

12706

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
GASTROENTEROLOJİ BİRİMİ

**GEBELİK KOLESTAZINDA PARASETAMOL VE LİTOKOLİK
ASİT'İN SULFASYON VE GLUKURONİDASYON
DURUMUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

GASTROENTEROLOJİ UZMANLIK TEZİ

Dr. MEHMET YÜCESOY

KAYSERİ - 1990

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KISALTMALAR.....	1
GİRİŞ	2
GENEL BİLGİLER	4
1. PARASETAMOL METABOLİZMASI.....	4
2. SAFRA ASİDLERİ VE METABOLİZMASI.....	7
3. GEBELİK KOLESTAZI	8
3.1. Gebelik kolestazının fizyopatolojisi.....	10
3.2. Safra asidleri ve gebelik kolestazi.....	10
3.3. Gebelik kolestazında anne ve çocuk sağlığı.....	10
3.4. Gebelik kolestazının epidemiyolojisi	11
MATERYAL VE METOD.....	12
1. HASTALAR	12
2. PARASETAMOL SÜLFAT VE PARASETAMOL GLUKURONAT'IN TAYİNİ.....	14
3. LİTOKOLİK ASİD SÜLFAT VE LİTOKOLİK ASİD GLUKURONAT'IN TAYİNİ.....	17
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	19
BULGULAR.....	20
TARTIŞMA	29
SONUÇ	34
ÖZET	36
SUMMARY	38
KAYNAKLAR	40

KISALTMALAR

GK	: Gebelik kolestazi
PBS	: Primer bilier siroz
LKA	: Litokolik asid
YPSK	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
PS	: Parasetamol sülfat
PG	: Parasetamol glukuronat
TLC	: İnce tabakalı kromatografi
M	: Mol
HCL	: Hidroklorik asid

GİRİŞ

Gebelik kolestazi (GK) gebelik sırasında ortaya çıkan ve nedeni bilinmeyen nadir bir hastalıktır (1,5). Gebelik kolestazi insidansının bazı ülkelerde yüksek olması ve vakaların daha çok kan bağı olanlar arasında yoğunlaşması bu kişilerde hastalığa zemin hazırlayan genetik bir yatkınlığın bulunabileceğini düşündürmektedir (5, 61,62).

Hidroksile olmuş ilaçların , ilaç metabolitlerinin ve endojen bileşiklerin karaciğerde inorganik sülfat veya glukuronik asid ile konjügasyonları genellikle birbiri ile rekabet halinde olan bir metabolik olaydır(24,38). Düşük ilaç konsantrasyonlarında (genellikle maddelerin sülfattransferazlara afinitelerinin daha yüksek olması nedeni ile) sülfasyon ,glukuronidasyona göre daha hakim durumdadır(24). Bununla birlikte bileşiklerin kandaki konsantrasyonları arttığı zaman , plazma sülfat seviyesindeki azalma nedeni ile karaciğerin sülfasyon hızı da azalmakta ya da sülfasyon yolu doymakta, böylece glükuronidasyon ön plana geçebilmektedir (30, 38).

Karaciğerin sülfasyon yeteneği , vücutta litokolik asid gibi karaciğere toksik olan ve karaciğerde kolestaz yapan maddelerin birikmesine karşı gelişmiş koruyucu bir mekanizma olarak kabul edilmektedir (11, 13, 40,41, 54). Normal kişilerde litokolik asidin sülfasyonunun bu maddenin idrarla ve dışkı ile itrahını artırdığı, böylece serumda kolestaza yol açacak miktarda monohidroksi safra asidinin birikmesinin engellendiği ve böylece karaciğeri koruduğu kabul edilmektedir(11,13,40,41).

Parasetamol büyük ölçüde sülfat ve glükuronat ile konjüge edilerek itrah olan analjezik ve antipiretik bir ilaçtır. Bu özelliğinden dolayı karaciğerdeki defektif sülfasyon durumunu ortaya çıkarmada bir test ilacı olarak kullanılmıştır (46,79). Son yıllarda pirimer bilier sirozlu (PBS) ;hastalarda kontrol gurubuna ve diğer karaciğer hastalıklarına göre parasetamol glükuronid / sülfat konjugasyonu oranının anlamlı olarak daha yüksek olduğu ve serumda biriken toksik glukuronidlerin PBS 'nin patogenezinde sorumlu olabilecekleri ileri sürülmüştür (79).

Biz de gebelik kolestazi oluşan hastalarda gebelik sırasında artmış metabolik yük nedeni ile sülfasyon yolunun satüre olması veya serum inorganik sülfat seviyesindeki azalma nedeni ile karaciğerde glukuronidasyonun daha hakim duruma gelebileceğini, bunun da kanda fazla miktarda toksik glukuronidlerin birikimine yol açabileceğini ve bu arada litokolik asid glukuronid gibi potansiyel olarak kolestatik bazı maddelerin kan seviyesinin yükselmesi sonucu hastalığın klinik ve laboratuvar bulgularının ortaya çıkabileceğini düşündük . Bu hipotezin doğruluğunu araştırmak amacı ile bu çalışmayı planladık.

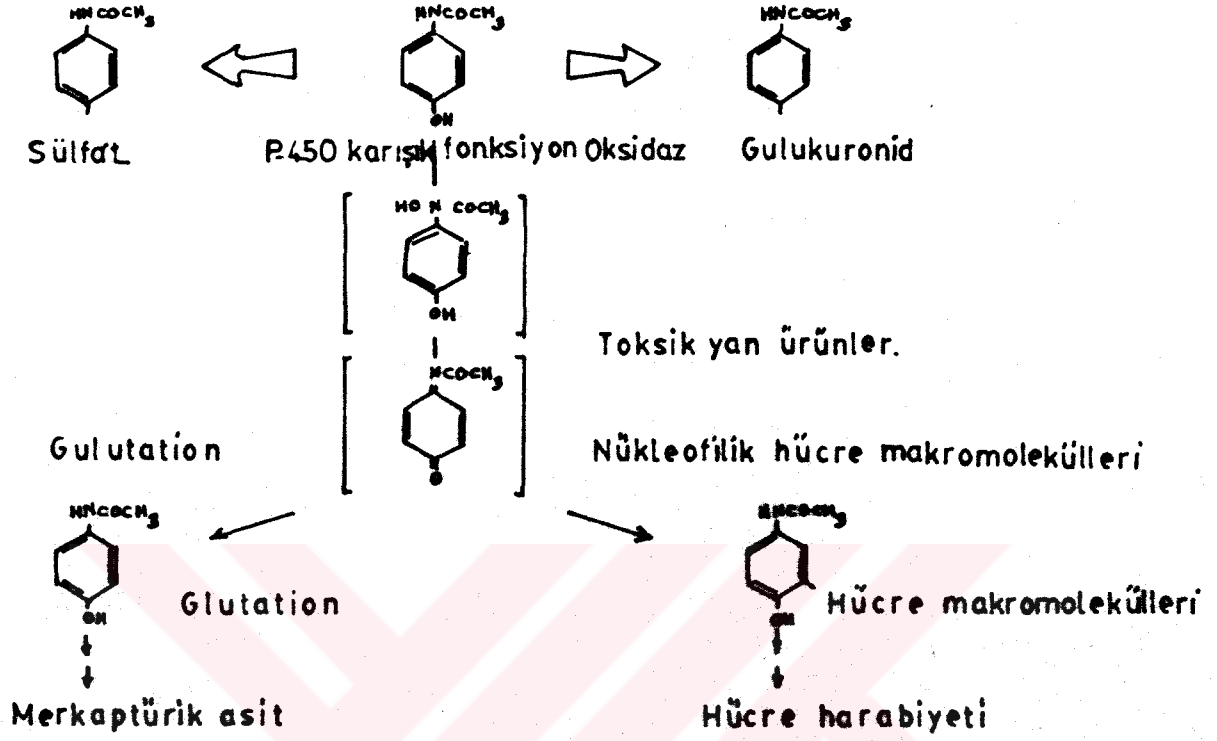
GENEL BİLGİLER

Parasetamol Metabolizması

Parasetamol ,yan etkisi aspirine göre daha düşük olduğu için geniş kullanım alanı bulan analjezik ve antipiretik bir ilaçtır. Ağızdan alınan parasetamol gastrointestinal sistemden emilir. Yarılanma ömrü sağlıklı kişilerde iki saattir. Tedavi dozunda verilen parasetamolün % 85 - 95'i ilk 24 saatte idrarla itrah edilir (14). Parasetamol büyük bir kısmı karaciğerde glukuronik asid ve sülfat ile konjüge olduktan sonra , çok az bir kısmı da gulutation ile inaktivasyondan sonra sistein veya merkaptürik asid ile konjüge olarak itrah edilir (Şekil -1.) (78). Parasetamolün çok az bir bölümünün de gastrointestinal mukozada sülfatla konjüge olduğu bilinmektedir (66).

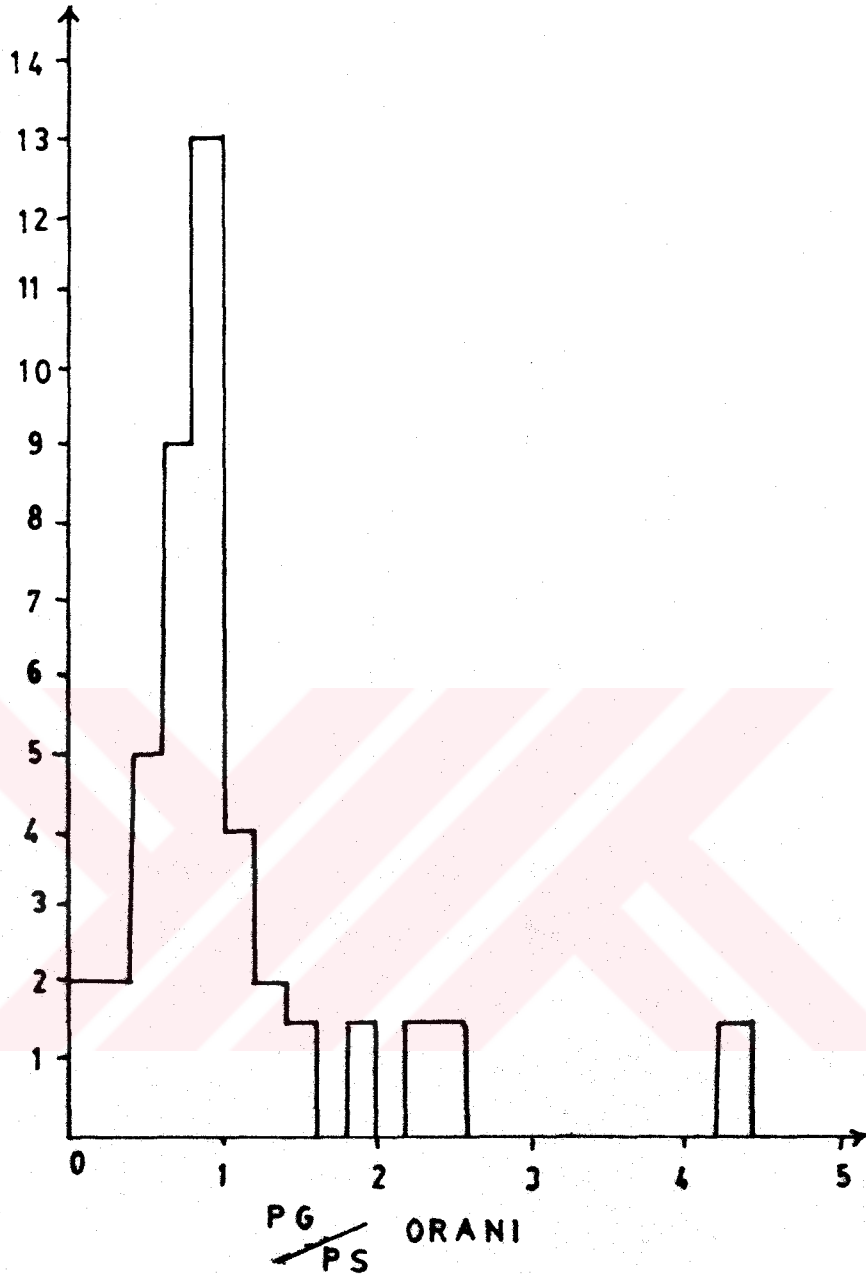
Eğer parasetamolün idrarla itrah edilen gulukuronat ve sülfat konjüгатlarının oranı hesaplanacak olursa , bunun dağılımının kişiden kişiye önemli farklılıklar gösterdiği anlaşılır (Şekil - 2) (8). Ayrıca aynı kişide parasetamolün metabolik profili \mp % 18 'lik değişiklik gösterdiğinden, hem genetik hem de çevresel faktörlerin parasetamol metabolizmasını değiştirebildikleri anlaşılmaktadır (53). Çevresel faktörler muhtemelen üridil difosfo - glukuronil transferaz ve sülfotransferaz aktivitelerini etkileyerek parasetamol metabolizmasını etkilemektedirler (4).

