

**DIETİLSTİLBESTROL UYGULANAN
SIÇANLARIN KARACİĞERLERİNDE BAZI ENZİM AKTİVİTELERİ
İLE HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ***
**An examination of liver enzymes and histopathological changes
in rats affected by diethylstilbestrol**

İsmihan GÖZE¹, Fahrettin GÖZE², Esin YILDIZ³

Özet

Amaç: Araştırmada dietilstilbestrol'un (DES) sıçan karaciğerinde bazı enzim parametreleri üzerindeki etkileri ile histopatolojik yönden olası değişimleri izlemek amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Gebe sıçanlara gebeliğin 2. gününden itibaren 19 gün süreyle 0,4 mg/ g / gün (yaklaşık 60 mg/ sıçan) dozunda DES oral gavaj yoluyla verildi. Denek anne sıçanlar gebeliğin son günü servikal dislokasyonla öldürüldü. Anne sıçanların karaciğerlerinden hazırlanan homojenatta alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH), gama glutamik transferaz (GGT), alkalen fosfataz (ALP), aspartat aminotransferaz (AST) ve glutatyon-S-transferaz (GST) enzim aktiviteleri ölçüldü. GST aktivitesi spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Diğer tüm enzim aktiviteleri ise Ciba Corning Express Plus otoanalizörde ölçüldü. Histopatolojik inceleme rutin yöntemle yapıldı, ışık mikroskopisi ile değerlendirildi.

Bulgular: Sonuçlar, kontrol grubu sıçanların enzim aktivite sonuçları ile karşılaştırıldı. Yapılan istatistiksel analizde, deneklerin enzim aktivite ölçümleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında karaciğerde ALP (u=36;p<0,05), ALT (u=36;P<0,05), AST (u=36;P<0,05), LDH (u=32;P<0,05) enzim aktiviteleri yönünden gruplar arası fark istatistiksel yönden anlamlı (p<0,05) bulunurken diğer parametrelerde anlamlı fark bulunamadı (p>0,05). Histopatolojik incelemede anne sıçanların karaciğerlerinde yaygın bulanık şişme ve reaktif Kupffer hücre hiperplazisi yanısıra bazı örneklerde (3/6) fokal nekrozlar bir örnekte de perivenöz iltihap dikkati çekti. Yavrularda ise yaygın bulanık şişme tarzında dejeneratif değişiklikler, hiperemi ve ekstramedüller hematopoiesis kalıntıları görüldü.

Sonuç: Morfolojik ve biyokimyasal etkileşimin süreye ve doza bağlı olduğu düşünüldü.

Abstract

Purpose: In this study, we aimed to observe possible changes in enzymatic parameters, and histopathological effects on the rat liver tissues caused by diethylstilbestrol (DES).

Material and Method: Diethylstilbestrol at the dose of 0.4 mg/ g/ day (≈60 mg/ rat) had orally been given to the pregnant rats starting from the second day of the pregnancy for 19 days by oral gavage. Mother rats were killed by cervical dislocation on the last day of pregnancy. In prepared homogenates from liver tissues alanin amino transferase (ALT), laktate dehidrogenase (LDH), alkaline fosfatase (ALP), gamma glutamik transferase (GGT), aspartat aminotransaminase (AST) enzymes were measured by Ciba Corning Express Plus autoanalyzer. GST enzyme was studied by spectrophotometric assay. Histopathological examination was performed by a routine method using light microscope.

Results: Statistically significant differences were found in liver ALT (U= 36; p<0,05), LDH (U=32;p<0,05), AST (U=36; p<0,05) and ALP (U=36;p<0,05) in the experimental group compared to control rats. Other enzyme activities did not show any significant differences between the two groups (p>0,05). Histopathological examination generally revealed diffuse hydropic degeneration and reactive Kupffer cell hyperplasia. Focal necrosis and perivenous inflammatory infiltration were occasionally seen in livers of mother rats. In the offsprings, diffuse hydropic degeneration, hyperemia and remnants of extramedullary hematopoiesis were observed.

Conclusion. Morphological and biochemical interaction in rat livers after DES administration could be time and dose depend.

