, Cogliati C, Porta A, Pagani M, Malliani A, Narkiewicz K, Abboud FM, Birkett C, Somers VK (1998) *Central vagotonic effects of atropine modulate spectral oscillations of sympathetic nerve activity*. *Circulation*. 1998 Oct 6;98(14):1394-9.

Moore BW (1965) *A soluble protein characteristic of the nervous system*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1965 Jun 9;19(6):739-44.

Ohkubo K, Watanabe I, Okumura Y, Ashino S, Kofune M, Takagi Y, Yamada T, Kofune T, Hashimoto K, Shindo A, Sugimura H, Nakai T, Kunimoto S, Kasamaki Y, Hirayama A (2008) *Combined effect of pulmonary vein isolation and ablation of cardiac autonomic nerves for atrial fibrillation*. *Int Heart J*. 2008 Nov;49(6):661-70.

Okuyama Y, Pak HN, Miyauchi Y, Liu YB, Chou CC, Hayashi H, Fu KJ, Kerwin WF, Kar S, Hata C, Karagueuzian HS, Fishbein MC, Chen PS, Chen LS (2004) *Nerve sprouting induced by radiofrequency catheter ablation in dogs*. *Heart Rhythm*. 2004 Dec;1(6):712-7.

- Pappone C, Santinelli V, Manguso F, Vicedomini G, Gugliotta F, Augello G, Mazzone P, Tortoriello V, Landoni G, Zangrillo A, Lang C, Tomita T, Mesas C, Mastella E, Alfieri O (2004) *Pulmonary vein denervation enhances long-term benefit after circumferential ablation for paroxysmal atrial fibrillation*. *Circulation*. 2004 Jan 27;109(3):327-34.
- Patterson E, Po SS, Scherlag BJ, Lazzara R (2005) *Triggered firing in pulmonary veins initiated by in vitro autonomic nerve stimulation*. *Heart Rhythm*. 2005 Jun;2(6):624-31.
- Pauza DH, Skripka V, Pauziene N, Stropus R (2000) *Morphology, distribution, and variability of the epicardiac neural ganglionated subplexuses in the human heart*. *Anat Rec*. 2000 Aug 1;259(4):353-82.
- Petraitiene V, Pauza DH, Benetis R (2014) *Distribution of adrenergic and cholinergic nerve fibres within intrinsic nerves at the level of the human heart hilum*. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2014 Jun;45(6):1097-105.
- Sbai O, Devi TS, Melone MA, Feron F, Khrestchatisky M, Singh LP, Perrone L (2010) *RAGE-TXNIP axis is required for S100B-promoted Schwann cell migration, fibronectin expression and cytokine secretion*. *J Cell Sci*. 2010 Dec 15;123(Pt 24):4332-9.
- Scaglione M, Blandino A, Raimondo C, Caponi D, Di Donna P, Toso E, Ebrille E, Cesarani F, Ferrarese E, Gaita F (2012) *Impact of ablation catheter irrigation design on silent cerebral embolism after radiofrequency catheter ablation of atrial fibrillation: results from a pilot study*. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2012 Aug;23(8):801-5.
- Scherschel K, Hedenus K, Jungen C, Lemoine MD, Rübsamen N, Veldkamp MW, Klatt N, Lindner D, Westermann D, Casini S, Kuklik P, Eickholt C, Klöcker N, Shivkumar K, Christ T, Zeller T, Willems S, Meyer C (2019) *Cardiac glial cells release neurotrophic S100B upon catheter-based treatment of atrial fibrillation*. *Sci Transl Med*. 2019 May 22;11(493).
- Schnabel RB, Yin X, Gona P, Larson MG, Beiser AS, McManus DD, Newton-Cheh C, Lubitz SA, Magnani JW, Ellinor PT, Seshadri S, Wolf PA, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D (2015) *50 year trends in atrial fibrillation prevalence, incidence, risk factors, and mortality in the Framingham Heart Study: a cohort study*. *Lancet*. 2015 Jul 11;386(9989):154-62.
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K (2009) *Prometheus LernAtlas - Innere Organe, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage*, Thieme.
- Shen MJ, Choi EK, Tan AY, Lin SF, Fishbein MC, Chen LS, Chen PS (2011) *Neural mechanisms of atrial arrhythmias*. *Nat Rev Cardiol*. 2011 Sep 27;9(1):30-9.