Klinikte yüksek dozda parasetamol alan kişilerde ölümlere neden olan karaciğer nekrozunun geliştiği ve böyle durumlarda karaciğerde diğer toksik ara ürünlerle beraber bol miktarda parasetamol glukuronidin oluştuğu bilinmektedir (46). Bu bulgu karaciğer hücrelerinin zedelenmesine ve kolestaza neden olan durumlarda sülfat konjügasyonunun azalmasının ya da glukuronid konjügasyonunun nisbi olarak artmasının neden olabileceği şeklinde yorumlanmış ve parasetamolün bir kişideki defektif sülfürmetabolizmasını ortaya çıkarmada bir test ilacı olarak kullanılabileceği fikrini doğurmuştur (46, 79).



Sekil 1-Asetaminofen metabolizması (Mitchell JR et al, 1974)

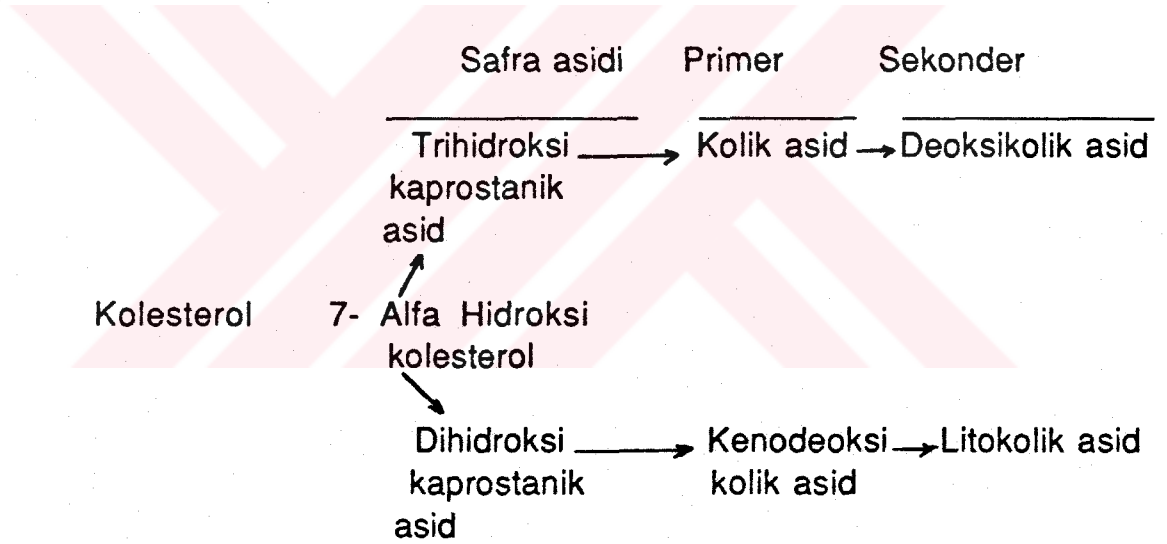
SIKLIK



Şekil 2- Sağlıklı 34 kontrol vakasında parasetamol glukuronat (PG) parasetamol sülfat (PS) oranının dağılımının sıklığı ve oranlamada kişiler arasındaki değişiklik (Caldwell et al, 1982)

SAFRA ASİDLERİ

Primer safra asitleri karaciğerde kolesterolden sentez edilirler (Şekil -3) . Günlük sentez miktarı 200 - 500 mg'dır. (65). Sentez edilecek safra asidi miktarı enterohepatik dolaşım ile karaciğere dönen safra asidi tarafından tayin edilir.Safra asitleri kolonda bakteriyel 7- alfa hidroksilasyona uğrar ve sekonder safra asitleri litokolik asid ve deoksikolik asid teşekkül eder. Tersiyer safra asidi olan ursodeoksikolik asid ise sekonder safra asitlerinin karaciğerde değişikliğe uğraması ile oluşur (54,65). İnsan safrasında trihidroksi safra asidinin miktarı (Kolik asid) kabaca iki dihidroksi safra asidinin (Kenodeoksi kolik asid ve deoksikolik asid) miktarına eşittir (41,65).



Şekil -3. Karaciğerde kolesterolden safra asitlerinin sentezi (Sherlock S., 1989).

Sekonder safra asitleri karaciğerde glisin ve taurin amino asitleri ile konjuge olurlar. Böylece bu safra asitlerinin geri emilimi büyük ölçüde engellenir. Kolestat varlığında ise safra asitleri daha çok sülfatla konjuge halde idrarla itrah edilirler (13,41).

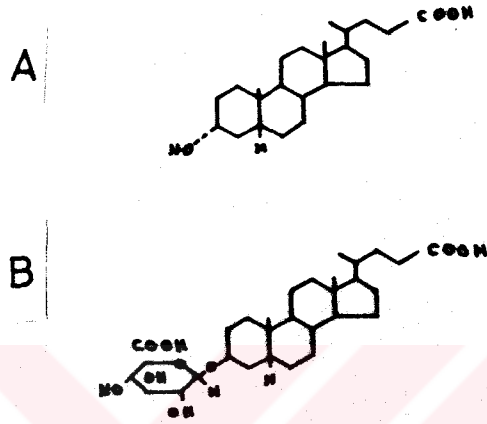
Litokolik asid

Litokolik asid sekonder bir safra asididir. Kolonda kenodeoksi kolik asidin bakteriyel 7 - alfa dehidroksilasyonu ile oluşur (54). Normalde kolondan az miktarda litokolik asid absorbe edilir, portal kan akımı ile karaciğere gelir ve metabolize edilerek tekrar itrah edilir. Litokolik asid karaciğerde taurin ile veya glisin ile konjüge olduktan sonra ayrıca sülfat ile veya glukuronik asid ile de konjüge olabilir. Böylece taurolitokolik asid ve glukolitokolik asid'in yanı sıra taurolitokolik asid sülfat, taurolitokolik asid glukuronat, glukolitokolik asid sülfat ve glukolitokolik asid glukuronat gibi bileşikler de oluşur (9). Kolestatik karaciğer hastalığı olan kişilerin serumunda litokolik asid glukuronidin arttığı gösterilmiştir (15, 72). Bu hastalarda kanda litokolik asid glukuronidin birikmesi bunun normalde safra ile itrah edildiğini, kolesataz halinde ise safra ile itrahının yapılamadığını düşündürmüştür. Öte yandan sıçanlarda yapılan çalışmalarda intravenöz olarak verilen litokolik asid glukuronidin kısmi ya da tam kolesataza neden olduğu gösterilmiştir (54). Litokolik asid ve litokolik asid glukuronidin açık formülleri şekil -4'te görüldüğü gibidir .

Gebelik kolestazi (Cholestasis of pregnancy)

Gebelik kolestazi (GK) gebelikte görülen nadir bir hastalıktır. İlk defa 1883 yılında Ahfeld tarafından tarif edilmiştir (21). Başlıca semptomları gebeliğin ikinci ve üçüncü trimestirinde ortaya çıkıp doğumdan sonra birkaç saat ile birkaç gün içinde kaybolan kaşıntıdır (63, 74). Hastaların sadece küçük bir gurubunda hafif ile orta derecede hiperbilirübinemi görülür. Hastaların büyük bir kısmında hiperbilirübinemi klinik olarak fark edilmez . Doğumdan sonra semptomlarla birlikte laboratuvar bulguları da tamamen normale döner. Karaciğer biyopsisinde ışık mikroskobisi ile orta derecede kolestaz bulguları görülür. Elektron mikroskobunda ise diğer kolestatik hastalıklarda da gözlenen hepatositlerde genişleme, safra kanallarındaki mikrovillusların kaybı gibi özgül olmayan bulgular tesbit edilir.

Bu hastalarda gebelik dışında kolestaz bulgusu sadece doğum kontrol hapı kullananlarda görülür. Belirti ve bulgular birbirini takip eden gebeliklerde genellikle tekrarlar. Kaşıntının şiddeti hastadan hastaya ve gebelikten gebeliğe değişir. Bazı hastalarda bütün gebeliklerde gebeliğin üçüncü trimestirinde kaşıntı hikayesi vardır.



Şekil 4- A - Litokolik asidin açık formülü.
B - Litokolik asid 3-O-B-D glukuronid'in açık formülü (Oelberg DG, etal 1984).

Bazı hastalarda ise kolestatik tablodan önceki bir iki gebelikte kaşıntı hikayesi yoktur. Kaşıntı, vakaların % 70'inde üçüncü trimestirde ortaya çıkar, % 30 kadarında da ikinci trimestirden itibaren başlar (23).

Gebelik kolestazının fizyopatolojisi

Hastalık belirti ve bulgularının doğumu takiben kaybolması , belirtilerin ikinci ve üçüncü trimestirde ortaya çıkması ve bazı hastalarda doğum kontrol hapı kullanılması ile de benzer belirti ve bulguların ortaya çıkması , etiyolojide östrojen ve progesteronların rol oynayabileceğini düşündürmüştür (21, 63). Gebelikten sonra henüz seks hormonlarının kan seviyesi yüksek iken semptomların kaybolması , doğum kontrol hapı kullananlarda oluşan sarılık vakalarında periportal infiltrasyon gelişirken bu hastalarda periportal infiltrasyonun oluşmaması bu görüşün aleyhine olan hususlardır (60). Gebelik kolestazı gelişen hastalarda idrarda östrojen sülfat itrahının arttığı, östrojen glukuronat itrahının ise azaldığı bildirilmiştir (1, 77).Öte yandan gebelik kolestazında safra ile itrah edilen östrojenlerin ve östrojen 3- glukuronat'ın miktarında normal gebelere oranla azalma olduğu tesbit edilmiş(2), ancak bu değişiklikler gebelik kolestazına sekonder değişiklikler olarak kabul edilmiştir (23).

Safra asidleri ve gebelik kolestazı

Normal gebelerde açlık serum total safra asidi seviyesi gebe olmayan kadınlara ve erkeklere benzerlik gösterir (63). GK'da ise total serum safra asidi konsantrasyonu normalin 100 katını bulan artışlar gösterir ve bu durum doğumdan sonra bir hafta içinde normale döner (68). Gebelik sırasında total safra asidinin sülfat konjügasyonunun oranı % 0.4 – 1.2 oranında ,GK'da ise % 0.7 – 1.7 oranında azalmaktadır (34).

Gebelik kolestazında anne ve çocuk sağlığı

Gebelik kolestazı gelişen kadınlarda prematüre ve ölü doğum oranının normal gebelerden beş kat daha sık olduğu ve GK gelişen hastaların % 63 'üne fetal distress nedeni ile Sezeryan ameliyatı uygulandığı bildirilmiştir (20,63) .

Gebelik kolestazının epidemiyolojisi

Gebelik kolestazının görülme sıklığı ülkeden ülkeye ve bölgeden bölgeye büyük değişiklikler göstermektedir. Gebe kadınlarda görülme sıklığı Fransa'da % 0.2, Kanada'da % 0.1, Avusturalya'da % 0.2-0.8 iken bu oran İsviçre'de % 2-3, Şili'de % 12-22 , Bolivya'da % 9 bulunmuştur (39, 63). Türkiye'de ise bildiğimiz kadarı ile bu konuda bir çalışma yapılmamıştır.



MATERYAL VE METOD

Hastalar

Çalışma Kasım 1988 - Aralık 1989 tarihleri arasında İngiltere'de Birmingham Maternity Hospital'e müracaat eden hastalarda yapıldı. Çalışmadan önce çalışmaya katılan bütün hastalardan ve hastane etik kurulundan müsaade alındı. Gebelik kolestazi tanısı konan hastaların sülfasyon ve gulukuronidasyon kapasiteleri , gebe olmayan normal kadınlarla, normal gebe kadınlarla ve gebelik sırasında kaşıntısı olan fakat gebelik kolestazının diğer kriterlerini taşımayan kaşıntılı gebelerle karşılaştırıldı.

Çalışmaya, gebelik kolestazi olan 7 hasta , yaş ortalaması 28 yıl (23-39 yıl arası), gebe olmayan 10 normal kadın, ortalama yaş 43 yıl (27-54 yıl arası); 14 normal gebe kadın ,yaş ortalaması 26 yıl (19 -36 yıl arası); gebelik sırasında kaşıntısı olan fakat gebelik kolestazının diğer kriterlerini taşımayan 7 kadın, yaş ortalaması 34 yıl (25-43 yıl arası) , alındı (Tablo -1).

