

# Genetické pozadí ototoxicity cisplatin

## Genetic Background of Cisplatin Induced Ototoxicity

Jurajda M.<sup>1</sup>, Talach T.<sup>2</sup>, Kostřica R.<sup>2</sup>, Lakomý R.<sup>3</sup>, Kocák I.<sup>3</sup>, Cvanová M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Ústav patologické fyziologie, LF MU Brno

<sup>2</sup> Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, FN u sv. Anny v Brně

<sup>3</sup> Klinika komplexní onkologické péče, MOÚ Brno

<sup>4</sup> Institut biostatistiky a analýz, LF a PŘF MU Brno

### Souhrn

**Východiska:** Cisplatinou indukovaná ototoxicita je závažným nežádoucím účinkem tohoto široce používaného cytostatika. Ototoxicita vyvolaná cisplatinou vykazuje značnou interindividuální variabilitu, která by mohla mít genetický podklad. Několik prací z nedávné doby popisuje asociaci ototoxicity s alelickými variantami genů kódujících glutathion-S-transferázy. **Soubor pacientů a metody:** V naší studii jsme analyzovali 55 pacientů léčených cisplatinou, u kterých se nevyskytovalo poškození sluchu v předchorobí. Pacienti byli audiometricky vyšetřeni před terapií a následně před a po každém cyklu podání cisplatin. Genové polymorfizmy vybraných genů kódujících glutathion-S-transferázy byly stanoveny analýzou DNA izolované z periferní krve. **Výsledky:** V souboru námi vyšetřených pacientů jsme prokázali asociaci časného nástupu ototoxicity indukované cisplatinou s nepřítomností delece genu pro GSTT1 ( $p = 0,009$ ). U delece genu pro GSTM1 ani u jednonukleotidového polymorfizmu v genu pro GSTP1 (rs1695) jsme asociaci s ototoxicitou indukovanou cisplatinou neprokázali. **Závěr:** Ototoxicita indukovaná cisplatinou vykazuje časný nástup u pacientů, kteří nenesou deleci genu pro GSTT1.

### Klíčová slova

cisplatin – ototoxicita – rozdíly v počtu kopií úseků DNA – polymorfizmus jednoho nukleotidu

### Summary

**Background:** Cisplatin induced ototoxicity is a serious adverse effect of cisplatin therapy. Cisplatin induced ototoxicity shows significant interindividual variability. This variability is probably based on genetic background. Recent papers describe association of cisplatin ototoxicity with allelic variants of glutathion-S-transferase coding genes. **Patients and Methods:** We have analyzed 55 patients treated with cisplatin therapy without any previous hearing impairment. Audiometric examination was performed before the start of cisplatin therapy and then before and after each cycle of cisplatin. DNA isolated from peripheral blood samples was used to analyze genetic polymorphisms of selected genes coding for glutathion-S-transferases. **Results:** We have demonstrated association of early onset of cisplatin induced hearing impairment with absence of null allele of GSTT1 ( $p = 0.009$ ). Both GSTM1 gene deletion and single nucleotide polymorphism in GSTP1 gene (rs1695) did not show any association with cisplatin induced ototoxicity. **Conclusion:** Early onset of cisplatin induced hearing impairment is more probable in persons with two functional alleles of GSTT1 gene.

### Key words

cisplatin – ototoxicity – DNA copy number variations – single nucleotide polymorphism

Tato práce byla podpořena grantem IGA NS10101-4/2008.

This study supported by grant IGA NS10101-4/2008.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



MUDr. Michal Jurajda, Ph.D.  
Ústav patologické fyziologie  
Lékařská fakulta MU Brno  
Kamenice 5  
625 00 Brno  
e-mail: mjuraj@med.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 7. 5. 2012  
Přijato/Accepted: 20. 5. 2012

**Východiska**

Cisplatina (cisplatinum, cis-diammine-dichloroplatinum – CDDP) je chemoterapeutikum se širokým využitím při léčbě maligních tumorů. Cisplatina se váže na DNA na purinové báze a vytváří tak příčné vazby mezi DNA řetězci. Detoxifikace cisplatinu v buňkách probíhá konjugací s methioninem, cisteinem a glutathionem. Konjugace s glutathionem je katalyzována enzymy tvořícími rodinu glutathion-S-transferáz (GST).

