

## 6.0 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie sollten die Wirkungen der beiden Somatostatin-Derivate SMS 201-995 (Sandostatin®) und SMS-Analogon auf die Bildung von Gallensteinen, die Gallensekretion und die Gallenblasenmotilität beim Hamster untersucht werden.

1. Im Versuchsabschnitt zur Gallensteinbildung wurden die drei Parameter Behandlungsdauer, Dosis und Diät je nach Versuchsgruppe unterschiedlich gewählt. Die Behandlung der Tiere erfolgte mit 1 oder 10 µg/kg/h SMS 201-995 bzw. SMS-Analogon über zwei-, vier-, oder sieben Wochen hinweg bei Fütterung normaler oder lithogener Diät. Mit Ausnahme einer vierwöchigen Versuchsreihe, in der die Substanzen zweimal täglich in der Dosis von 30 µg/kg s.c. injiziert wurden, erfolgte die Substanzapplikation mittels subkutan implantierter Minipumpen oder durch die einmalige subkutane Injektion einer Depotform von SMS 201-995. Zur Überprüfung des prophylaktischen Effektes von Aspirin bei der Entstehung von Gallensteinen, erfolgte in einem weiteren Experiment die zusätzliche Behandlung der Tiere mit 100 mg/kg/d Aspirin.

2. In der Versuchsanstellung zur Gallensekretion wurde die Gallenflüssigkeit an narkotisierten Tieren ohne oder mit Substitution von Gallensalzen über drei bzw. fünf Phasen hinweg gesammelt, wobei die erste der jeweils 30 Minuten dauernden Phasen als interne Kontrolle für jedes Tier diente. Zu Beginn der zweiten Phase setzte die Behandlung der Tiere mit 10 oder 100 µg/kg SMS 201-995 oder SMS-Analogon ein. Den Abschluss dieses Abschnittes bildete die Analyse der gewonnenen Galleproben auf ihren Gehalt an Gallensäuren, Cholesterin, Phospholipiden und Bilirubin, sowie die Berechnung ihres Lithogenen Index.

3. Die Versuche zur Gallenblasenmotilität in vitro beinhalteten zum einen das Erstellen von Dosis-Wirkungs-Kurven für Carbachol und Cholecystokinin-8 an isolierten Gallenblasen und Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus des Oktapeptids. Zum anderen wurden die Effekte von Somatostatin-14, SMS 201-995 und SMS-Analogon auf die durch Carbachol oder CCK-8 induzierte Gallenblasenkontraktion betrachtet. In einem abschliessenden Experiment wurde die Wirkung der ganglionär erregenden Substanz Dimethylphenylpiperazin und der Einfluss elektrischer Stimulierung auf die Motilität der Hamstergallenblase untersucht. Weitere Versuche erfolgten in vivo an narkotisierten Tieren, zur Untersuchung des Effektes von SMS 201-995 auf die durch CCK-8 induzierte Gallenblasenkontraktion.

In den drei Versuchsabschnitten konnten folgende Befunde erhoben werden:

1. SMS 201-995 und SMS-Analagon induzierten bei kontinuierlicher Infusion in der Dosis von 10 µg/kg/h auch ohne lithogene Diät bereits nach zwei Wochen das vermehrte Auftreten von Gallensteinen und Sludge. Die Verlängerung der Behandlungsdauer auf vier bzw. sieben Wochen erbrachte keine weitere Erhöhung der Gallensteininzidenz. Die Häufigkeit von Sludge lag nach sieben Wochen sogar unter derjenigen von zwei Wochen. Die diskontinuierliche zweimalige tägliche Applikation der Analoga führte nicht zur vermehrten Entstehung von Gallensteinen und Sludge. Die Medikation der Tiere mit Aspirin verursachte weder eine verminderte Sludgebildung bei den mit SMS 201-995 behandelten Tieren, noch führte sie zu einer signifikanten Hemmung der durch die lithogene Diät bzw. durch SMS 201-995 induzierten Bildung von Gallensteinen.

2. SMS 201-995 und SMS-Analagon führten in der Dosis von 100 µg/kg zu einer Verminderung der Taurocholat-stabilisierten Gallensekretion, ohne jedoch signifikante Veränderungen in der hepatischen Ausscheidung von Gallensäuren, Cholesterin und Phospholipiden hervorzurufen. Lediglich in der Bilirubinausscheidung konnte bei SMS 201-995 in der Dosierung von 100 µg/kg eine Verminderung beobachtet werden. Der Lithogene Index, ein Mass für die Sättigung der Gallenflüssigkeit mit Cholesterin, erfuhr unter den gegebenen Versuchsbedingungen ebenfalls keine deutlichen Veränderungen.