- Sorci G, Bianchi R, Riuzzi F, Tubaro C, Arcuri C, Giambanco I, Donato R (2010) *S100B Protein, A Damage-Associated Molecular Pattern Protein in the Brain and Heart, and Beyond*. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2010;2010. pii: 656481.
- Sramko M, Peichl P, Wichterle D, Tintera J, Maxian R, Weichet J, Knesplova L, Franekova J, Pasnisinova S, Kautzner J (2014) *A novel biomarker-based approach for the detection of asymptomatic brain injury during catheter ablation of atrial fibrillation*. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2014 Apr;25(4):349-354.
- Stavrakis S, Nakagawa H, Po SS, Scherlag BJ, Lazzara R, Jackman WM (2015) *The role of the autonomic ganglia in atrial fibrillation*. *JACC Clin Electrophysiol*. 2015 Mar-Apr;1(1-2):1-13.
- Sun X, Lindsay J, Monsein LH, Hill PC, Corso PJ (2012) *Silent brain injury after cardiac surgery: a review: cognitive dysfunction and magnetic resonance imaging diffusion-weighted imaging findings*. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Aug 28;60(9):791-7.
- Tan AY, Li H, Wachsmann-Hogiu S, Chen LS, Chen PS, Fishbein MC (2006) *Autonomic innervation and segmental muscular disconnections at the human pulmonary vein-atrial junction: implications for catheter ablation of atrial-pulmonary vein junction*. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Jul 4;48(1):132-43.
- Tarvainen MP, Niskanen JP, Lipponen JA, Ranta-Aho PO, Karjalainen PA (2014) *Kubios HRV-heart rate variability analysis software*. *Comput Methods Programs Biomed*. 2014;113(1):210-20.
- Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996) *Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use*. *Circulation*. 1996 Mar 1;93(5):1043-65.
- Tat RM, Golea A, Vesa ŞC, Ionescu D (2019) *Determination of Cut-off Serum Values for Resistin and S100B Protein in Patients Who Survived a Cardiac Arrest*. *Crit Care Med (Targu Mures)*. 2019 Aug 9;5(3):97-102.
- Thelin EP, Nelson DW, Bellander BM (2017) *A review of the clinical utility of serum S100B protein levels in the assessment of traumatic brain injury*. *Acta Neurochir (Wien)*. 2017 Feb;159(2):209-225.
- Tsuboi M, Furukawa Y, Nakajima K, Kurogouchi F, Chiba S (2000) *Inotropic, chronotropic, and dromotropic effects mediated via parasympathetic ganglia in the dog heart*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Sep;279(3):H1201-7.

Undén J, Ingebrigtsen T, Romner B; Scandinavian Neurotrauma Committee (SNC) (2013) *Scandinavian guidelines for initial management of minimal, mild and moderate head injuries in adults: an evidence and consensus-based update*. BMC Med. 2013 Feb 25;11:50.

Venteclef N, Guglielmi V, Balse E, Gaborit B, Cotillard A, Atassi F, Amour J, Leprince P, Dutour A, Clément K, Hatem SN (2015) *Human epicardial adipose tissue induces fibrosis of the atrial myocardium through the secretion of adipo-fibrokinases*. Eur Heart J. 2015 Apr 1;36(13):795-805a.

Von Euler US, Hillarp NA (1956) *Evidence for the presence of noradrenaline in submicroscopic structures of adrenergic axons*. Nature. 1956 Jan 7;177(4497):44-5.

Von Homeyer P, Schwinn DA (2011) *Pharmacogenomics of  $\beta$ -adrenergic receptor physiology and response to  $\beta$ -blockade*. Anesth Analg. 2011 Dec;113(6):1305-18.

Wang K, Chang D, Chu Z, Yang Y, Gao L, Zhang S, Xia Y, Dong Y, Yin X, Cong P, Jia J (2013) *Denervation as a common mechanism underlying different pulmonary vein isolation strategies for paroxysmal atrial fibrillation: evidenced by heart rate variability after ablation*. ScientificWorldJournal. 2013 Aug 24;2013:569564.

Winningham-Major F, Staecker JL, Barger SW, Coats S, Van Eldik LJ (1989) *Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues*. J Cell Biol. 1989 Dec;109(6 Pt 1):3063-71.

Willems S, Meyer C, de Bono J, Brandes A, Eckardt L, Elvan A, van Gelder I, Goette A, Gulizia M, Haegeli L, Heidbuchel H, Haeusler KG, Kautzner J, Mont L, Ng GA, Szumowski L, Themistoclakis S, Wegscheider K, Kirchhof P (2019) *Cabins, castles, and constant hearts: rhythm control therapy in patients with atrial fibrillation*. Eur Heart J. 2019 Dec 7;40(46):3793-3799c.

Wissner E, Metzner A, Neuzil P, Petru J, Skoda J, Sediva L, Kivelitz D, Wohlmuth P, Weichet J, Schoonderwoerd B, Rausch P, Bardyszewski A, Tilz RR, Ouyang F, Reddy VY, Kuck KH (2014) *Asymptomatic brain lesions following laserballoon-based pulmonary vein isolation*. Europace. 2014 Feb;16(2):214-9.