Ototoxicita indukovaná cisplatinou je jedním ze závažných vedlejších účinků léčby tímto cytostatikem. Příznaky ototoxicity jsou zhoršení sluchu, bolesti ucha a tinnitus. Zhoršení sluchu se projevuje na audiogramu obzvláště ve vyšších frekvencích. Za příčinu ototoxicity cisplatinu na biochemické úrovni je považován oxidativní stres způsobený nerovnováhou mezi produkcí a odstraňováním reaktivních metabolitů kyslíku (ROS) a následná indukce buněčné apoptózy podmíněna aktivací kaskády enzymů BCL-2, kaspasy 9 a 3 [1]. Za fyziologických podmínek jsou nežádoucí účinky ROS blokovány systémem antioxidantních enzymů. Stochastický účinek ROS spočívá v poškození bu-

něčných struktur a makromolekul, jako jsou lipidy, proteiny a DNA, radikálovými reakcemi, což při určité koncentraci, kdy antioxidantní systém již nestačí neutralizovat jejich škodlivý vliv, vede k buněčné smrti. Mezi antioxidantní enzymy patří zejména glutathionperoxidáza (GPx), glutathionreduktáza (GR), superoxid-dismutáza (SOD), glutathion-S-transferáza (GST),  $\gamma$ -glutamyl-cystein-syntetáza ( $\gamma$ -GCS) a kataláza (CAT).

Ototoxicita indukovaná cisplatinou vykazuje značnou interindividuální variabilitu. Tato variabilita má pravděpodobně genetický podklad. Variabilita v genech kódujících enzymy podílející se na metabolizaci cisplatinu a odstraňování ROS by mohla mít vliv na výskyt jejích nežádoucích účinků [2,3]. V nedávné době bylo provedeno několik genetických asociačních studií, které analyzovaly tzv. kandidátní geny nebo postupovaly strategií „whole genom screening“ [4]. Oldenburg et al asociovali se zhoršením sluchu po terapii cisplatinou jednonukleotidový polymorfismus v genu pro GSTP1 a přítomnost genu pro GSTM1 [5]. Stejná skupina autorů asociovala také příznaky neuroto-

xicity cisplatinu s jednonukleotidovým polymorfismem v genu pro GSTP1 [6]. Peters et al na relativně malém souboru pacientů identifikovali GSTM3\*B alelu jako otoprotektivní ve vztahu k cisplatině [7]. Ross et al asociovali s ototoxicitou cisplatinu u skupiny 162 dětských pacientů jednonukleotidové polymorfizmy v genech pro COMT a TPMT [8]. Cílem naší práce bylo zjistit, jestli jsou některé z těchto genetických polymorfizmů asociovány s ototoxicitou indukovanou cisplatinou také v populaci českých pacientů. Glutathion-S-transferázy totiž patří mezi kandidátní geny hned ze dvou důvodů: jednak se podílejí na detoxifikaci cisplatinu, jednak na odstraňování ROS [9].

**Soubor pacientů a metody**

Do studie byli zařazováni pacienti léčení v Masarykově onkologickém ústavu v Brně. Pro zařazení do studie byla rozhodující terapie cisplatinou a absence klinicky významného poškození sluchu v klasické tónové audiometrii (250 Hz–8 kHz). Pacienti byli před a po každém cyklu cisplatinu audiometricky vyšetřeni. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

**Tab. 1. Asociace poškození sluchu po jednotlivých cyklech cisplatinu a vybraných polymorfizmů v genech glutathion-S-transferáz.**