Tablo - 1. İncelenen Hastalara Ait Bazı Klinik Veriler

GURUPLAR	Olgu sayısı	Yaş ortalaması (yıl) *	Gebelik sayısı *	Gebelik süresi (hafta)*
Normal sağlıklı kadın	10	26	2.2	--
Normal gebe	14	26 (19 -36)	1.7 (1 - 4)	34.5 (33 - 38)
Kaşıntılı gebe	7	34 (25 - 43]	3.1 (1 -6)	37 (32 -38)
Gebelik kolestazi	7	28 (23 - 39)	2.1 (1 - 4)	36 (36 -37)

* Ortalama ve değişken sınırları

Gebelik kolestazi tanısı daha önce Berg ve arkadaşları tarafından tesbit edilmiş olan kriterlere göre konuldu (5) .Gebelik kolestazi tanısı için aşağıdaki kriterlerin bulunması esas alındı (4. madde gebelik şartına bağlı).

Pozitif kriterler:

1. Kaşıntının gebelik sırasında başlaması
2. Kaşıntının doğuma kadar devam etmesi
3. Doğumu takiben kaşıntının kaybolması
4. Önceki gebelikte veya doğum kontrol hapi kullanımından sonra; hasta, anne ya da kız kardeşte kaşıntının ortaya çıkması (Bu kriter uygulanabilirlik şartına bağlı) .

Negatif kriterler:

- 1.Klinik muayenede dermatolojik bir hastalık bulgusunun olmaması .
2. Gebelik ve doğum kontrol hapi kullanımı dışında tekrarlayan kaşıntı hikayesinin bulunmaması

3. Hastanın vitamin ve demir preparatı dışında ilaç almıyor olması
4. Başka aktif bir karaciğer hastalığının bulunmaması.

Gebe kadınların tamamı gebeliğin 32. -38. haftaları arasında incelendiler. Ayrıca gebelik kolestazi olan üç hasta , beş normal gebe ve iki kaşıntılı fakat gebelik kolestazi olmayan gebe kadın doğumdan dört hafta sonra tekrar incelendi .

Çalışmaya katılmayı kabul etmeyen hastalar, ilaç allerjisi hikayesi olanlar , klorpromazin kullandıktan sonra sarılık gelişenler ve ailesinde primer bilier siroz hikayesi olan hastalar çalışmaya alınmadı.

Çalışmaya alınan hastalar arasında gebelik sırasında sigara, alkollü içki kullanan ve demir preparatı dışında ilaç alan yoktu. Kontrol gurubunda ise gebelik sırasında veya daha önce sarılık , safrakesesi taşı hikayesi ve ailede kolestatik hastalık hikayesi olan yoktu.

Parasetamol sülfat ve parasetamol glukuronat'ın tayini

İşlem:

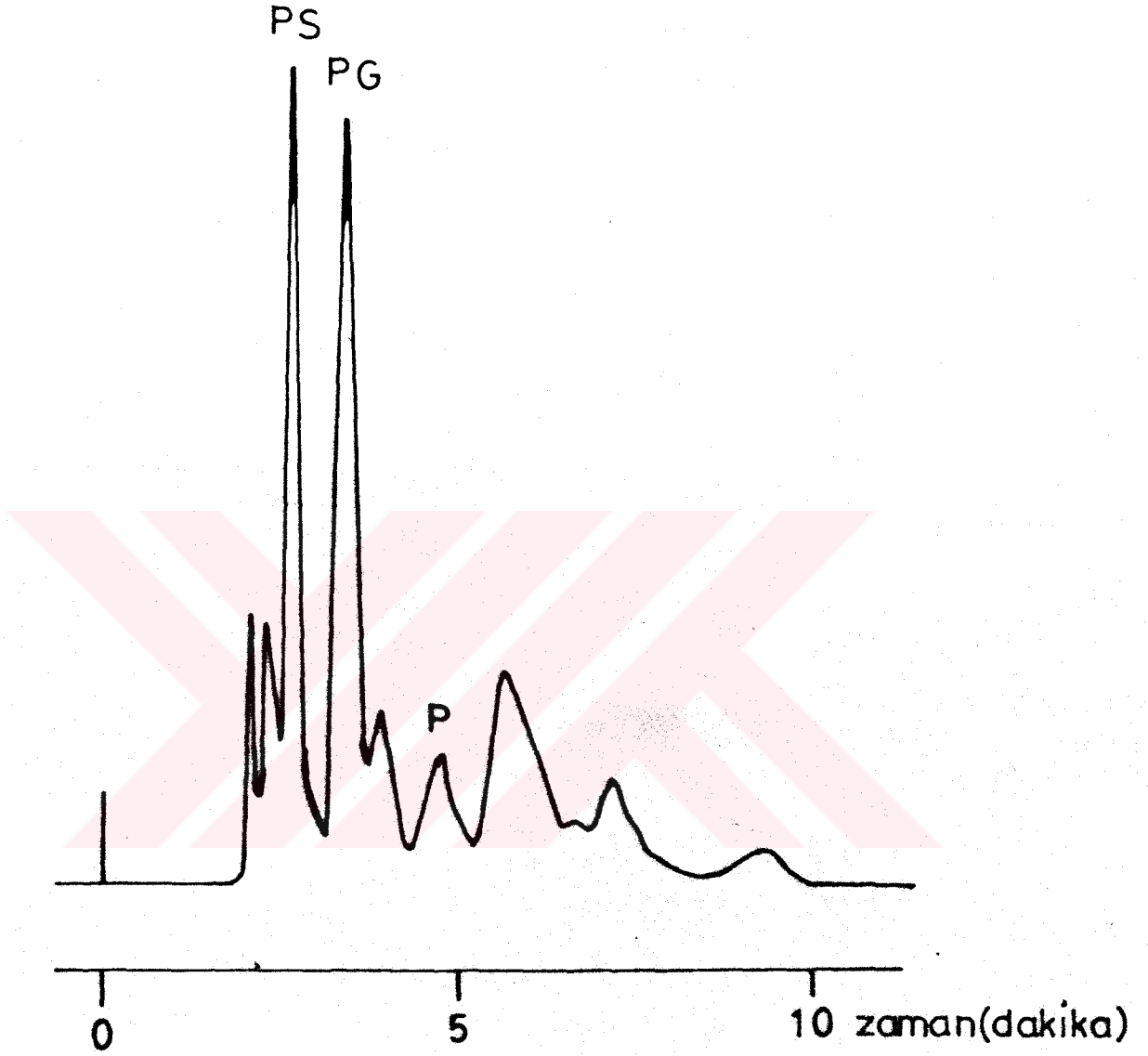
Hastalardan ,gece 24.00'ten sonra hiçbir şey yiyip içmemeleri , sabah saat 08.00'de mesanelerini boşalttıktan sonra bir tablet parasetamol'u su ile almaları (500 mg ,4- acetaminophenol) ve sekiz saat süre ile idrarlarını verilen idrar toplama kaplarında toplamaları istendi. Sabah saat 08.30'dan sonra da vakaların normal yiyip içmelerine mücade edildi.Toplanan idrar numunelerinin hacimleri ölçüldü ve 20 ml örnek alınarak - 20° C'de derin dondurucuda analizler yapılincaya kadar muhafaza edildi. Hastaların herbirinden asparat aminotransferaz alanin aminotransferaz , alkalen fosfataz, albumin ve kreatinin ölçümleri için gebeliğin 32. - 36. haftaları arasında kan örnekleri alındı ve protrombin zamanı ölçüldü.

İdrarda serbet parasetamol, parasetamol sülfat ve parasetamol glukuronat aynı anda yüksek performanslı sıvı kromatografisi (high performance liquid chromatography) yöntemi ile daha önce

Nakamura ve arkadaşlarının (52) tanımladığı şekilde ölçüldü . Mobil fazda LC-XPD pompası ile içersinde değişik büyüklükte silikat kürecikleri bulunan ters fazlı C -18 Boidopak sütün : 3.9 mm X 25 mm kullanıldı. Çözelti akım hızı 1.6 mm / dakika idi. Kayıt için Philips PM 8251 tek kalemli yazıcı kullanıldı (10mm/dakika) .Çözeltiler milipor süzgeçlerden süzüldü (gözenek büyüklüğü 0.45 µm olan aqueous selüloz filtreler) ve kullanılmadan önce nitrojen ile muamele edildiler gazı alındı. Numunelerin her birinden 10 µl 'lik örnekler alınarak 25 µl'lik Hamilton şırınga ile enjekte edildi. Mobil faz %1'lik glasiyal asetik asid (Vol/ vol) / metanol / ethyl asetat (90 / 15 / 0.1) idi (19). Kullanılan bütün çözeltiler yüksek performanslı sıvı kromatografisi için uygun kalitede ,bütün kimyasal maddeler de analitik kalitede idi. Maddelerin tayininde 250 nm (0.32 aufs) ultraviyole spektrofotometre kullanıldı.

Glukuronid oluşumunu göstermek için 1.0 ml idrar 2.2 ml 0.05 mol/l asetat tampon ile (pH 5.0) dilüe edildi ve 1000 ünite sığır karaciğeri beta - glukuronidazı ile inkübe edildi. Parasetamol tayini yukardakine benzer şekilde yapıldı, ancak inkübasyon sırasında glukuronidaz yerine Limpet sülfataz (Patella Vulgata) kullanıldı ve betaglukuronidaz aktivitesini inhibe etmek amacı ile 10 mg D - saccharic acid -1,4 lactone ilave edildi (36). Enzim hidroliz işlemlerinin tamamı 37° C'de 18 saat süre ile yapıldı ve enzimler Sigma Chemical Co Ltd.'ten temin edildi. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi için her bir numuneden 10 µl kullanıldı.

Kalibrasyon eğrisi , dilüe edilmiş normal idrara bilinen miktarlarda parasetamol ilave edilerek hazırlandı ve her bir ilaç konsantrasyonunun oluşturduğu zirve alan (mm²) ölçülerek kalibrasyon eğrisinin elde edilmesinde kullanıldı. Serbest parasetamol ile elde edilen kalibrasyon eğrisi ile, parasetamol sulfatın kalibrasyon eğrisi arasında lineer bir ilişkinin mevcudiyeti daha önce gösterildiğinden , serbest parasetamol kalibrasyon eğrisi hem parasetamol sulfat ve hem de parasetamol glukuronid kalibrasyon eğrisi olarak kullanıldı(52). Örneklerin injeksiyonunu takiben yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (YPSK) elde edilen her bir parasetamol zirvesi için eğri altındaki alandan bir değer elde edildi (Tabanın yarısı X yükseklik). Her bir idrar veya enzim hidroliz örneğinin kalibrasyon eğrisinden elde edilen parasetamol değeri (µl) kullanılarak elde edilen serbest parasetamol, parasetamol glukuronid ve parasetamol sülfat değerleri teker teker hesaplandı ve ayrıca orjinal olarak verilen dozdan elde edilen miktarın yüzdeleri bulundu.Daha sonra da elde edilen metabolitlerin birbirine olan oranları tesbit edildi . YPSK ile elde edilen bir kromatografi örneği şekil - 5 ' görülmektedir.



Sekil 5- Kontrol gebede 500 mgr parasetamol alımından

sonra 0-8 saatlik idrarda yüksek performanslı sıvı

kromatogramı (10 ml enjeksiyon)

PS:parasetamol sülfat PG=parasetamol glukuronit

P= serbest parasetamol

Litokolik asid sülfat ve litokolik asid glukuronat'ın tayini

Bu çalışma altı normal gebede ve gebelik kolestazı olan altı hastada yapıldı. Normal gebelerde karaciğer ve safra yolu hastalığı, veya ailede bilinen bir kolestaz hikayesi yoktu. Mevcut gebelikte bir komplikasyon söz konusu değildi. Ortalama gebelik süresi 35 hafta (süre sınırları 33 - 36 hafta), ortalama yaş 26 yıl (yaş sınırları 19 - 36 yıl) idi . Vakaların hepsi doğumdan sonra dört hafta süre ile takip edildiler.

Gebelik kolestazı olan hastalardan ikisi ilk çocuklarına gebe idiler. Diğer dördünde ise daha önceki gebeliklerinde benzer semptom ve bulgular görülmüştü. Bu hastalarda ortalama gebelik süresi 36 hafta (süre sınırları 30 - 37 hafta), ortalama yaş 30 yıl (yaş sınırları 25 - 39 yıl) idi. Kaşıntı hastaların hepsinde en belirgin semptom idi . Bu hastalardan ikisinde serum alanin transaminaz (ALT), asparat transaminaz (AST) ve alkalin fosfataz orta derecede yüksek idi. Bütün hastalar doğumdan sonra dört hafta süre ile takip edildiler. Anne ve çocuklarda doğum sonu bir komplikasyon tesbit edilmedi. Bütün hastalardan normal diyet almaları ve saat 14.45'te doğum kliniğine gelmeleri istendi. Kan numuneleri önkol veninden saat 15.00'te alındı. Serumlar 3000 devirde 15 dakikalık santrifüjden sonra ayrıldı ve analize kadar -20° C'de derin dondurucuda saklandı. Hastaların hiçbirinde sigara , alkol ve demir preparatı dışında ilaç kullanma hikayesi yoktu .

