

Samenvatting

De klinische toepassing van cisplatine wordt beperkt door een aantal schadelijke effecten, waaronder nefrotoxiciteit, neurotoxiciteit en ototoxiciteit de meest ernstige zijn. In **Hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven van de farmacokinetische en cytotoxische eigenschappen van cisplatine. Daarnaast worden de ototoxische bijwerkingen van dit cytostaticum alsmede de mogelijke bescherming hier tegen besproken.

Behandeling met cisplatine kan resulteren in perceptief gehoorverlies, dat wordt gekarakteriseerd door een dosis-afhankelijk, meestal permanent verlies van de hoge tonen. Op dit moment is nog onbekend wat het primaire aangrijpingspunt is van cisplatine in de cochlea en welke (sub)cellulaire mechanismen betrokken zijn bij het ontstaan van dit gehoorverlies. Cisplatine kan in principe op drie verschillende niveau's aangrijpen in de cochlea, namelijk: het orgaan van Corti, de stria vascularis en de gehoorzenuw. De meest opvallende morfologische veranderingen in de cochlea na behandeling met cisplatine treden op in het orgaan van Corti. Deze veranderingen bestaan uit een gedeeltelijk of compleet verlies van de buitenste haarcellen en een opvulling van de ruimte van Nuel en de tunnel van Corti door steuncellen (o.a. cellen van Deiters). Naast de schadelijke effecten op het orgaan van Corti zijn er ook aanwijzingen voor een effect op de stria vascularis. Histologische afwijkingen in de stria vascularis bestaan uit zwelling en vacuolisatie van de marginale cellen alsmede het optreden van bolvormige uitstulpingen van deze cellen in de scala media ("blebs"). Een duidelijk effect op de gehoorzenuw is nog niet goed beschreven; er is nog geen histologisch bewijs dat behandeling met cisplatine resulteert in atrofie of verlies van de cellen in het spirale ganglion.

Vele pogingen zijn ondernomen om de ototoxische bijwerkingen, die kunnen optreden na behandeling met cisplatine, te reduceren door het simultaan toedienen van otoprotectieve agentia. Tot deze agentia behoren ook de melanocortinen, van ACTH-afgeleide neuropeptiden die neuroprotectieve en neurotrofische eigenschappen bezitten. Onlangs is aangetoond dat het ACTH₍₄₋₉₎ analogon ORG 2766 een otoprotectieve werking heeft. Het onderliggende mechanisme van deze beschermende werking is op dit moment nog niet duidelijk, maar men vermoedt dat dit neuropeptide een intrinsiek herstelmechanisme bevordert.

Het doel van dit proefschrift was om het ototoxisch effect van cisplatine nader histologisch te bestuderen. Onderzocht werden: (1) de dosis-afhankelijke effecten van cisplatine op diverse cochleaire weefsels; (2) het "post-treatment" effect van cisplatine op de cochlea volgend op diverse overlevingstijden na

stopzetten van de behandeling, zowel op licht- als elektronenmicroscopisch niveau; en (3) de mogelijke bescherming van cochleaire weefsels door ORG 2766 na behandeling met cisplatine.

DOSIS-AFHANKELIJK EFFECT VAN CISPLATINE IN DE COCHLEA VAN DE ALBINO CAVIA

Het is moeilijk om een duidelijk en betrouwbaar beeld van de dosis-effect relatie van cisplatine op de cochlea te verkrijgen, ondanks de grote hoeveelheid publicaties die verschenen zijn met betrekking tot de ototoxiciteit van cisplatine, met name door de grote verscheidenheid aan essentiële parameters, zoals proefdiersoort, dosis, manier van toedienen, doseringsschema, etc. Daarom hebben wij een studie uitgevoerd om onder gecontroleerde omstandigheden de dosis-effect relatie van cisplatine ototoxiciteit te onderzoeken (**Hoofdstuk 2**). Albino cavia's werden behandeld met cisplatine (dagelijkse dosis van 0,7, 1,0, 1,25, 1,5 of 2,0 mg/kg) gedurende acht opeenvolgende dagen. Elektrocochleografie werd op de tiende dag verricht, waarna de cochleas werden verwijderd en opgewerkt voor verdere histologische beoordeling. De elektrofysiologische resultaten lieten een evidente en scherpe overgang zien van bijna géén ototoxisch effect tot een duidelijk ototoxisch effect tussen een dagelijkse dosis van 1,25 en 1,5 mg/kg (Stengs et al., 1998a). Buitenste haarcel-tellingen correspondeerden met de elektrofysiologische resultaten. Bij dagelijkse doses van 0,7, 1,0 en 1,25 mg/kg werden geen statistisch significante verliezen van buitenste haarcellen geconstateerd, terwijl bij dagelijkse doses van 1,5 en 2,0 mg/kg verliezen van buitenste haarcellen in de basale windingen van de cochlea werden gevonden van respectievelijk 60% en 65%. Morfologische veranderingen in de stria vascularis waren alléén aanwezig in de cochlea's van dieren behandeld met doses van 1,0, 1,25 en 1,5 mg/kg/dag. Cochlea's van dieren behandeld met een dagelijkse dosis van 2,0 mg/kg vertoonden een toename in het volume van de scala media ("endolymfatische hydrops"). Deze studie toont aan dat toediening van cisplatine in een dagelijkse dosering van 1,5 mg/kg gedurende acht opeenvolgende dagen, een geschikt protocol is om de effecten van beschermende middelen en eventueel optreden van herstel van buitenste haarcellen te bestuderen.