Anahtar Kelimeler: Dietilstilbestrol; Enzimler; Karaciğer; Patoloji

Key Words: Diethylstilbestrol; Enzymes; Liver; Pathology

*XVIII. Gevher Nesibe Tıp Günleri, 18-20 Mayıs 2000, Kayseri Cumhuriyet Üniversitesi SİVAS Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Biyoloji. Y.Doç.Dr.¹, Tıp Fakültesi. Patoloji. Prof.Dr.², Y.Doç.Dr.³.

Geliş tarihi: 11 Temmuz 2000

İlk sentezlendiğinden beri hayvancılık ve klinik alanda geniş kullanım sahası bulan dietilstilbestrol (DES) nonsteroid yapıda bir östrojendir (1). Abortusu engellemek için ilaç formunda pek çok gebe kadın tarafından kullanılmıştır (2).Fetal dönemde DES'e maruz kalan kız çocuklarda

puberte sonrasında vagina ve servikte adenozis görülmüş, normal populasyonda az rastlanan berrak hücreli adenokarsinoma riskinin fazla olduğu bulunmuştur (3,4). Ayrıca hepatoselüler karsinoma ve hemangiosarkoma vakaları da rapor edilmiştir (5-7). İntrauterin dönemde DES ile karşılaşan kızlarda yapılan bir çalışmada ise bunlarda normal populasyona göre spontan abortus, ektopik gebelik ve erken doğum riskinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (8). Gebelikte DES alan kadınlarda meme kanseri riskinin arttığı iddiası halen tartışmalıdır (9). Son yıllarda yapılan bir araştırmada ise gebelik süresince DES verilen kadınlarda meme kanseri, ovaryum ve endometriyum kanserleri oranının normal populasyona göre fazla olmadığı bildirmekte ve DES'in risk oranını sanıldığı kadar yükseltmemiş olabileceği söylenmektedir (10). Birçok ülke DES'in karsinojenik etkilerinin tesbitinden sonra kanatlılarda ve sığırlarda anabolizan olarak kullanımını sınırlandırmış ve etlerdeki kalıntı düzeylerini kontrol altına almıştır (1,11). Ülkemizde ise bu işlem yalnızca ithal edilen canlı hayvanlarda ve etlerinde anabolizan varlığı aranması suretiyle yapılmaktadır. Ayrıca 1734 sayılı Yem Yönetmeliğine göre yemlere anabolizan ilavesi yasak olmasına rağmen bazı yemlerde DES varlığı saptanmaktadır (12,13). Dolayısı ile karsinojenik etkili DES ve metabolitleri besin zinciri yolu ile binlerce insana ulaşmaktadır.

DES 'in enzimlere etkisi üzerine de birçok araştırmalar mevcuttur. Adenozin deaminaz (14-16), peptidil arjinin deaminaz, peroksidaz (17,18) gibi enzimlerle DES ilişkisi incelenmiş organizmaya alınan DES' in bazı dokularda yağlanmayı artırdığı, kan lipid oranlarında artışa neden olduğu bildirilmiştir (17-20)

Araştırmamızda, karsinojenik etkilerinin olduğu bildirilen DES' in gebe sıçanlarda karaciğer enzimleri üzerine etkisini ve anne sıçanlar ile fetal dönemde DES'e maruz bırakılan fetuslarda olabilecek histopatolojik değişimlerini izlemek amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