İşlem:

2 ml serum , 25 ml etanol ve 1 ml 1 M NaOH ile 70° C'de bir saat süre ile ve hyodeoksikolik asid internal standart olarak ilave edildikten sonra inkübe edildi.Stiehl ve arklarının (71) modifiye metodu ile deproteinizasyondan sonra , presipite olan protein çöktürüldü ve süpernatant düz tabanlı bir cam şişede toplandı. Rezidü tekrar 25 ml metanol ile yıkandı ve 70 C'de inkübasyon, santrifüj işlemi ve süpernatantın toplanması işlemi tekrarlandı . Metanollü solüsyon vakumda buharlaştırıldı ve 20 ml distile su içerisinde tekrar eritildi. Solüsyon daha sonra Sep- Pak C 18'den geçirildi, safra asitleri ve diğer steroidler metanol ile ayrıldı. Metanollü solüsyon kuruyuncaya kadar buharlaştırıldı, 20 ml distile suda tekrar eritildi. Solüsyonun pH'sı 0.1 M asetik asid ile 5.6'ya düşürüldü, bundan sonra da 16 saat süre ile cholylglycine hydrolase ile enzimatik hidrolize tabi tutuldu. Enzimatik hidrolizden sonra

solusyonun pH'sı 9'a yükseltildi, sonra Sep - Pak C 18'den geçirildi, safra asitleri ve diğer steroidler bir kere daha metanol ile ayrıldı ve kuruyuncaya kadar buharlaştırıldı. Düz tabanlı balondaki rezidü 200- 500 µl metanol ile eritildi ve işaretlenmiş TLC (ince tabakalı kromatografi) plağı üzerine uygun şekilde emdirildi. Serbest litokolik asid, litokolik asid sülfat ve litokolik asid glukurnat da silika jel TLC plağı üzerine emdirildikten sonra, propionik asid: isoamylasetat: su : n- propanol , (15: 20: 5:10) solusyonu ile birbirinden ayrıldı.

Serbest litokolik asid (sülfat ve glukuronik asid ile konjuge olmamış) , litokolik asid sülfat ve litokolik asid glukuronat kromatografi plağında mobilize oldukları bölge plaklardan iyice kazandıktan sonra metanol ile ekstrakte edildi (2 X 20 ml). Daha sonra metanolik solusyon kuruyuncaya kadar buharlaştırıldı. Sülfatlanmış safra asidi, numuneler 10 ml metanol - aseton (1:9) ile 37° C'de 18 saat süre ile inkübe edilerek solvolize tabi tutuldu (45). Solvolize olmuş numuneler tekrar buharlaştırılarak kurutuldu, esterleri saponifiye etmek amacı ile 5 ml 1 M NaOH'de çözüldükten sonra 80° C'de 18 saat süre ile inkübe edildi . Saponifiye olmuş numuneler 6 M HCL damla damla ilave edilerek asidleştirildi, daha sonrada litokolik asid eterle ekstrakte edildi (3 X 30 ml).

Glukuronize olmuş litokolik asid beta glukuronidaz ile enzimatik hidrolize tabi tutuldu (10 mg, 2740 ünite), (39, 40). Daha sonra rezidü 5 ml sodyum hidroksid solusyonunda çözüldükten sonra (pH 10) 5 ml 0.1 M asetat tampon (pH 4.5) ilave edilerek 37° C'de 18 saat süre ile inkübe edildi. Reaksiyonun sonunda reaksiyon karışımı 6 M HCL ile asidleştirildi ve litokolik asid sülfat'ta olduğu gibi ekstrakte edildi.

Serbest litokolik asid 10 ml distile suda eritildi, 6 M HCL ile asidleştirildi ve yukarda tanımlandığı gibi eter ile ekstrakte edildi.

Litokolik asidin herbir fraksiyonu 60° C'de önce diazometan ile, daha sonra heptofluerobutyrik anhidrid / asetonitrile ile muamele edilerek derivatize edildi. Safra asitleri gaz kromatografi yöntemi ile , taşıyıcı gaz olarak % 3 QF1 columun nitrojen 50 ml / dakika ve hidrojen flame dedektör kullanılarak ölçüldü.

İstatistiksel Analizler

Gurupların biyokimyasal verilerinin karşılaştırılmasında Mann - Whitney U testi , prenatal ve postnatal verilerin karşılaştırılması Wilcoxon t testi kullanıldı. Testlerin anlamlı kabul edilebilmesi için % 95'lik güvenilirlik sınırı esas alındı (73).



BULGULAR

Gebe hastaların bazı klinik özellikleri tablo -1'de gösterildi. İdrarla itrah edilen parasetamol ve parasetamol metabolitleri tablo -2 ve şekil -6'da görülmektedir. Parasetamol sülfatın sekiz saatlik idrarla atılan yüzdesi sağlıklı kadınlarda (gebe değil) 9.2 ± 6 , sağlıklı gebelerde 2.2 ± 1.1 , kaşıntılı gebelerde 1.7 ± 0.8 , gebelik kolestazlılarda 1.8 ± 0.9 idi. Parasetamol sülfatın idrarla atılan yüzdesi gebelik kolestazı dahil her üç gebe hasta grubunda gebe olmayan kontrol kadınlara göre anlamlı olarak daha düşüktü ($P < 0.01$). Parasetamol glukuronat / parasetamol sülfat oranı sağlıklı kadınlarda 0.56 ± 0.6 , sağlıklı gebelerde 4.2 ± 1.4 , kaşıntılı gebelerde 4.0 ± 1.8 , gebelik kolestazında 5.2 ± 3 idi. Parasetamol glukuronat / parasetamol sülfat oranı gebe grubunda gebe olmayana gruba göre anlamlı olarak daha yüksekti ($P < 0.05$). Sülfat konjugasyonundaki azalma glukuronid / sülfat oranındaki artıştan sorumlu idi.

Doğumdan dört hafta sonra beş normal gebede, iki kaşıntılı gebede ve üç gebelik kolestazı vakasında yapılan ikinci ölçümler gebeliğin üçüncü trimestirinde yapılan ölçümlerle karşılaştırıldı. Yapılan karşılaştırmada itrah edilen parasetamol metabolitlerinin miktar ve yüzdeleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı (tablo-3 ve şekil,7,8).

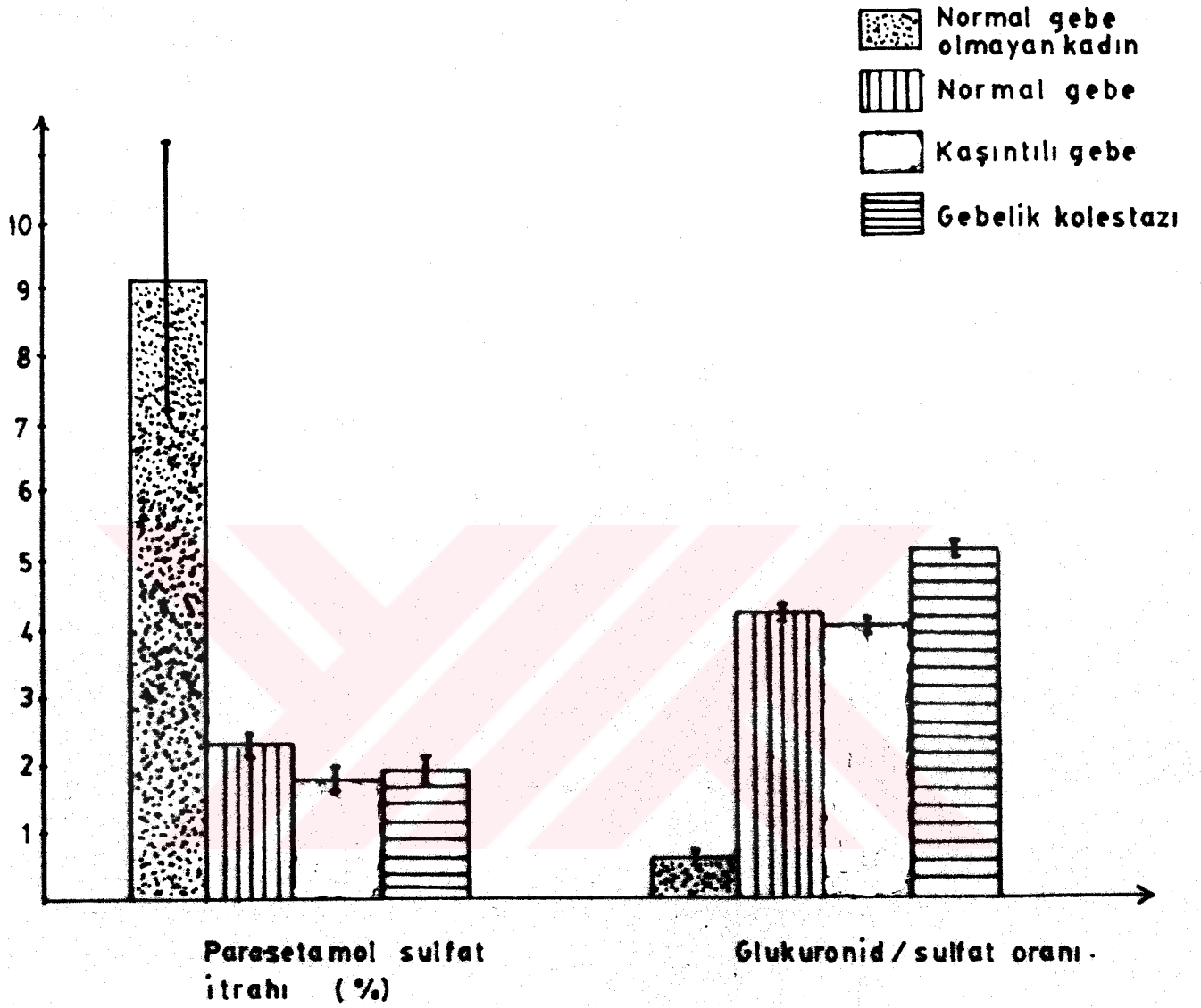
Gebelik kolestazı ile gebelik sırasında kaşıntı arasında ayırım yapılamayan üç vaka çalışmadan çıkarıldı. Bu vakalarda ilk gebelikteki hikaye gebelik kolestazı ile uyumlu idi, ikinci gebelikte gebeliğin 30. haftasından sonra kaşıntı başlamıştı fakat, doğumdan dört hafta sonra azalmakla birlikte kaşıntı kaybolmamıştı. Bu vakalarda parasetamol sülfat / parasetamol glukuronid oranları sırası ile aşağıdaki gibi idi: 51.2, 5.9 ve 5.4.

Tablo - 2. Kontrol ve Gebelik Kolestazlı Gruplarda Atılan Total Parasetamol, Serbest Parasetamol, Serbest Parasetamol / Parasetamol Glukuronat ve Parasetamol Sülfat'ın Yüzdeleri*

Guruplar	Sayı	Total Parasetamol (%)	Serbest Parasetamol (%)	Parasetamol Sülfat (%)	Parasetamol Glukuronat (%)	Glukuronat / Sülfat oranı
Sağlıklı Kadın (Gebe değil)	10	19.3 ⁺ -12.5	3.5 ⁺ -2.1	9.2 ⁺ -6	5.3 ⁺ -8.2	0.56 ⁺ -0.6
Sağlıklı Gebe	14	18.1 ⁺ -10.6	6.1 ⁺ -4.7	2.2 ⁺ -1.1 ^x	9.6 ⁺ -6.3	4.2 ⁺ -1.4 ^x
Kaşıntılı Gebe	7	10.3 ⁺ -2.6	3.6 ⁺ -2.2	1.7 ⁺ -0.8 ^x	5.1 ⁺ -0.7	4.0 ⁺ -1.8 ^x
Gebelik Kolestazı	7	12.6 ⁺ -2.6	3.4 ⁺ -1.3	1.8 ⁺ -0.9 ^x	7.5 ⁺ -2.1	5.2 ⁺ -3 ^x

* Ortalama ± Standart Sapma

X=Gebe olmayanlarla gebe grubunun karşılaştırılmasında fark anlamlı (P<0,01)



Şekil 6. Gebelik kolestazi ve kontrol gruplarında parasetamol sülfat itrahi (%) ve glukuronid /sülfat konjugasyonu oranı.