HERSTEL VAN BUITENSTE HAARCELLEN NA STOPZETTEN VAN BEHANDELING MET CISPLATINE IN DE COCHLEA VAN DE ALBINO CAVIA?

Over het beloop van het gehoorverlies na stopzetten van behandeling met cisplatine is relatief weinig bekend. Een enkele maal wordt herstel van het

gehoor beschreven, zowel bij dieren als bij mensen. Stengs et al. (1997) behandelden cavia's met cisplatine in een dosering van 1,5 mg/kg/dag gedurende 8 opeenvolgende dagen, waarna de cochleaire potentialen werden gemeten na verschillende tijdsintervallen, variërend van 1 dag tot 16 weken. Spontane verbetering van de haarcel-gerelateerde potentialen, cochleaire microfonie (CM) en sommatie- potentiaal (SP), werd geconstateerd vanaf twee weken na beëindiging van de behandeling. In **Hoofdstuk 3** hebben wij de cochlea's van deze dieren lichtmicroscopisch onderzocht. Eén dag na het beëindigen van de behandeling bedroeg het verlies van buitenste haarcellen in de basale windingen 60%. Na 1 week werd een verlies waargenomen dat vergelijkbaar is met dat na 1 dag. Na 4 weken was echter slechts een relatief klein verlies van buitenste haarcellen in de basale windingen aanwezig; dit verlies bedroeg slechts 15%. Een vergelijkbaar verlies werd gemeten na 8 weken. Na 16 weken nam het verlies toe tot 48%, maar dit was niet significant verschillend van dat na 8 weken. Deze histologische bevindingen komen overeen met de elektrofysiologische data van dezelfde dieren en suggereren dat buitenste haarcellen kunnen herstellen van door cisplatine geïnduceerde beschadiging, 1 tot 4 weken na stopzetten van de behandeling. Vooralsnog is het nog onduidelijk of het geconstateerde herstel een gevolg is van de vorming van nieuwe buitenste haarcellen of door herstel van gedeeltelijk beschadigde buitenste haarcellen, hoewel het laatste minder waarschijnlijk is.

BESCHERMING TEGEN CISPLATINE OTOTOXICITEIT IN DE ALBINO CAVIA

Diverse middelen die bekend staan om hun nefroprotectieve effect lijken ook de incidentie en ernst van door cisplatine geïnduceerde ototoxiciteit te reduceren. Hamers et al. (1994) en De Groot et al. (1997) onderzochten het mogelijk beschermende effect van gelijktijdige toediening van ORG 2766 op cisplatine ototoxiciteit in cavia's. Dieren werden behandeld met cisplatine in een dagelijkse dosis van 2,0 mg/kg gedurende 8 opeenvolgende dagen en met ORG2766 in een dagelijkse dosis van 75 µg/kg gedurende 9 dagen. Gelijktijdige toediening van cisplatine en ORG 2766 resulteerde in een bimodale distributie van zowel de elektrofysiologische als de histologische data (buitenste haarcel-tellingen). Deze tweedeling in de resultaten zou mogelijk pas kunnen optreden bij een bepaalde dosering van cisplatine. Wij onderzochten daarom of het beschermend effect van ORG 2766 verhoogd kon worden door de dagelijkse dosis van cisplatine te verlagen (**Hoofdstuk 4**). Dieren werden behandeld met dagelijkse intraperitoneale injecties met zowel 1,0 mg/kg als 1,5 mg/kg cisplatine gedurende 8 opeenvolgende dagen en 75 µg/kg ORG 2766 gedurende 9 dagen.