ZHORŠENÍ SLUCHU DLE TÓNOVÉHO AUDIOGRAMU; VYŠETŘENÍ DLE CYKLU <sup>2</sup>											
Genotyp <sup>1</sup>	po 1. cyklu		před 2. cyklem		po 2. cyklu		před 3. cyklem		ANO	NE	
	ANO	NE	ANO	NE	ANO	NE	ANO	NE			
GSTM1	+/+	0	2 (4,5 %)	0	2 (5,0 %)	0	2 (6,5 %)	0	2 (7,7 %)		
	+/-	2 (18,2 %)	17 (38,6 %)	4 (28,6 %)	15 (37,5 %)	7 (31,8 %)	11 (35,5 %)	4 (33,3 %)	8 (30,8 %)		
	-/-	9 (81,8 %)	25 (56,8 %)	10 (71,4 %)	23 (57,5 %)	15 (68,2 %)	18 (58,1 %)	8 (66,7 %)	16 (61,5 %)		
	p <sup>3</sup>	0,374		0,745		0,545		1,000			
GSTT1	+/+/+	0	1 (2,3 %)	0	1 (2,5 %)	0	1 (3,2 %)	0	1 (3,8 %)		
	+/+	7 (63,6 %)	14 (31,8 %)	10 (71,4 %)	11 (27,5 %)	12 (54,5 %)	8 (25,8 %)	8 (66,7 %)	6 (23,1 %)		
	+/-	3 (27,3 %)	20 (45,5 %)	3 (21,4 %)	19 (47,5 %)	5 (22,7 %)	17 (54,8 %)	2 (16,7 %)	13 (50,0 %)		
	-/-	1 (9,1 %)	9 (20,5 %)	1 (7,1 %)	9 (22,5 %)	5 (22,7 %)	5 (16,1 %)	2 (16,7 %)	6 (23,1 %)		
p <sup>3</sup>	0,363		0,028		0,050		0,051				
GSTP1	AA	5 (45,5 %)	26 (59,1 %)	7 (50,0 %)	23 (57,5 %)	11 (50,0 %)	18 (58,1 %)	7 (58,3 %)	15 (57,7 %)		
	AG	6 (54,5 %)	11 (25,0 %)	6 (42,9 %)	11 (27,5 %)	10 (45,5 %)	7 (22,6 %)	4 (33,3 %)	6 (23,1 %)		
	GG	0	7 (15,9 %)	1 (7,1 %)	6 (15,0 %)	1 (4,5 %)	6 (19,4 %)	1 (8,3 %)	5 (19,2 %)		
	p <sup>3</sup>	0,103		0,611		0,112		0,631			

<sup>1</sup> pro markery GSTM1 a GSTT1 + značí přítomnost alely; - značí delecii alely

<sup>2</sup> zhoršení sluchu je hodnoceno při vyšetřeních na kontrolách dle cyklu; ANO značí zhoršení; NE značí nezhoršení sluchu oproti počátečnímu stavu sluchu

<sup>3</sup> statistická závislost hodnocena Fisherovým exaktním testem, založeném na odhadech metody Monte Carlo

Tab. 2. Asociace poškození sluchu po jednotlivých cyklech cisplatinu a delece genu pro GSTT1.

Genotyp <sup>1</sup>		ZHORŠENÍ sluchu dle tónového AUDIOGRAMU; vyšetření dle cyklu <sup>2</sup>							
		po 1. cyklu		před 2. cyklem		po 2. cyklu		před 3. cyklem	
		ANO	NE	ANO	NE	ANO	NE	ANO	NE
GSTT1	+/+	7 (63,6 %)	14 (32,6 %)	10 (71,4 %)	11 (28,2 %)	12 (54,5 %)	8 (26,7 %)	8 (66,7 %)	6 (24,0 %)
	+/- & -/-	4 (36,4 %)	29 (67,4 %)	4 (28,6 %)	28 (71,8 %)	10 (45,5 %)	22 (73,3 %)	4 (33,3 %)	19 (76,0 %)
p <sup>3</sup>		0,085		0,009		0,050		0,027	
OR (95% IS) <sup>4</sup>		3,625 (0,908; 14,470)		6,364 (1,645; 24,624)		3,300 (1,029; 10,588)		6,333 (1,398; 28,697)	