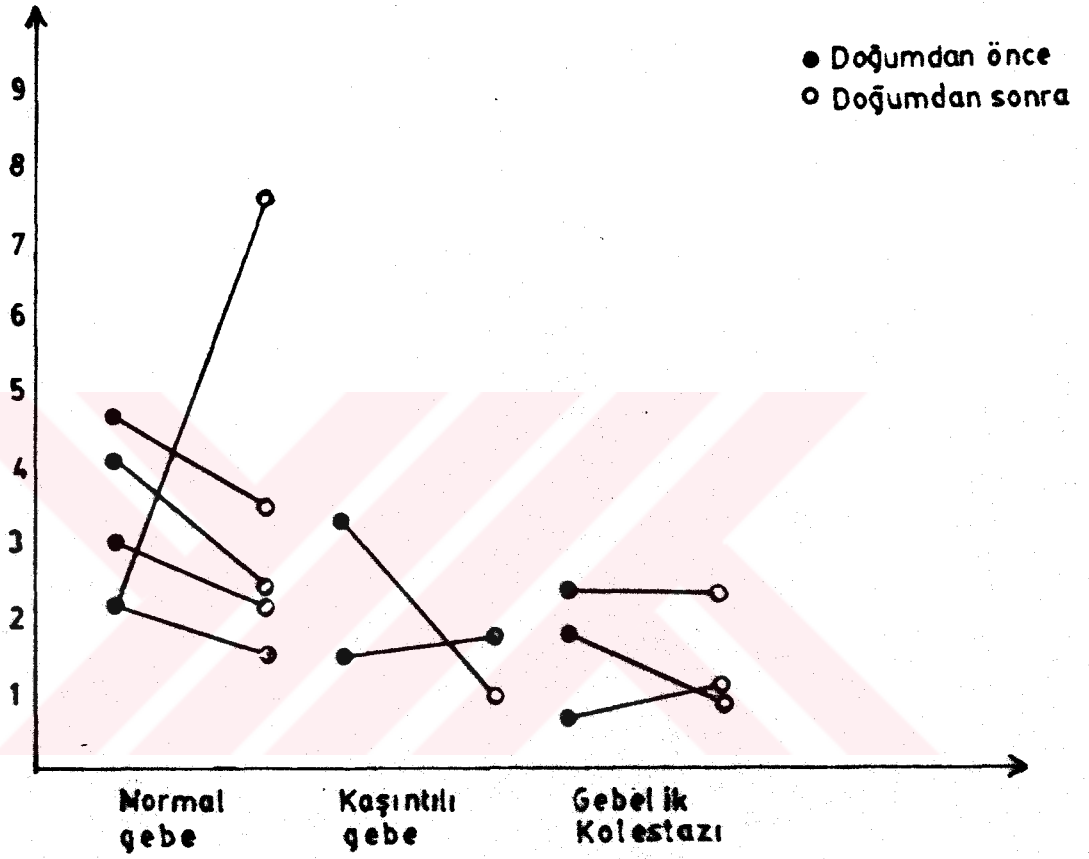
Tablo - 3. Parasetamol ve Parasetamol Konjugatların İdrarla İtrah Yüzdelerinin Doğumdan Önceki Değerleri ile Doğumdan Sonraki Değerlerinin Karşılaştırılması.

Gruplar	Total Parasetamol* (%)		Serbest Parasetamol* (%)		Parasetamol Sülfat*		Parasetamol Glukuronat*		Glukuronat/ Sülfat oranı*		
	Sayı	D.Önce	D.Sonra	D.Önce	D.Sonra	D.Önce	D.Sonra	D.Önce	D.Sonra	D.Önce	D.Sonra
Normal gebe	5	25,5	22,7	7,4	7,4	3,2	3,6	14,9	11,7	4,7	4,3
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		9,5	2,3	3,1	12,1	1,1	2,8	7,1	7,3	1,7	3,3
Kaşıntılı gebe	2	12,7	8,5	5,3	1,7	2,3	1,3	5,2	5,6	2,9	3,9
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		3,5	6	3,5	0,7	1,3	0,7	1,1	4,5	2	1,5
Gebelik kolestazi	3	11,5	10,6	3,1	1,9	1,5	1,8	6,7	7,3	5,8	5,8
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		3,9	4,7	1,4	0,5	0,8	0,4	1,9	4	4,2	3,7

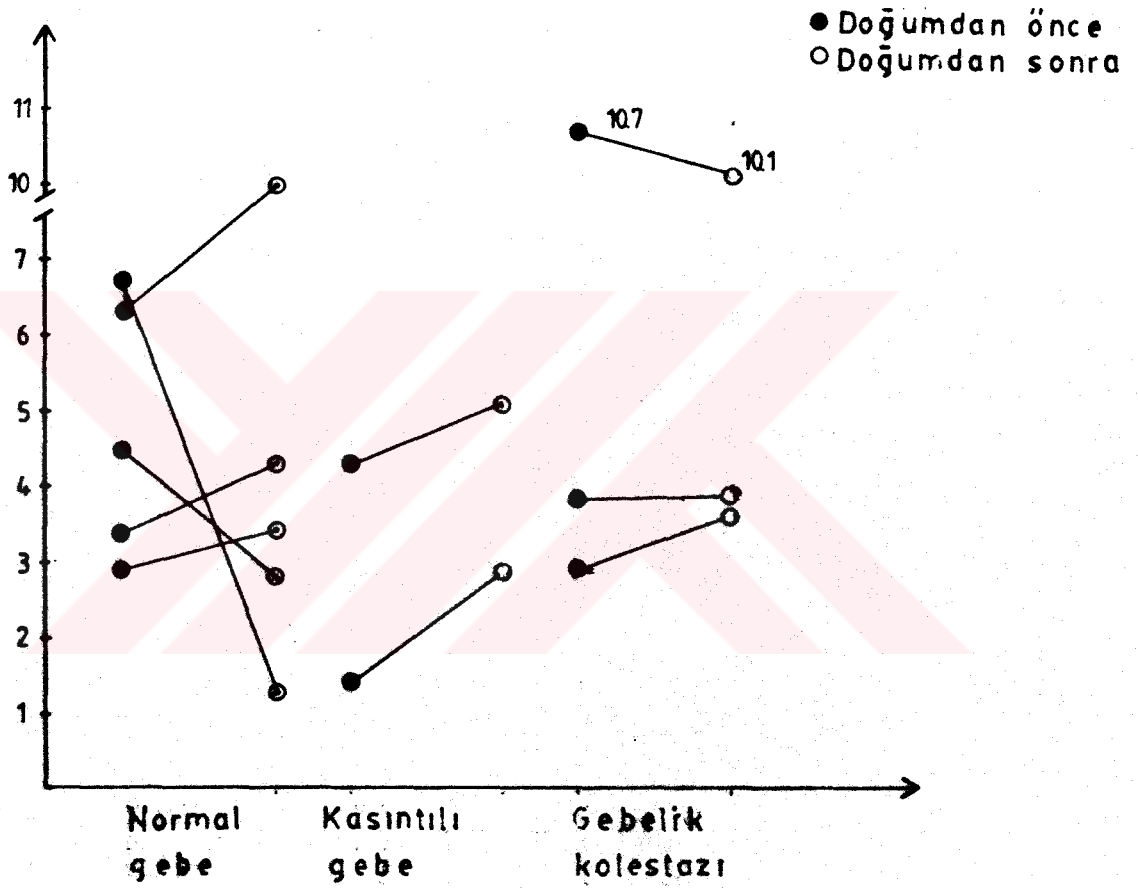
* Ortalama ± Standart Sapma

D.Önce = Doğumdan Önce

D.Sonra = Doğumdan Sonra



Sekil 7. Gebelik kolestazi oluşan hastalarda gebeliğin 3. trimesterinde ve doğumdan 4 hafta sonra idrarda parasetamol sulfat itrahi (%)



Sekil 8. Normal gebelerde, kasıtlı gebelerde ve gebelik kolestazında gebeliğin 3. trimesterinde ve doğumdan 4 hafta sonra idrarda parasetamol glukuronid/parasetamol sülfat oranı.

Normal gebeliği olan altı kadında ve gebelik kolestazı olan altı hastada bulunan **serum serbest litokolik asit, litokolik asid glukuronid ve litokolik asid sülfat** değerleri tablo -4 ve 5 ' te gösterildi. Normal gebe kadınlarda ortalama toplam serum litokolik asit seviyesi $20.87 + 29.05 \mu\text{mol /L}$ (ortalama \mp standart sapma) idi. Altı hastanın ikisinde litokolik asid tesbit edilemedi. Ayrıca glukuronat veya sülfat konjugasyonuna uğramamış litokolik asid (serbest, glysin ya da taurin ile konjuge olmuş litokolik asid) altı hastanın beşinde tesbit edilmedi. Bu hastalardan üçünde bütün litokolik asid glukuronize fraksiyonda idi.

Gebelik kolestazı tesbit edilen altı hastada total litokolik asid seviyesi $87.13 + 44.3 \mu\text{mol /L}$ (ortalama \mp Standart sapma) idi. Bu hastalardan üçünde litokolik asid seviyesi normal gebelere göre aşikar olarak yüksek idi, iki hastada ise litokolik asid seviyesi normal sınırlarda idi. Hastaların birinde çok yüksek olmak üzere iki hastada konjuge olmamış litokolik asid seviyesi yüksek idi. Hastaların dördünde ise serbest litokolik asid tesbit edilmedi. Bu hastalardan ikisinde litokolik asidin tamamı sülfatlanmış fraksiyonda iken , bir hastada da litokolik asidin tamamı glukuronize fraksiyonda idi.

Tablo - 4. Normal Gebe Kadınlarda Serumda Sülfat ve Glukuronik Asid ile Konjüge Olan ve Konjüge Olmayan Litokolik Asid Seviyeleri

Vakalar	Sülfat ve glukuronik asid'le Konjüge olmamış LKA ($\mu\text{mol/L}$)	LKA Glukuronid ($\mu\text{mol/L}$)	LKA sülfat ($\mu\text{mol/L}$)	LKA glukuronid yüzdesi	LKA sülfat yüzdesi	Glukuronat/ sülfat oranı	Toplam LKA ($\mu\text{mol/L}$)
MC	Yok	15.35	Yok	100	100	---	15.35
KU	28.13	3.65	42.27	4.73	58.75	0.08	77.05
AD	Yok	20.87	Yok	100	---	---	20.87
PYD	Yok	8.05	Yok	100	---	---	8.05
SR	Yok	Yok	Yok	---	---	---	---
MK	Yok	Yok	Yok	---	---	---	---

LKA : Litokolik asid
Yok : Tesbit edilemedi

Tablo-5. Gebelik Kolestazlı Hastalarda Serumda Sülfat ve Glukuronik Asid ile Konjüge Olan ve Konjüge Olmayan Litokolik Asid Seviyeleri

Vakalar	Sülfat ve Glukuronik asid'le Konjüge olmalıs LKA ($\mu\text{mol/L}$)	LKA glukuronid ($\mu\text{mol/L}$)	LKA Sülfat ($\mu\text{mol/L}$)	LKA glukuronid yüzdesi	EKA sülfat yüzdesi	Glukuronat/Sülfat oranı	Toplam LKA ($\mu\text{mol/L}$)
SR	Yok	Yok	49.02	---	100	---	49.02
AH	288.58	3.76	15.06	1.22	4.9	0.248	307.40
BY	Yok	1.31	135.58	1.0	99.	0.01	136.89
YS	Yok	Yok	12.43	---	100	---	12.43
AM	9.42	1.67	Yok	15.0	---	---	11.09
EM	Yok	5.94	Yok	100	---	---	5.95

LKA: Litokolik asid

Yok: Tesbit edilemedi

TARTIŞMA

Parasetamol fenil gurubu içeren bir analjezik ve antipiretik ilaçtır, büyük ölçüde karaciğerde metabolize edilir (24,47,58). Hayvanlarda barsak ve böbreklerde de bir miktar metabolize edildiği bilinmektedir (24,25,47,) . İnsanlarda parasetamolün barsaklardaki metabolizması önemli bulunmamıştır (10). Parasetamolün başlıca metabolitleri sülfat ve glukuronid konjugatlarıdır. Sülfasyon kapasitesi yenidoğanlarda erişkinlerden bir miktar daha yüksektir (45). Sağlıklı genç erişkinlerde parasetamolün yaklaşık % 4'ü değişmeden, % 30'u parasetamol sülfat, % 55'i de parasetamol glukuronat şeklinde idrarla 24 saat zarfında itrah edilir (37,45,58).