3. Sowohl SRIF-14 als auch SMS 201-995 und SMS-Analagon zeigten in vitro keine Hemmung der direkten Wirkung von Carbachol oder Cholecystokinin-8 auf die glatte Muskulatur der Gallenblase. Da weder mit Dimethylphenylpiperazin noch durch die elektrische Stimulierung Kontraktionen der Gallenblasenstreifen hervorgerufen werden konnten, konnte die Wirkung der Analoga auf neuronale Mechanismen nicht untersucht werden. Auch in vivo konnte keine Hemmung der durch CCK-8 induzierten Gallenblasenkontraktion mit SMS 201-995 beobachtet werden.

Die vorliegende Studie zeigt, dass Somatostatin-Derivate auch ohne den Einsatz einer lithogenen Diät Gallensteine beim Hamster verursachen können, wenn sie in hoher Dosierung, die zu konstanten Plasmaspiegeln führt, appliziert werden. Unter den gegebenen, vorwiegend akuten Versuchsbedingungen konnte kein Zusammenhang zwischen diesem Phänomen und Veränderungen in der Sekretion und Zusammensetzung der Lebergalle oder der Gallenblasenmotilität gefunden werden. Es ist jedoch nicht auszuschliessen, dass die mehrwöchige Applikation der Somatostatin-Derivate zu Veränderungen in der Gallenblasengalle führen kann, welche die Gallensteinbildung begünstigen.

## 7.0 SCHLUSSFOLGERUNG

Die aus der vorliegenden Untersuchung hervorgegangenen Ergebnisse am Hamster zeigen, dass zwei Somatostatin-Derivate, SMS 201-995 und ein SMS-Analogon, bei kontinuierlicher Infusion und hoher Dosierung zum vermehrten Auftreten von Gallensteinen führten. Die erhöhte Inzidenz von Gallensteinen, wie sie bei mit SMS 201-995 behandelten akromegalen Patienten zu beobachten war, kann somit zumindest teilweise einer Substanzwirkung zugeschrieben werden. Unterstützt wird diese Annahme durch die erhöhte Cholelithiasis-Häufigkeit bei Somatostatinoma-Patienten. Da jedoch weder alle mit SMS 201-995 behandelten Hamster bzw. Patienten Gallensteine entwickelten, scheinen die Somatostatin-Analoga lediglich zur Verstärkung von für die Gallensteinentstehung wichtigen Faktoren zu führen.

Die in beiden Species beobachteten Gallensteine, nämlich pigmentierte Steine beim Hamster und solche mit hohem Cholesterinanteil beim Menschen, entsprechen der Art von Steinen, wie sie in der entsprechenden Species mit zunehmendem Alter auftreten können. Damit kann die Wirkung von SMS 201-995 unter anderem als Beschleunigung eines unter Umständen natürlich erscheinenden Prozesses angesehen werden. Das Verabreichen einer lithogenen Diät war nicht notwendig, sie förderte jedoch die Entstehung der Cholelithiasis durch einen offensichtlich additiven Mechanismus, d.h. durch die vermehrte Bildung von Sludge, was einen ersten Schritt in der Entstehung von Gallensteinen darstellt.

Das Auftreten von Sludge bei nahezu allen behandelten Tieren lässt eine vermehrte Produktion von Mucin vermuten, was zusammen mit einem reduzierten Gallenfluss und weiteren Faktoren, wie z.B. verminderter Gallenblasenentleerung, die Kristallisation von Cholesterin-Mikrokristallen begünstigen könnte. Die unter dem Aspekt der Prophylaxe, durch Hemmung der Mucin-Produktion in der Gallenblase, durchgeführte Behandlung der Tiere mit SMS 201-995 und Aspirin, führte zu einer, wenngleich nichtsignifikanten, Verminderung der Steinbildung, ohne jedoch einen Einfluss auf die Sludgebildung auszuüben. Aufgrund dieser Beobachtung kann vermutet werden, dass die durch SMS 201-995 induzierte Bildung von Gallensteinen mit Sicherheit auf Mechanismen beruht, die über die Erhöhung der Produktion von biliären Sludge hinausgehen.

SMS 201-995 und SMS-Analogon führten in hohen Dosen zu einer Verminderung der Taurocholat-stabilisierten Gallensekretion, ohne jedoch signifikante Veränderungen in der hepatischen Ausscheidung von Gallensäuren, Cholesterin und Phospholipiden hervorzurufen. Da die analysierten Lebergallenproben alle aus akuten Experimenten stammten, können Veränderungen in der Zusammensetzung der Leber-, bzw. Gallenblasengalle nach längerer Anwendung der Substanzen nicht ausgeschlossen werden.