<sup>1</sup> pro markery GSTT1 + značí přítomnost alely; - značí deleci alely. 1 pacient s genotypem +/+ byl z hodnocení vyřazen

<sup>2</sup> zhoršení sluchu je hodnoceno při vyšetřeních na kontrolách dle cyklu; ANO značí zhoršení; NE značí nezhoršení sluchu oproti počátečnímu stavu sluchu

<sup>3</sup> statistická závislost hodnocena Fisherovým exaktním testem

<sup>4</sup> odds ratio spolu s 95% intervalem spolehlivosti

Zhoršení sluchu dle tónového audiogramu bylo vyhodnoceno srovnáním tónového audiogramu získaného před léčbou se všemi dalšími audiogramy během terapie. Jestliže se kdykoliv vyskytlo zhoršení buď ve dvou frekvencích současně o 10 decibelů, anebo v jediné frekvenci o 15 decibelů anebo více, pak byl daný výsledek měření pacienta hodnocen jako zhoršení sluchu. Pro zvýšení kontrastu mezi pacienty s poškozením sluchu a bez poškození sluchu jsme se zaměřili na raná stadia terapie, kde jsme očekávali brzký nástup ototoxicity u nejcitlivějších jedinců.

DNA byla izolována ze vzorku leukocytů periferní krve pomocí izolačních kolonek NucleoSpinBlood XL (Mancherey-Nagel). Delece genů pro GSTT1 a GSTM1 byly detekovány pomocí TaqMan Copy Number Assays Hs00010004\_cn a Hs02575461\_cn (Life Technologies). Jednonukleotidový polymorfismus v genu pro GSTP1 (rs1695) byl detekován pomocí TaqMan Genotyping Assay C\_3237198\_20 (Life Technologies). Veškeré genotypizace byly provedeny pomocí realtime cyklu ABI 7000 (Applied Biosystems).

Asociace postižení sluchu s alelickými variantami studovaných genů byla vyhodnocena v software IBM SPSS Statistics 19 for Windows (Release 19.0.1, © IBM Corporation 2010) pomocí Fisherova exaktního testu. Pro hodnocení genotypových variant byl výpočet exaktní významnosti založen na odhadech metody Monte Carlo (100 000 vzorků). Hodnota p menší než

0,05 byla považována za statisticky významnou.

### Výsledky

V rámci studie byla vyhodnocena data 55 pacientů léčených cisplatinou pro nádorové onemocnění. Soubor tvořilo 52 mužů a 3 ženy; věk 35 (22–59), medián (0,05.–0,95. percentil). Převažovala diagnóza C621 (87 % pacientů), z ostatních diagnóz byli vybráni pacienti s podobným dávkovým schématem cisplatinu, což zajistilo vysoký stupeň homogenity souboru z hlediska dávky a farmakokinetiky cisplatinu. Doporučená dávka byla 100 mg/m<sup>2</sup>. Totální dávka na cyklus byla získána vynásobením doporučené dávky tělesným povrchem (BSA). Medián sledování pacientů byl 273 dní. Po prvním cyklu bylo audiometricky vyšetřeno všech 55 pacientů, po druhém cyklu 53 pacientů.

Výsledky asociace poškození sluchu po jednotlivých cyklech cisplatinu s vybranými polymorfismy v genech glutathion-S-transferáz jsou uvedeny v tab. 1.

V tab. 2 je znázorněna asociace ototoxicity cisplatinu s deleci genu pro GSTT1, pokud pacienty rozdělíme podle přítomnosti této delece.

Z tabulek vyplývá, že nástup ototoxicity cisplatinu po prvních cyklech léčby významně asociuje s nositelstvím dvou kopií genu pro GSTT1. Přítomnost genu pro GSTM1 ani SNP v genu pro GSTP1 (rs1695) neasociovaly s poškozením sluchu. Obzvláště výrazný je rozdíl mezi nositeli dvou kopií genu pro GSTT1 a nositeli žádné či jedné kopie. V jednom

případě jsme detekovali amplifikaci genu pro GSTT1, pacient byl nositelem tří alel.