İnsanlarda tek ve çift yumurta ikizlerinde yapılan çalışmalar, kişilerdeki farklı parasetamol metabolizmasından genetik faktörlerden çok çevresel faktörlerin sorumlu olduğunu telkin etmektedir (49). Hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalar da bedende sülfat miktarının azaldığı durumlarda parasetamolün glukuronidasyonunun hakim duruma geçtiğini, sulfasyonunun ise azaldığını göstermektedir (48,76)

Biz, gebeliğin son üç ayında gebe olmayan kontrol kadınlara göre sülfat konjugasyonunu anlamlı şekilde daha düşük , glukuronat / sülfat oranını ise daha yüksek bulduk. Bu sonuçlar gebeliğin son üç ayında sülfasyondan glukuronidasyona doğru bir kaymanın mevcut olduğunu düşündürmektedir. Ancak aynı parametreler normal gebelerde, kaşıntılı gebelerde ve gebelik kolestazi olan hastalarda incelendiğinde guruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Bu bulgu da sulfasyondan glukuronidasyona doğru olan kaymanın bu üç gebe gurubunda da birbirinden farklı olmadığını düşündürmektedir.

Doğumdan dört hafta sonra aynı test üç gebe gurubunda tekrarlandı. Doğum öncesi ve doğum sonrası değerler arasında da

anlamli bir fark mevcut degildi.

Bu bulgular gebelik sirasinda metabolik yollarda sulfasyondan glukuronidasyona dogru bir kaymanin olabilecegini ve gebeligin sulfat azalmasına yol açabilecegini düşündürmekle birlikte , bunun parasetamol metabolizmasını anlamli şekilde etkilemediğini ve metabolik yollarda parasetamol metabolizması bakımından bu üç gebe gurubunda anlamli bir farkın söz konusu olmadığını düşündürmekte idi .Ancak sulfasyondaki bu azalma temayülünün östrojen metabolizması üzerine olan etkileri de ayrıca incelenmelidir . Gebelik kolestazi tesbit edilen hastalara dışardan östrojen verilmesi ile gebelik kolestazına benzer belirti ve bulgular oluşturulabilmektedir, ancak östrojenin bu kolestatik tabloyu nasıl yaptığını kesin olarak açıklanamamıştır (29, 64). Gebelikte östrojenin başlıca metaboliti östriol -3 sulfat, östriol -3 glukuronat , östriol -3 sulfat -16- glukuronat ve östriol 16 glukuronatdır (35). Kemiricilerde ve maymunlarda yapılan deneysel çalışmalar östrodiolün D-halkasının glukuronat konjugatının kolestaz yaptığını fakat A-halkasının glukuronat konjugatının kolestaz yapmadığını , buna ilave olarak D-halkasının glukuronat konjugatının 3 pozisyonunda sulfatla konjuge olması durumunda bu kolestatik etkisinin ortadan kalktığını göstermiştir (43,44,69). Bu nedenle sulfasyonda bir anomalinin söz konusu olup olmadığını göstermek için östrojen ve metabolitlerinin sulfasyonunun gebeliğin son üç aynda ayrıca incelenmesinin yararlı olacağı kanısındayız.

Gebelerde ve gebelik kolestazında litokolik asid sulfasyon ve glukuronidasyonu:

Litokolik asid (LKA) sekonder bir safra asididir. LKA kolonda kenodeoksikolik asidin bakteriler tarafından 7- alfa dehidroksilasyonu ile oluşur (11). Az miktarda LKA kolondan emilir ve karaciğer tarafından tutularak metabolize edilir. LKA karaciğerde taurin ve glisinle konjuge olabilir, sulfat veya glukuronat ile esterler oluşturabilir, ya da taurin veya glisinden biri ile birlikte sulfat veya glukuronat ile birlikte konjugasyonlar oluşturabilir (71). LKA güçlü bir kolestatik ajandır. İnsanların LKA'in kolestatik ve hepatotoksik etkisinden LKA'in sulfasyonu ile korunduğu ileri sürülmüştür (11,56). Kenodeoksikolik asid ile tedavi edilen hastalarda yapılan bir çalışmada , hepatotoksisitenin LKA'i % 45 veya daha fazla oranda sulfatlayabilen hastalarda anlamli şekilde daha düşük olduğu bildirilmiştir (41) . Daha sonra ratlarda yapılan bir

çalışmada ise glikolitokolik asid sülfatın da kolestatik olduğu fakat taurolitokolik asid sülfatın kolestatik olmadığı bildirilmiştir (80).

Normal gebelerde serum safra asidi seviyesi kenodeoksikolik asid dışında gebe olmayan kadınlarla aynı düzeyde kalır (17,32,39,). Kenodeoksikolik asid ise gebeliğin sonuna doğru artabilir (17). Gebelik kolestazında ise serum safra asidi konsantrasyonu normalin on ile yüz katı artar ve serum safra asidi seviyesindeki artış hastalığın ilk belirtisi olabilir (17,18,31).

Thomassen normal gebelerde ve gebelik kolestazı olan hastalarda 24 saatlik idrarda safra asidi itrahını inceledi (76). Bu çalışmada idrardaki LKA'in tamamının LKA sülfat şeklinde olduğu, normal gebelerde idrarla itrahın total safra asidinin % 6'sını (1.37 $\mu\text{mol} / 24 \text{ saat}$), gebelik kolestazında ise idrarla itrahın total safra asidinin % 2.3'ünü (3.41 $\mu\text{mol} / 24 \text{ saat}$) oluşturduğunu bildirdi. Laatikainen ve arkadaşları(33) da normal gebelerde ve gebelik kolestazında hem anne kanında hem de kordon kanında açlık serum safra asidi konsantrasyonunu incelediler ve gebelik kolestazı gurubunda sülfatlanmamış safra asidi konsantrasyonunun normal gebelerden anlamlı şekilde yüksek olduğunu , normal gebelerde kanda LKA bulamadıklarını, gebelik kolestazında ise kanda düşük seviyede LKA bulduklarını (0.76 + 0.06 $\mu\text{mol} / \text{L}$) bildirdiler .Son zamanlarda Bijleveld ve arkadaşları(6,7) benign tekrarlayıcı intrahepatik kolestazı olan hastaların serumunda kontrollere oranla çok yüksek postpyrandial 3 – alfa hidroksi safra asidi tesbit ettiklerini , bu hastalarda kolik asid ve kenodeoksikolik asid gölcüğünün anlamlı şekilde normallerden daha düşük olduğunu ve dışkı ile safra asidi kaybının da normallere göre daha yüksek olduğunu bildirdiler. Bu veriler benign intrahepatik kolestaz ile gebelik kolestazı arasında yakın bir ilişkinin varlığına dikkat çeken araştırmacıların görüşleri de dikkate alındığında oldukça ilginç görünmektedir(6,12). Biz her ne kadar özel bir diyet vererek postpyrandial bir çalışma planlamadık ise de , hastalar normal öğle yemeğini yedikten yaklaşık iki saat sonra kan örnekleri alındığından ,bir bakıma bizim çalışmamızda da bu çalışmadakine benzer bir uygulama yapılmıştır. Bizim iki hastada tesbit ettiğimiz yüksek LKA seviyesi kan örneklerini postpyrandial dönemde almamızla ilgili olabilir. LKA seviyesi normal kontroller seviyesinde bulunan iki hastanın karaciğer fonksiyon testlerinde aşikar bozukluk mevcuttu. Bu hastalardaki düşük LKA seviyesinin nedeni yerleşmiş kolestaza bağlı olarak safra akımının ve safra asidlerinin sekresyonunun azalması ile de ilgili olabilir.Laatikainen ve arkadaşlarının (32), ve Thomassen'in (76) gebelik kolestazı tanısı koydukları hastalarda LKA seviyesini anlamlı olarak yüksek

bulmamaları da bu hastalarda kolestaz yerleştikten sonra bu incelemenin yapılmış olması veya kan örneklerinin postprandial dönemde alınmamış olması ile ilgili olabilir .

Gebeliğin üçüncü trimestirinde parasetamol sülfasyonundan glukuronidasyonuna doğru bir eğilim tesbit etmemize rağmen , gebelik kolestazında normal gebelerin aksine LKA'in sülfatla konjuge olduğunu gözledik. Balisteri ve arkadaşları (3) da yenidoğan kolestazının prodromal döneminde bizim bulgularımıza göre çok daha düşük seviyede olmakla birlikte ($4.46 + 0.39 \mu\text{mol /L}$), sülfatla konjuge LKA'in daha yüksek olduğunu bildirdiler . Sülfatla konjuge LKA'in serbest LKA ve glisin'le konjuge LKA'e göre daha az toksik olduğu bilinmektedir (41,80). LKA'in sülfatla konjugasyonu fizyolojik koruyucu bir mekanizma olabilir.

Bu hastalarda akılda tutulması gereken diğer önemli bir husus da safra asidi gölcüğünün durumudur . Safra asidi gölcüğündeki azalmanın LKA toksisitesini artırdığı bilinmektedir (31) . Ayrıca kedi ve farelerde gebeliğin son trimestirinde safra asidi gölcüğünün normalin yaklaşık %65'i seviyesine düştüğü gösterilmiştir (42 , 59) .Normal gebe kadınlarda safra asidi gölcüğünün normal olduğu rapor edilmiştir (26), ancak gebelik kolestazı olan hastalarda safra asidi gölcüğünün durumu bilinmemektedir. Gebelik kolestazı gelişen hastalarda semptomların üçüncü trimestirde ortaya çıkışı, serum LKA seviyesinin artmasına ek olarak total safra asidi gölcüğünün gebeligin son trimestirine doğru azalması ile de ilgili olabilir.

Sonuç olarak, parasetamol metabolizması sülfasyon ve glukuronidasyon kapasitesinin göstergesi olarak kabul edilirse, gebelik sırasında sülfasyondan glukuronidasyona doğru bir meyil olduğu, muhtemelen sülfat depolarının azalması nedeni ile gebelikte glukuronidasyonun daha hakim duruma geldiği söylenebilir. Ancak bulgularımız parasetamol metabolizmasındaki bu değişimin bütün gebeler için söz konusu olduğunu , gebelik kolestazı oluşan hastalarla, normal gebeler arasında bu açıdan anlamlı bir farkın mevcut olmadığını telkin etmektedir.

Gebelik kolestazı tanısı konulan altı hastanın dördünde serum LKA seviyesi normal gebelere göre belirgin şekilde yüksek idi ve kolestatik tablonun tam yerleşmediği iki hastada postprandial serum litokolik asid seviyesindeki yükseklik çok daha belirgin idi. Normal gebelerde serbest litokolik asid tesbit edilemezken , gebelik kolestazı tesbit edilen iki hastada serumda serbest litokolik asidin yükseldiği gözlemlendi. Serumdaki yüksek LKA'in de daha çok LKA sülfat

şeklinde olduğu tesbit edildi. Bu veriler literatür ışığında değerlendirildiğinde , serumdaki yüksek LKA seviyesinin gebelik kolestazının patogeneğinde rol oynaması muhtemel gibi görünmektedir. Konunun aydınlığa kavuşması için daha fazla hastanın incelenmesine ihtiyaç olduğu kanısındayız.



SONUÇLAR

Bu çalışma gebelik kolestazlı hastalarda karaciğerin sülfasyon ve glukuronidasyon kapasitesindeki bir bozukluğun ve litokolik asid konjügasyonundaki bir defektin hastalığın fizyopatolojisindeki rolünü araştırmak amacı ile planlandı.

Parasetamol test ilacı olarak kullanılmak sureti ile karaciğerin sülfasyon ve glukuronidasyon durumu gebe olmayan sağlıklı 10 vakada, gebelik kolestazlı 7 hastada, 14 normal gebede ve gebelik sırasında kaşıntısı olan 7 vakada , gebeliğin 32. – 38. haftaları arasında ve doğumdan dört hafta sonra incelendi. Ayrıca gebelik kolestazlı altı hastada ve sağlıklı altı gebe kadında gebeliğin üçüncü trimestirinde postpyrandial serum serbest litokolik asid, litokolik asid sülfat ve litokolik asid glukuronat seviyeleri ölçüldü.