Die beim Menschen nachgewiesene Hemmung der postprandialen, auf endogener Freisetzung von Cholecystokinin beruhenden Gallenblasenentleerung durch SMS 201-995, könnte einer der Hauptfaktoren in der Gallensteinentwicklung darstellen. Sowohl SRIF-14 als auch, wie aus den eigenen Untersuchungen hervorgegangen, SMS 201-995 und SMS-Analoga zeigten keine Hemmung der direkten Wirkung von Cholecystokinin auf die glatte Muskulatur der Gallenblase. SMS 201-995 scheint beim Menschen, vermutlich jedoch nicht beim Hamster, zusätzlich noch eine neuronale Komponente der CCK-Wirkung auf die Gallenblase zu besitzen. Sollte somit die Hemmung der Gallenblasenmotilität beim Hamster eine Rolle in der Entstehung der Gallensteine gespielt haben, so muss die SMS-induzierte Hemmung der CCK-Freisetzung aus dem Gastrointestinaltrakt, die auch beim Menschen nachgewiesen wurde, der ausschlaggebende Mechanismus gewesen sein.

Weitere Versuche an Tiermodellen und am Menschen sind notwendig, um die genauen Mechanismen der durch Somatostatin-Analoga induzierten Gallensteinbildung zu erforschen, wobei man jedoch berücksichtigen muss, dass bis heute selbst die Ursachen der "spontanen" Gallensteinbildung noch nicht geklärt sind.

## 8.0 SUMMARY

Tilla Weiss: Effects of somatostatin and somatostatin-analogues on hepatic and biliary functions

Because of its inhibitory effect on the secretion of growth-hormone, thyreotropin, insulin, glucagon and on various secretory functions within the gastro-intestinal tract, the somatostatin analogue Sandostatin® (INN.: Octreotide; SMS 201-995) is used in long-term treatment of acromegaly as well as in therapy of gastro-entero-pancreatic tumors. Although the drug is generally well tolerated, gallstone formation during long lasting application of SMS 201-995 has been observed in some patients.

The aim of this study was to investigate a possible cholelithogenic effect of SMS 201-995 and another SMS-analogue in an animal model, and to examine their effects on bile secretion, bile composition and gallbladder motility. A rodent species, the hamster, which is reported in the literature to reproducibly form gallstones when fed lithogenic diet, was used.

Gallstones were found occasionally in untreated hamsters on normal diet. SMS 201-995 and SMS-Analog increased the percentage of hamsters with gallstones when administered as a continuous infusion or in depot-form (SMS 201-995). Stones were already found after 2 weeks with no further increase up to 7 weeks. While all animals had gallbladder sludge after 2 weeks, this percentage decreased after 7 weeks, suggesting reversibility in spite of continued treatment. The presence of viscous sludge suggests increased formation of mucin, a factor considered to contribute to gallstone development. SMS 201-995 and SMS-analogue injected twice daily did not cause gallstones or sludge. Since peak plasma levels in this experiment were higher than in those with continuous infusion, which led to stone formation, it can be concluded that periods with low levels are crucial for absence of stones. Daily administration of aspirine showed no effect on development of biliary sludge induced by SMS 201-995. The tendency to reduce SMS-induced gallstone formation by aspirine did not reach statistical significance.

SMS 201-995 and SMS-analogue, injected in the high dose of 100 µg/kg significantly reduced bile flow. No changes in the hepatic output of bile acids, cholesterol or phospholipids by SMS 201-995 or SMS-analogue were found in bile acid depleted or bile acid stabilized animals. The lithogenic index, an index of cholesterol saturation, was not increased compared to controls. These effects, observed in *hepatic* bile in acute experiments do not rule out increased cholesterol saturation in *gallbladder* bile after longer treatment with SMS 201-995 or SMS-analogue.

SMS 201-995 and SMS-analogue did not reduce cholecystokinin-8-induced gallbladder contraction in the hamster in vitro and, shown for SMS 201-995, also in vivo. The in vitro result indicates that SMS 201-995 and SMS-analogue do not interfere with the action of CCK on the smooth muscle CCK<sub>A</sub>-receptor. Unlike in the hamster, CCK-8 contracts the human gallbladder in vivo also via a cholinergic component. This is likely to be abolished by SMS 201-995 and together with the inhibition of the release of endogenous cholecystokinin can explain the absence of post-prandial gallbladder emptying in humans treated with SMS 201-995.

The experiments carried out in the hamster indicate that SMS 201 995 after chronic application in high doses can increase the likelihood for gallstone formation. The nature of the stones in the treated hamsters was the same as that of those, which had developed spontaneously suggesting that SMS 201-995 and SMS-analogue may augment stone-forming factors normally present in the gallbladder. The apparent difference between hamster and man regarding the CCK effects on gallbladder motility made it impossible to prove that inhibition of gallbladder emptying is the main factor involved. Further time course studies on changes in gallbladder bile of man and animals are needed to elucidate additional mechanisms leading to gallstone formation during treatment with SMS 201-995.