Unterschiede der Platin-DNA-Adduktbildung bei Cisplatin und Carboplatin

J. P. Thomas¹, J. Thomale², B. Liedert², J. Lautermann¹

¹ Hals-Nasen-Ohren-Klinik, Universität Duisburg-Essen,

² Institut für Zellbiologie (Tumorforschung), Universität Duisburg-Essen

Einleitung

Der zytotoxische, antitumorale Effekt der Chemotherapeutika Cisplatin (cis-Diammindichloroplatin [II]) und Carboplatin (cis-Diammincarboxylatoplatin [II]) wird jeweils auf die Bildung von Platin(Pt)-DNA Intra- und Interstrang-Addukten zurückgeführt. Diese Addukte können durch Hemmung der Replikation und Transkription apoptotische Prozesse der betroffenen Tumorzellen auslösen. Die Vermittlung der unerwünschten Nebenwirkungen wird bislang hingegen vornehmlich auf die Bildung freier Sauerstoffradikale zurückgeführt. Allerdings unterscheidet sich das Nebenwirkungsspektrum der beiden Substanzen deutlich. Während eine Behandlung mit Cisplatin typischerweise Ototoxizität hervorrufen kann, ist diese unerwünschte Wirkung bei Carboplatin deutlich seltener anzutreffen. Zur Untersuchung inwieweit Pt-DNA-Addukte im Innenohr eine Rolle bei der Vermittlung der Cisplatin-Ototoxizität spielen könnten, wurde die Pt-DNA-Adduktbildung bei Cisplatin und Carboplatin untersucht.

Ergebnisse

Bei der Auswertung wurden die Zellen der Stria vascularis sowie die Zellen der Reissner'schen Membran bei den Kontrolltieren sowie zu den Zeitpunkten 8 h, 24 h und 48 h nach Cisplatin- bzw. Carboplatin-Gabe untersucht. Nach Cisplatin-Gabe zeigten sich deutliche Zelltyp-spezifische Unterschiede in der Anreicherung der Pt-DNA-Addukte mit einer im Vergleich zu den übrigen Zellen etwa dreifach höheren Anreicherung in den Marginalzellen. Die übrigen cochleären Zellen unterschieden sich untereinander nicht signifikant. Bei der Untersuchung der Innenohrzellen der mit Carboplatin behandelten Tiere zeigte sich hingegen keine erhöhte Fluoreszenzintensität in den Marginalzellen. Bei allen hier gemessenen Zellen entsprach der Pt-DNA-Addukt-Gehalt dem der Basal- und Intermediärzellen bzw. den Zellen der Reissner'schen Membran nach Cisplatin-Gabe (Abb. 1 und 2).

Abb. 2 Pt-DNA-Konzentration in cochleären Zellen (Mittelwerte $\pm$ SE von 20-50 Zellen)

Schlussfolgerungen

Bisherige Untersuchungen konnten nachweisen, dass neben der Schädigung der äußeren Haarzellen durch chronische Gabe von Cisplatin, eine einmalige hochdosierte Cisplatin-Applikation ausgeprägte ultrastrukturelle Schädigungen der Marginalzellen verursacht [1,2]. Die hier nachgewiesene Anreicherung von Pt-DNA-Addukten in den Marginalzellen nach Applikation von Cisplatin im Vergleich mit nicht erhöhten Pt-DNA-Addukt-Konzentrationen in diesen Zellen nach Carboplatin-Gabe unterstützt die Hypothese, dass die Bildung dieser Pt-DNA-Addukte in Marginalzellen bei der Vermittlung der Ototoxizität eine relevante Rolle spielt. Inwieweit morphologische und funktionelle Schädigungen der Marginalzellen über eine Veränderung des endolymphatischen Potentials eine permanente Hörminderung hervorrufen können, bedarf weiterer Untersuchungen.

Literatur

1. Tange RA, Vuzevski VD Changes in the stria vascularis of the guinea pig due to cis-platinum. Arch Otorhinolaryngol. 1984;239(1):41-7
2. Meech RP et al. A semiquantitative analysis of the effects of cisplatin on the rat stria vascularis. Hear Res. 1998;124(1-2):44-59

Unterstützt durch Fördermittel des IFORES-Programms Essen.

Material und Methoden

Eine Gruppe adulter Meerschweinchen (n=9) erhielt eine einmalige intraperitoneale Injektion von Cisplatin (12,5 mg/kg KG), einer zweiten Gruppe (n=6) wurde eine antitumorale äquivalente Dosis von 80 mg/kg KG Carboplatin intraperitoneal appliziert. Die Tiere wurden nach 8 h, 24 h sowie 48 h getötet und die Felsenbeine präpariert. Nach Perfusion der Cochleae mit dem Fixans Carnoy und anschließender Entkalkung wurden Kryoschnitte (10µm) angefertigt. Zur Freilegung der antigenen Strukturen wurden die Schnitte einer Denaturierung mit NaOH sowie einer anschließenden Proteolyse mit Proteinase K und Pepsin unterzogen. Die Präparate wurden mit dem monoklonalen Antikörper „R-C 18“ (spezifisch für das Haupt-DNA-Addukt Pt-[Guanin-Guanin]) in einem Sandwich-Verfahren fluoreszenzmarkiert und die DNA mit DAPI gegengefärbt. Für jeden Zellkern wurden die Fluoreszenzparameter quantitativ vermessen und die Adduktmenge auf den jeweiligen DNA-Gehalt normiert.

Abb. 1 Nachweis von DNA und Platin-DNA-Addukten im Innenohr

8 h nach Cisplatin i. p.
DAPI

8 h nach Cisplatin i. p.
Immunfluoreszenz

8 h nach Carboplatin i. p.
DAPI

8 h nach Carboplatin i. p.
Immunfluoreszenz

Dr. Jan Peter Thomas
HNO-Universitätsklinik Essen
Hufelandstr. 55
45122 Essen
jan.thomas@uni-essen.de