### Diskuze

Ototoxicita cisplatinu se obvykle projevuje již po prvních cyklech léčby, a proto jsme zaměřili svou pozornost právě na počáteční fáze terapie [10]. Při studiu delece genů pro GSTT1 a GSTM1 jsme našli statisticky významnou asociaci poškození sluchu při terapii cisplatinou s přítomností dvou kopií genu pro GSTT1. Tato asociace byla nejvýraznější v období před a po podání druhého cyklu cisplatinu. S přibývajícím cykly terapie se tato asociace oslabovala z důvodu, že ve studii klesal počet pacientů léčených větším počtem cyklů. Výsledek naší studie je v souladu s výsledky již publikovaných studií, které jako protektivní faktor proti ototoxicitě vyvolané cisplatinou uvádějí přítomnost alel kódujících méně aktivní formy GSTP1 a také delece genu pro GSTM1. Tento efekt není jednoduché vysvětlit, protože enzymy z rodiny glutathion-S-transferáz se podílejí jak na detoxifikaci cisplatinu, tak na obraně buněk před oxidativním stresem, který cisplatinu vyvolává. Jelikož se jednotlivé enzymy z rodiny GST liší svou substrátovou specifitou, je možné, že nižší aktivita některých GST ponechává v buňkách dostupné vyšší hladiny společného substrátu – glutathionu. Ten pak může být využit jinými enzymy z rodiny GST k účinnější detoxifikaci cisplatinu nebo odstraňování ROS [11].

## Závěr

V naší studii jsme prokázali statisticky významnou asociaci časného poškození sluchu během terapie cisplatinou s přítomností dvou alel genu pro GSTT1 u pacientů léčených cisplatinou v dávce 100 mg/m<sup>2</sup> na cyklus. Nejvýrazněji se vazba poškození sluchu na genotyp projevovává v období před a po druhém cyklu terapie cisplatinou.

## Literatura

1. García-Berrocal JR, Nevado J, Ramírez-Camacho R et al. The anticancer drug cisplatin induces an intrinsic apoptotic pathway inside the inner ear. *Br J Pharmacol* 2007; 152(7): 1012–1020.
2. Rybak LP. Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 15(5): 364–369.
3. Rybak LP, Mukherjee D, Jajoo S et al. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *Tohoku J Exp Med* 2009; 219(3): 177–186.
4. Huang RS, Duan S, Shukla SJ et al. Identification of genetic variants contributing to cisplatin-induced cytotoxicity by use of a genomewide approach. *Am J Hum Genet* 2007; 81(3): 427–437.
5. Oldenburg J, Kraggerud SM, Cvancarova M et al. Cisplatin-induced long-term hearing impairment is associated with specific glutathione s-transferase genotypes in testicular cancer survivors. *J Clin Oncol* 2007; 25(6): 708–714.
6. Oldenburg J, Kraggerud SM, Brydøy M et al. Association between long-term neuro-toxicities in testicular cancer survivors and polymorphisms in glutathione-s-transferase-P1 and -M1, a retrospective cross sectional study. *J Transl Med* 2007; 5: 70.
7. Peters U, Preisler-Adams S, Hebeisen A et al. Glutathione S-transferase genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. *Anticancer Drugs* 2000; 11(8): 639–643.
8. Ross CJ, Katzov-Eckert H, Dubé MP et al. Genetic variants in TPMT and COMT are associated with hearing loss in children receiving cisplatin chemotherapy. *Nat Genet* 2009; 41(12): 1345–1349.
9. Douglas KT. Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1987; 59: 103–167.
10. Knight KR, Kraemer DF, Winter C et al. Early changes in auditory function as a result of platinum chemotherapy: use of extended high-frequency audiometry and evoked distortion product otoacoustic emissions. *J Clin Oncol* 2007; 25(10): 1190–1195.
11. Oldenburg J, Fosså SD, Ikdahl T. Genetic variants associated with cisplatin-induced ototoxicity. *Pharmacogenomics* 2008; 9(10): 1521–1530.