Parasetamol sülfatın idrarla itrah edilen yüzdesi gebe olmayan sağlıklı kadınlarda 9.2 ± 6 , sağlıklı gebelerde 2.2 ± 1.1 , kaşıntılı gebelerde 3.6 ± 2.2 ve gebelik kolestazında 3.4 ± 1.3 idi. Parasetamol sülfatın idrarla itrah edilen yüzdesi gebe kadınlarda sağlıklı gebe olmayan kadınlara göre anlamlı olarak daha düşüktü ($P < 0.01$). Parasetamol glukuronat / parasetamol sülfat oranı sağlıklı gebe olmayan kadınlarda 0.56 ± 0.6 , sağlıklı gebe kadınlarda 4.2 ± 4 , kaşıntılı gebe kadınlarda 4.0 ± 1.8 , gebelik kolestazlı hastalarda 5.2 ± 3 idi . Parasetamol glukuronat / parasetamol sülfat oranı her üç gebe gurubunda da sağlıklı gebe olmayan kadın gurubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti ($P < 0.05$), ve sülfat konjügasyonundaki azalma glukuronat / sülfat oranındaki artıştan sorumlu idi.

Her üç gebe gurubu birbiri ile karşılaştırıldığında guruplar arasında idrarla itrah edilen parasetamol glukuronat yüzdesi, parasetamol sülfat yüzdesi ve parasetamol glukuronat /

parasetamol sülfat oranı bakımından fark anlamlı bulunmadı ($P > 0.05$). Bu bulgular gebelik sırasında karaciğer metabolizmasında sülfasyondan glukuronidasyona doğru bir kaymanın olduğunu düşündürmekte idi. Gebelik kolestazlı hastalar ile normal gebeler karşılaştırıldığında sülfasyon ve glukuronidasyon durumları bakımından arada anlamlı bir farkın olmadığı görüldü ($P > 0.05$). Ayrıca gebe kadınlarda doğumdan dört hafta sonra yapılan ölçümlerde karaciğerin sülfasyon ve glukuronidasyon durumunda anlamlı bir değişikliğin olmadığı görüldü .

Sonuç olarak bulgularımız gebe kadınlarda karaciğerde sülfat konjügasyonunun azaldığını glukuronat konjügasyonunun arttığını ancak bu değişikliğin gebelik kolestazlı hastalarda normal gebelerden farklı olmadığını telkin etmektedir.

Gebeliğin 32. – 38. haftaları arasında postpyrandial olarak alınan serum örneklerinde normal gebelerde total litokolik asid seviyesi $20.87 + 29.05 \mu\text{mol /L}$, gebelik kolestazlı hastalarda ise $87.13 + 44.3 \mu\text{mol /L}$ idi. Gebelik kolestazlı hastaların ikisinde litokolik asid seviyesi normal gebelerden aşikar olarak yüksek idi, bir hastada normallerin ortalamasından belirgin olarak daha yüksekti, üç hastada ise normal sınırlarda idi. Normal gebelerde serumda serbest litokolik asid tesbit edilemez iken gebelik kolestazlı iki hastada serumda serbest litokolik asid seviyesi yüksek bulundu . Normal gebelerin üçünde litokolik asidin yüzde yüzü glukuronat ile konjüğe olmuştu. Gebelik kolestazlı üç hastada ise litokolik asidin yüzde yüze yakını sülfatla konjüğe olmuştu. Bu bulgular anormal litokolik asid metabolizmasının gebelik kolestazının patogeneğinde rol oynayabileceğini düşündürmekte idi. Konunun aydınlatılabilmesi için daha fazla hastada prospektif çalışmanın yapılmasına ihtiyaç olduğu kanısındayız.

ÖZET

Parasetamolün sülfat ve glukuronid konjugatları 10 sağlıklı kadında (gebe olmayan), 14 normal gebede, 7 kaşıntılı gebede ve gebelik kolestazlı 7 hastada yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ölçüldü. Parasetamol sülfat itrahi sağlıklı kadınlarda 9.2 ± 6 , sağlıklı gebelerde 2.2 ± 1.1 , kaşıntılı gebelerde 1.7 ± 0.8 , gebelik kolestazlı hastalarda 1.8 ± 0.9 idi. Gebe olmayan kadın gurubu diğer üç gebe gurubu ile karşılaştırıldığında, parasetamol sülfatın idrarla atılan yüzdesi anlamlı şekilde düşüktü ($P < 0.01$). Parasetamol glukuronid / parasetamol sülfat oranı sağlıklı kadınlarda (gebe olmayan) 0.56 ± 0.6 , sağlıklı gebelerde 4.2 ± 1.4 , kaşıntılı gebelerde 4.0 ± 1.8 , gebelik kolestazlı hastalarda 5.2 ± 3 idi. Glukuronid / sülfat oranı gebe guruplarında gebe olmayan normal kadınlardan anlamlı ölçüde daha yüksekti ($P < 0,01$). Üç gebe gurubu birbiri ile karşılaştırıldığında itrah edilen sülfat konjugatının yüzdeleri ve parasetamol glukuronid / sülfat oranı bakımından anlamlı bir fark bulunmadı.

Gebelik kolestazlı altı hastada ve altı sağlıklı normal gebede postpyrandial olarak serumda litokolik asid sülfat , litokolik asid glukuronat ve serbest litokolik asit (sülfat ve glukuronik asid ile konjuge olmamış litokolik asid) seviyeleri gaz kromatografi yöntemi ile ölçüldü. Ölçümler bütün hastalarda gebeliğin 32.- 38. haftaları arasında yapıldı. Sağlıklı gebe kadınlarda ortalama total litokolik asid (LKA) seviyesi $20.8 + 29 \mu\text{mol} / \text{L}$ (ortalama \pm standart sapma) idi. Altı hastanın üçünde LKA'in tamamı glukuronik asid ile konjuge olmuştu. İki hastada ise LKA gösterilemedi. Gebelik kolestazlı hastalarda ise total LKA seviyesi $87 + 113.65 \mu\text{mol} / \text{L}$ idi (ortalama \pm standart sapma). Altı hastanın üçünde LKA'in tamamı yakın bir bölümü LKA sülfat fraksiyonunda idi. Total LKA seviyesi karaciğer fonksiyon testleri normal olan üç

hastada yüksek , karaciğer fonksiyonları bozuk olan iki hastada ise düşüktü. Normal gebeliği olan 6 hastanın beşinde ve gebelik kolestazi olan atı hastanın dördünde serbest LKA gösterilemedi.

Sonuç olarak gebelik sırasında karaciğerde sülfat konjügasyonunun azaldığı , glukuronid konjügasyonunun ise arttığı tesbit edildi. Ancak sülfasyondaki bu azalma bakımından gebelik kolestazi ile diğer gebeler arasında anlamlı bir fark tesbit edilmedi.

Gebelik kolestazi tanısı konulan altı hastanın dördünde serum LKA seviyesi normal gebelere göre belirgin şekilde yüksekti ve kolestatik tablonun tam yerleşmediği iki hastada postpyrandial serum LKA seviyesindeki yükseklik çok daha belirgin idi. Normal gebelerde serumda serbest LKA tesbit edilmezken gebelik kolestazılı iki hastada serum serbest LKA seviyesinin yüksek olduğu görüldü. Literatür ışığında değerlendirildiğinde postpyrandial yüksek serum LKA seviyesinin gebelik kolestazının patogenezinde rol oynaması muhtemel görünmektedir.

SUMMARY

The urinary excretion of paracetamol and its glucuronid and sulfate conjugates were measured in 10 normal nonpregnant women, 14 healthy pregnant women, 7 pregnant women with itching and 7 patients with cholestasis of pregnancy. Following an oral dose of 500 mg paracetamol, urine was collected for 8 hours and free paracetamol, paracetamol glucuronid and sulfate were measured by HPLC.

Comparing the nonpregnant control women with healthy pregnant, itchy pregnant and cholestasis of pregnancy groups percentage of urinary excretion of paracetamol sulfate was significantly low in pregnant group than nonpregnant control group (9.2 ± 6 vs 2.2 ± 1.1 , 1.7 ± 0.8 , 1.8 ± 0.9), ($P < 0.01$) and glucuronid / sulfate ratio was significantly low in nonpregnant control group than healthy pregnant, itchy pregnant and cholestasis of pregnancy groups (0.56 ± 0.6 vs 4.2 ± 1.4 , 4.0 ± 1.8 , 5.2 ± 3.0), ($P < 0.01$). Among three pregnant groups there was not significant difference in percentage of sulfate conjugates and glucuronid / sulfate ratios.

In six normal healthy pregnant women and six patients with cholestasis of pregnancy postprandial serum sulfated lithocholic acid (LCA), glucuronidated LCA and non sulfated non glucuronidated LCA levels were measured by gas chromatography. All subjects were studied between 32 and 38 weeks of gestation. In healthy pregnant women mean total LCA level was 20.8 ± 29 $\mu\text{mol} / \text{L}$ (mean \pm SD). In 3 of 6 normal pregnant women almost all of the LCA was in glucuronidated fraction. In 2 of 6 normal pregnant women LCA was not detected. In patients with cholestasis of pregnancy total LCA level was 87.13 ± 113.65 $\mu\text{mol} / \text{L}$ (mean \pm SD). In 3 of 6 patients almost all of the LCA was in sulfated fraction. In three patients with cholestasis of pregnancy with normal liver function tests total LCA levels were high, but in two patients with abnormal liver function tests total LCA levels were low. In 5 of 6

normal pregnant women and 4 of 6 patients with cholestasis of pregnancy nonsulfated , nonglucuronidated LCA were not detected .

As a result we conclude that there is a tendency towards the glucuronidation during 3rd trimestir of pregnancy and this may occur due to sulfate pool depletion. This decreased sulfation capacity was not significantly different in patients with cholestasis of pregnancy comparing with other pregnant groups.

In 4 of 6 patients with cholestasis of pregnancy serum pospyrandial LCA levels were significantly higher than normal pregnant group and higher levels of LCA were more striking in 2 patients with normal liver function tests. We could not detect any free LCA in normal pregnant group but free LCA levels were higher in two patients with cholestasis of pregnancy . If we look at the results in the light of the literature high postpyrandial LCA levels may play an important role in the pathogenesis of cholestasis of pregnancy. Further study is necessary.

KAYNAKLAR

1. Adlercreutz H, Tenhunen R. Some aspects of the interaction between naturel and synthetic female sex hormones and liver. *Am J Med*, 49: 629-648, 1970
2. Adlercreutz H, Tikanen MJ, Wichmann K, et al. Recurrent jaundice in pregnancy . IV Quantitative determination of urinary and biliary estrogens , including studies in pruritis gravidarum. *J Clin Endocrinol Metab*, 38: 51 - 57, 1974
3. Balisteri WF, Suchy FJ, Farrel MK, et al. Pathologic versus physiological cholestasis : Elevated serum concentration of secondary bile acid in the presence of hepatobiliary disease. *J Pediatr*, 98: 399-402, 1981
4. Belanger PM, Lalande M, Labreque G, et al. Diurnal variations in the transferases and hydrolases involved in glucuronide and sulfate conjugation of rat liver. *Drug Metab Dispos*, 13: 386-389, 1985
5. Berg B, Helm G, Petershon L, et al. Cholestasis of pregnancy . *Acta Obstet Gynecol Scand*, 65: 107 -113, 1986
6. Bijleveld CMA, Vonk RJ, Kuiper F, et al. Benign recurrent intrahepatic cholestasis : Altered bile acid metabolism. *Gastroenterology*, 97: 427-432, 1989
7. Bijleveld CMA, Vonk RJ, Kupier F, et al. Benign recurrent intrahepatic cholestasis: A long - term follow up study of two patients. *Hepatology*, 9: 532-537, 1989
8. Caldwell J, Daviess S, Boote DJ et al. Interindividual variation in the sulphation and sulphate conjugation, in *Sulphate Metabolism*, edited by Mulder GJ, Caldwell J, Van Kemper GM, Vonk RJ . Taylor

and Francis Ltd, London, 1982, pp 251 - 261

9. Cowen AE, Korman MG, Hofmann AF, et al. Metabolism of lithocholate in healthy man I. Biotransformation and biliary excretion of intravenously administered lithocholate , litho - cholyglycine , and their sulfates . *Gastroenterolgy*, 69: 67 - 76, 1975
10. Cowen AE, Korman MFG, Hofman AG, et al. Metabolism of lithocholate in healthy man. II. Enterohepatic circulation . *Gastroenterol*, 69 : 76 - 86, 1975
11. Clement JA, Critchley JAJH and Prescott LF. The role of sulphate conjugation in the metabolism and disposition of oral and intravenous paracetamol in man . *Br J Clin Pharmacol* , 18: 481 -485, 1984
12. De Pagter AGF, Van Berge Henegouwen GP, Ten Bokkel Huinink JA, et al. Familial benign recurrent intrahepatic cholestasis . Interrelation with intrahepatic cholestasis of pregnancy and oral contraceptives?, *Gastroenterology*, 71: 202-207, 1976
13. De Witt EH, Lack L. Effects of sulfation patterns on intestinal transport of bile salt sulfate esters . *Am J Physiol*, 238: 634 - 639, 1980
14. Forrest JAH , Clements JA, Prescott LF. Clinical pharmacokinetics of paracetamol . *Clin Pharmacokinetics*, 7: 93- 107, 1982
15. Frohling W, Stiehl A. Bile salt glucuronides: Identification and quantitative analysis in the urine of patients with cholestasis. *Eur J Clin Invest*, 6: 67 - 74, 1976
16. Galeazzi R and Javitt NB . Bile acid excretion : The alternative pathway. *J Clin Invest*. 60: 693 - 701, 1977
17. Heikkinen J, Maentausta O, Ylostalo P et al. Changes in serum bile acid concentration during normal pregnancy , in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy and in pregnant women with itching . *Br J Obstet Gynaecol*, 88: 240- 245, 1981
18. Heikkinen J. Serum bile acids in the early diagnosis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Obstet Gynecol*, 61:

581-587, 1983

19. Howie PI, Andriaenssens PI and Prescott LF. Paracetamol metabolism following overdose: application of high performance liquid chromatography. *Pharm Pharmac*, 29 : 235 - 237, 1977
20. Iglesias J, Galan G, Guerrero B, et al. Pruebas de madurez fetal, resolucion del parto y resultados del recién nacido en 91 casos de colestasia intrahepatica del embarazo. *Rev Chil Obstet Ginecol*, 41: 278 - 284, 1976
21. Ikonen E. Jaundice in late pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*, Supp 5: 43, 1964
22. Jensen RT, Davis RA and Kern F JR. Increased sulfation and decreased 7 alfa - hydroxylation of deoxycholic acid in ethynil estradiol induced cholestasis in rats. *Gastroenterol*, 73: 314-320, 1972
23. Johnson P, Samsioe G, Gustafson A. Studies in cholestasis of pregnancy . I Clinical aspects and liver function test. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 54: 77-84, 1975
24. Jones DP, Sundby G-B, Ormstad K, et al. Use of isolated kidney cells for study of drug metabolism. *Biochem Pharmac*, 28: 929-935, 1979
25. Josting D, Winne D, Bock KW. Glucuronidation of paracetamol , morphine and 1- naphtol in the rat intestinal loop. *Biochem Pharmac*, 25: 613-616, 1976
26. Kern F, Everson GT, DeMark B, et al. Biliary lipids , bile acids, and gallbladder function in the human female . *J Clin Invest*, 68: 1229 -1242, 1981
27. Kostler H , Halsema I, Scholtens E, et al. Kinetics of sulfation and glucuronidation of harmol in the perfused rat liver. Disappearance of aberance in glucuronidation kinetics by inhibition of sulfation . *Biochem Pharmacol*, 31: 3023 - 3028, 1982
28. Kreek MJ, Weser E, Slaisenger MH, et al. Idiopathic cholestastasis of pregnancy. The response to challenge with the

synthetic estrogen, ethynilestradiol. N Engl J Med, 277:
1391-1395,1967

29. Kreek MJ. Female sex steroids and cholestasis. Sem Liver Dis, 7:
8-23, 1987
30. Krijgheld KR, Schodltens E, Mulder GJ: The dependence of the
rate of sulfate conjugation on the plasma concentration of
inorganic sulfate in the rat in vivo. Biochem Pharmacol, 31 (
24): 3997 - 4000, 1982
31. Kuipers F, Havinga R, Vonk RJ. Cholestasis induced by sulphated
glycholithocholic acid in the rat : Protection by endogenous
bile acids. Clinical Science, 68: 127- 134, 1985
32. Laatikainen T, Ikonen E. Serum bile acids in cholestasis of
pregnancy . Obstetrics Gynecol, 50: 313-318, 1977
33. Laatikainen T, Lehtonen P, Hessoss AE. Fetal sulfated and
nonsulfated bile acids in intrahepatic cholestasis of pregnancy.
J Lab Clin Med, 92: 185- 193, 1978
34. Laatikainen T, Lehtonen P, Hesso A. Biliary bile acids in
uncomplicated pregnancy and in cholestasis of pregnancy. Clin
Chim Acta , 85: 145 - 150, 1978
35. Levitz M, Kadner S, Young BK. Intermediary metabolism of
estriol in pregnancy. J Steroid Biochem , 20: 971-974,1984
36. Levvy GA. The preparation and properties of beta -
glucuronidase . Biochem J, 52: 464 - 472, 1952
37. Levy G, Khanna NN, Soda DM et al. Pharmacokinetic of
acetaminophen in the human neonate : formation of
acetaminophen glucuronide and sulfate in relation to plasma
bilirubine concentration and d- glucaric acid excretion .
Pediatrics , 55: 818-825, 1975
38. Levy G. Sulfate conjugation in drug metabolism : Role of
inorganic sulfate . Federation Proc, 45: 2235 - 2240, 1986
39. Lunzer M, Barnes P, Byth K et al. Serum bile acid concentrations
during pregnancy and their relationship to obstetric cholestasis.

Gastroenterology, 91: 825-829, 1986

40. Makino I, Hashimoto H, Shinozaki K, et al. Sulfated and nonsulfated bile acids in urine, serum and bile in patients with hepatobiliary disease. *Gastroenterol*, 68: 545 - 553, 1975
41. Marks JW, Seu SQ, Pearlman BJ, et al. Sulfation of lithocholate as a possible modifier of chenodeoxycholic acid elevation of serum transaminase in patients with gallstone. *J Clin Invest*, 68: 1190 - 1196, 1981
42. Mc Sherry CK, Deitrick JE, May PS, et al. Biliary lipid metabolism in the pregnant baboon. *Surgery Gyneocol Obstet*, 144: 727 - 733, 1977
43. Meyers M, Slikker W, Pascoe G, et al. Characterization of cholestasis induced by estradiol -17-B-D glucuronide in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 214: 87-93, 1980
44. Meyers M, Slikker W, Vore M. Steroid D-ring glucuronides: characterization of a new class of cholestatic agents in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 218: 63-73, 1981
45. Miller RP, Roberts RJ, Fisher LJ. Acetaminophen elimination kinetics in neonates, children, and adults. *Clin Pharmacol Ther*, 19: 284-294, 1976
46. Mitchell JR, Thorgeirsson SS, Potter WZ, et al. Acetaminophen - induced injury: Protective role of glutathion in man and rationale for therapy. *Clin Pharmacol Ther*, 16: 676 - 684, 1974
47. Mitchell JR, Mc Murtry RJ, Statham CN et al. Molecular basis for several drug induced nephropathies. *Am J Med*, 62: 518-526, 1977
48. Morris ME, Levy G. Serum concentration and renal excretion by normal adults of inorganic sulfate after acetaminophen, ascorbic acid or sodium sulfate. *Clin Pharmacol Ther*, 33: 529 - 536, 1983
49. Nachy RM. Source of interindividual variations in acetaminophen and antipyrine metabolism. *Clin Pharmacol*

Ther, 36: 417-430,1984

50. Nair PP, Gordon M, Reback J. The enzymatic cleavage of the carbon - nitrogen bond in 3 alpha, 7 alpha, 12 alpha - Thirihydroxy - 5 B - Cholan 24- olyglycine. J Biol Chem, 242: 7-11, 1967
51. Nair PP, Garcia C. A modified gas liquid chromatographic procedure for the rapid determination of bile acids in biological fluids . Annal Biochem, 29: 164- 171, 1969
52. Nakamura J, Baba S, Nakamura T , et al. A Method for the preparation of calibration curves for acetaminophen glucuronide and acetaminophen sulfate in rabbit urine without use of authentic compounds in high performance liquid chromatography. J Pharmacobio - Dyn , 10 : 673 - 677, 1987
53. Nash RM, Stein L, Penno BM, et al. Impairment of hepatic drug metabolism in patients with acute viral hepatitis. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 7: 255 - 258, 1982
54. Oelberg DG, Chari WV, Little JM, et al. Lithocholate glucuroide is a cholestatic agent. J Clin Invest, 73: 1507- 1514, 1984
55. Pacifici GM, Back DJ, Orme ML. Sulphation and glucuronidation of paracetamol in liver: assay conditions . Biochem Pharm, 37 (22): 4405 - 4407, 1988
56. Palmar RH, Bolt MG. Bile acid sulfates. I Synthesis of lithocholic acid sulfate and their identification in bile. J Lipid Res, 12: 671-679, 1971
57. Parmentier G, Eyssen H. Synthesis and charecteristics of the specific monosulfate of chenodeoxycholate , deoxycholate and their taurine and glycine conjugates . Steroids , 30: 583- 590, 1977
58. Prescott LF. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. Br J Clin Pharmac, 10: 291S - 298S, 1980
59. Radberg G, Friman S, Samsice G, et al. Enterohepatic bile acid circulation in the pregnant cat. Acta Physiol Scand, 133: 19-24, 1988

60. Reyes H, Aburto H, Ribalta J. Jaundice due to gestagens . Rev Med Chile, 106: 85-90, 1978
61. Reyes H, Taboada G, Ribalta J. Prevalance of intrahepatic cholestasis of pregnancy in La Paz , Bolivia. J Chronic Dis, 32: 499 - 504, 1979
62. Reyes H, Ribalta J, Gonzalez MC, et al. Sulfabromphtalein clearence tests before and after ethinyl estradiol administration in women and men with familial history of intrahepatic cholestasis of pregnancy. Gastroenterol, 81: 226-231, 1981
63. Reyes H. The enigma of intrahepatic cholestasis of pregnancy: Lessons from chile. Gastroenterology, (8 2): 87-96, 1982
64. Schreiber AJ, Simon FR. Estrogen - induced cholestasis : clues to pathogenesis and treatment . Hepatology , 3: 607- 613, 1983
65. Sherlock S. Bile Metabolism. Diseases of the liver and biliary system , 8th ed , Blackwell Scientific Pub, Oxford, London, Edinburg, 1989, pp 25 - 28
66. Shively CA, Vesell ES. Temporal variations in paracetamol and phenacetin half - life in man. Clin Pharmac Ther, 18:413 - 424, 1975
67. Sieger C-P, Loeser W, Gieselmann J et al. Biliary and renal excretion of paracetamol in man. Pharmacol , 29: 301 - 303, 1984
68. Sjövall J, Sjövall K. Steroid sulphates in plasma from pregnant women with pruritus and elevated plasma bile acid levels . Ann Clin Res, 2: 321- 338, 1970
69. Slikker W, Vore M, Bailey JR, et al. Hepatotoxic effects of estradiol -17-B-D glucuronide in the rat and monkey. J Pharmacol Exp Ther, 225: 138-143, 1983
70. Steventon G, Williams AC, Waring RH et al. Xenobiotic metabolism in motorneuron disease . Lancet, ii: 644 - 647, 1988

71. Stiehl A, Earnest DL, Admيران WH. Sulfation and renal excretion of bile salts in patients with cirrhosis of the liver. *Gastroenterology* , 68: 534-544, 1975
72. Stiehl A, Raedsch R, Rudolph G, et al. Analysis of bile acid glucuronides in urine: group separation on a lipophilic anion exchanger. *Clin Chim Acta*, 123: 275- 285, 1982
73. Sümbülođlu K, Sümbülođlu V. Önemlilik testleri. *Biyoistatistik. Çađ Matbası ,Ankara,S 48, 1987*
74. Svanborg A. A study of recurrent jaundice in pregnancy . *Acta Obstet Gynecol Scand*, 33: 434 - 444, 1954
75. Swenny DJ, Reinke LA. Sulfation of acetaminophen in isolated rat hepatocyte. Relation to sulfate ion concentrations and intracellular levels of 3'- phosphoadenosine -5' phosphosulfate. *Drug Metabol Dispos*, 16: 712-715, 1988
76. Thomassen PA. Urinary bile acids in late pregnancy and in recurrent cholestasis of pregnancy. *Eur J Clin Invest*, 9: 425-432, 1979
- 77 . Tikkanen MJ, Adlercreutz H. Recurrent jaundice in pregnancy III. Quantitative determination of urinary estriol conjugates, including studies in pruritis gravidarum. *Am J Med*, 54: 600 - 604, 1973
78. Van de Straat R, Vuromans RM, Bosman P, et al. Cytochrom P 450 - mediated oxidation of substrates by electron - transfer; role of oxygen radicals and of 1- and -2 electron oxidation of paracetamol. *Chem - Biol Interactions* , 64: 267 - 280, 1988
79. Vickers CR, Steventon G, Mills CO, et al. Metabolism of paracetamol in patients with primary biliary cirrhosis . *Clinical Science* , 76, Supp 20: 40, 1989
80. Yousef IM, Tuchweber B, Vonk RY, et al. Lithocholate cholestasis. Sulfated glycholithocholate induced intrahepatic cholestasis in rats . *Gastroenterology*, 8: 233- 241, 1981