Behandeling met 1,5 mg/kg cisplatine gedurende 8 opeenvolgende dagen resulteerde in een aanzienlijk gemiddeld verlies van buitenste haarcellen. Dit verlies was significant lager na gelijktijdige toediening van ORG 2766. Gelijktijdige behandeling met ORG 2766 resulteerde niet in een verandering in het volume van de scala media. Deze resultaten zijn in overeenstemming met de elektrofysiologische data (Stengs et al., 1998b).

ULTRASTRUCTURELE EVALUATIE VAN COCHLEAIRE SCHADE DOOR CISPLATINE NA VERSCHILLENDE OVERLEVINGSTIJDEN IN DE ALBINO CAVIA

Eerdere resultaten suggereerden dat buitenste haarcellen kunnen herstellen na stopzetten van behandeling met cisplatine (Hoofdstuk 3). Tevens werden morfologische veranderingen in de cellen van het spirale ganglion (vacuolisatie) en de stria vascularis ("bleb"-vorming en vacuolisatie van de marginale cellen en atrofie van intermediaire cellen) waargenomen.

In **Hoofdstuk 5** hebben wij het effect van cisplatine op de ultrastructurele morfologie van het orgaan van Corti, de stria vascularis en het spirale ganglion verder onderzocht, gebruikmakend van de cochlea's die eerder lichtmicroscopisch onderzocht waren (Hoofdstuk 3). Ultrastructurele evaluatie bevestigde dat in cochleaire windingen met een totaal verlies van buitenste haarcellen op lichtmicroscopisch niveau, de haarcellen inderdaad afwezig waren en volledig waren vervangen door steuncellen. De mate van verlies, het aantal aangedane buitenste haarcellen en de ernst van de intracellulaire afwijkingen in de buitenste haarcellen na 1 dag, 1 week en 2 weken was aanzienlijk groter dan na 4 en 8 weken. De degeneratieve afwijkingen in de buitenste haarcellen vertoonden alle ultrastructurele aspecten die geassocieerd zijn met necrose. Morfologische aanwijzingen voor apoptose werden niet geconstateerd.

Veranderingen in de stria vascularis bestonden uit "bleb"-vorming van de apicale membraan van de marginale cellen en vacuolisatie van het cytoplasma. Atofie van de intermediaire cellen, te herkennen als heldere gebieden in lichtmicroscopische coupes bleek na ultrastructurele bestudering te wijten te zijn aan een toename van de intercellulaire ruimte, mogelijk ten gevolge van krimp van de intermediaire cellen en marginale cellen.

Ultrastructurele evaluatie van het spirale ganglion toonde aan dat de vacuolisatie die werd gezien in licht microscopische coupes, bestond uit zwelling van de mitochondriën.

Deze resultaten ondersteunen onze eerdere lichtmicroscopische bevindingen. Op grond van deze bevindingen kunnen vooralsnog geen conclusies getrokken worden aangaande de processen die betrokken zijn bij dit herstel.

ALGEMENE DISCUSSIE

In **Hoofdstuk 6** worden de reeds eerder gepubliceerde elektrofysiologische data met de huidige histologische resultaten geïntegreerd. Daarnaast worden suggesties gedaan voor verder onderzoek.

Referenties

- De Groot, J.C.M.J., Hamers, F.P.T., Gispén, W.H., Smoorenburg, G.F., 1997. Co-administration of the neurotrophic ACTH₍₄₋₉₎ analogue, ORG 2766, may reduce the cochleotoxic effects of cisplatin. *Hear. Res.* 106, 9-19.
- Hamers, F.P.T., Klis, S.F.L., Gispén, W.H., Smoorenburg, G.F., 1994. Application of a neuroprotective ACTH₍₄₋₉₎ analog to affect cisplatin ototoxicity: An electrocochleographic study in guinea pigs. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 251, 23-29.
- Stengs, C.H.M., Klis, S.F.L., Huizing, E.H., Smoorenburg, G.F., 1997. Cisplatin-induced ototoxicity. Electrophysiological evidence of spontaneous recovery in albino guinea pigs. *Hear. Res.* 111, 103-113.
- Stengs, C.H.M., Klis, S.F.L., Huizing, E.H., Smoorenburg, G.F., 1998a. Cisplatin ototoxicity. An electrophysiological dose-effect study in albino guinea pigs. *Hear. Res.* 124, 99-107.
- Stengs, C.H.M., Klis, S.F.L., Huizing, E.H., Smoorenburg, G.F., 1998b. Protective effect of an neurotrophic ACTH₍₄₋₉₎ analog on cisplatin ototoxicity in relation to the cisplatin dose: An electrocochleographic study in albino guinea pigs. *Hear. Res.* 124, 108-117.