Zhang Y, Wang Z, Zhang Y, Wang W, Wang J, Gao M, Hou Y (2012) *Efficacy of cardiac autonomic denervation for atrial fibrillation: a meta-analysis*. J Cardiovasc Electrophysiol. 2012 Jun;23(6):592-600.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ACT	<i>activated clotting time</i>
AINS	autonomes intrakardiales Nervensystem
AP	Aktionspotential
CMAP	<i>compound motor action potential</i>
CTI	cavotrikupidaler Isthmus
DAMP	<i>damage-associated molecular patterns</i> Protein
EPU	elektrophysiologische Untersuchung
GP	<i>ganglionäre Plexi</i>
HF	Hochfrequenzstrom
HR	Herzfrequenz ( <i>heart rate</i> )
HRV	Herzfrequenzvariabilität
hsTnI	hochsensitives Troponin I
ICNS	cardiac autonomic nervous system
PNS	peripheres Nervensystem
PV	Pulmonalvenen
PVI	Pulmonalvenenisolation
RAGE	<i>receptor of advanced glycosylation end products</i>
SCL	<i>silent cerebral lesions</i>
SPM	Schläge pro Minute
VHF	Vorhofflimmern

## **8. Erklärung des Eigenanteils**

Die Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Kardiologie des Universitäres Herz- und Gefäßzentrum UKE Hamburg in der Sektion für Interventionelle Elektrophysiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Christian Meyer durchgeführt.

Im Rahmen der Vorbereitung und genauen Themenfindung führte ich eine umfassende Literaturrecherche in Anlehnung an den Projektentwurf durch. Das Sammeln der Plasmaproben vor und nach Ablation und die HRV-Messungen an Patienten führte ich eigenverantwortlich durch. Darüber hinaus habe ich eigenständig die Erhebung der Patienten- und Ablationsdaten sowie die Erhebung des Follow-up durchgeführt. Diese Daten pflegte ich selbständig in eine anonymisierte Datenbank ein. Die Datenauswertung und Erstellung des Publikationsmanuskriptes erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. Katharina M. Scherschel, mit der eine geteilte Erstautorenschaft besteht.

K. Scherschel entwarf und führte die Experimente durch (Histologie, ELISA und Zellkultur) und schrieb das Manuskript. Außerdem war sie an der Auswertung der Daten beteiligt.

Christiane Jungen führte die Langendorff-Experimente durch.

Marc D. Lemoine und Torsten Christ führten die AP-Messungen im menschlichen Vorhofgewebe durch.

Nicole Rübsamen war hauptverantwortlich für die statistische Auswertung.

Marieke W. Veldkamp und Simona Casini führten AP-Messungen in intrakardialen Neuronen durch.

Niklas Klatt, Christian Eickholt, Christian Meyer und Stephan Willems führten die PVI, EPU und CTI-Ablationen durch und diskutierten das Manuskript kritisch.

Diana Lindner, Dirk Westermann, Pawel Kuklik, Nikolaj Klöcker, Kalyanam Shivkumar und Stephan Willems waren an der konzeptionellen Beratung und kritischen Diskussion des Manuskripts beteiligt.

Tanja Zeller führte die Messungen von hsTnI durch und war an der konzeptionellen Beratung beteiligt.

Christian Meyer konzipierte und überwachte die Studie und schrieb das Manuskript.

Alle Autoren diskutierten die Ergebnisse kritisch und überprüften und das Manuskript vor der Einreichung.

## 9. Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christian Meyer dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit hatte, in seiner Abteilung diese tolle Arbeit in Form einer Publikationsdissertation zu verwirklichen. Er war mir stets ein wichtiger Ansprechpartner, der mir sehr viel Geduld entgegenbrachte und meine Dissertation durch seine Ideen, seine Anregungen und seine konstruktive Kritik bereicherte.

Dr. rer. nat. Katharina M. Scherschel danke ich für die erstklassige in allen Phasen dieser Arbeit fortwährende Betreuung, persönliche Unterstützung und große Geduld bei der Fertigstellung meiner Dissertation. Sie hat mich in besonderem Maße begleitet und hatte immer ein offenes Ohr und Mut machende Ratschläge für mich. Katy war für mich die Mentorin und Betreuerin, die sich jeder Doktorand wünscht - auch als Freundin.

Ich bedanke mich bei allen Co-Autoren für die Zusammenarbeit bei der Erstellung dieses Papers. Hartwig Wieboldt danke ich für die technische Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Mein Dank gilt allen in der EPU tätigen Pflegekräften für die tatkräftige Unterstützung beim Abnehmen der Blutproben.

Ich danke meinen Freunden und meiner Familie, v.a. meiner Mutter, die mich stetig liebevoll unterstützen und mir Mut zugesprochen haben. Meine Mutter ist einzigartig und für mich die beste Mama der Welt.

Mein besonderer Dank gilt Patrick für seine Liebe und Geduld sowie für das Ertragen meiner angespannten und gestressten Launen. Es gibt nur wenige Menschen, die einen bedingungslos lieben und ich habe das Glück einen von ihnen in ihm gefunden zu haben.

Zuletzt bedanke ich mich herzlich bei allen Patienten für ihre Teilnahme und Erlaubnis, sich von mir Blut abnehmen zu lassen. Ohne ihre Mithilfe wäre dieses tolle Paper nicht möglich gewesen.

## **10. Lebenslauf**

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

## **11. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....