Araştırmaya Cumhuriyet Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezinden sağlanan dört haftalık 100-150 gr. ağırlığında altı adet denek ,altı adet kontrol toplam on iki sıçan (*Rattus Norvegicus* var.albino) kullanılarak başlandı. Sıçanlara standart yem verildi. Üç dişi bir erkek sıçan birarada bırakıldı ve dişilerin gebeliği vaginal plak ile saptandı. Gebe sıçanların ağırlıkları gebeliğin ilk gününden itibaren tesbit edildi. Ondokuz gün süre ile günlük ağırlık artışına bağlı olarak doz ayarlandı ve ortalama 0,4 mg/g/gün (en fazla doz 60 mg/ sıçan) dozunda 0,2 ml. mısır yağında çözündürülen DES oral gavaj yolu ile sıçanlara verildi. Kontrol grubunda da aynı sayıda gebe sıçan kullanıldı ve sadece 0,2 ml. mısır yağı oral gavaj ile verildi. Ortalama 0,4 mg/g/gün (en fazla doz 60 mg/sıçan) olarak seçilen doz tesbiti ise literatür taramalarının yanısıra (21-23) yaptığımız ön araştırmada gebelerin yaşatılabildiği en yüksek doz olarak belirlendi. Denek ve kontrol gruplarındaki sıçanlar doğumu takiben servikal dislokasyonla öldürüldü. Denek ve kontrol gruplarında altışar adet anne sıçanın ve her annenin ikişer yavrusunun (12 denek, 12 kontrol toplam 24 yavru) karaciğerleri alındı. Anne sıçanların karaciğerinin bir parça kısmı enzim araştırması için ayrıldı. Kalan parça ile yavruların tüm karaciğerleri histopatolojik değerlendirmede kullanıldı.

Biyokimyasal çalışma için anne sıçanların karaciğerleri 0,15 M KCl ile yıkanıp tartıldı. Bir gramlık parçalar alınıp homojenize edildi. 1:3 ağırlık/ hacim oranında 0,15 M KCl ilave edildi ve teflon cam homojenizatörde (B.Braun) 1400 devir/dakika hızla üç vuruş yapıp parçalandı. Elde edilen homojenat soğutmalı ve vakumlu (Beckman model J 2j) santrifujde 4800 g'de 15 dakika santrifuj edildi. Elde edilen supernatanda Glutasyon-S-transferaz (GST) enzim aktivitesi glutasyon ile substrat olarak kullanılan madde arasında tiyoeter bağı oluşumunu 340 nm' de spektrofotometrik olarak ölçümü ile saptandı (24). Alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH), gama glutamiktransferaz (GGT), alkalen fosfataz

(ALP), aspartat aminotransferaz (AST) enzimlerinin aktivite değişimleri ise yine supernatanda Ciba Corning Express Plus otoanalizöründe bioklinikadan temin edilen standart otoanalizör kitleri kullanılarak ölçüldü (25). İstatistiksel analiz ise Mann-Whitney "u" testi ile yapıldı (26).

Histopatolojik inceleme rutin yöntemlerle yapıldı. Anne ve yavru sıçanlardan alınan doku numuneleri rutin takip işleminden sonra hematoksilen-eozin (HE) yöntemi ile boyanıp ışık mikroskobu ile incelendi.

BULGULAR

Gebeliğin ikinci gününden itibaren ondokuz gün DES verilen sıçanların enzim aktivite değerlerinin istatistiksel analiz verileri Tablo 1'de verilmiştir.

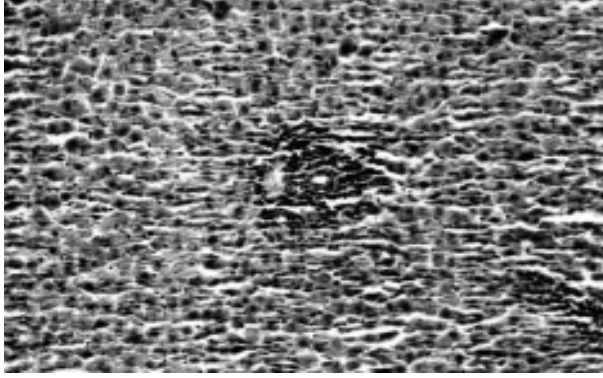
Denek ve kontrol grubu gebe sıçanların karaciğer homojenatında ölçülen enzim aktivite değerleri Mann-Whitney "u" testi ile karşılaştırıldığında,

ALT (U=36;p<0,05), AST (U=36;p<0,05), ALP (U=36;p<0,05) ve LDH (U=32;p<0,05) aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim izlendi. GST ve GGT aktivitesinde anlamlı değişim bulunamadı. Anlamlı bulunan ALP ve AST aktivitelerinin kontrol grubu değerlerine göre arttığı ve LDH ile ALT enzimlerinin aktivasyon değerlerinin kontrol değerlerine göre anlamlı azaldığı gözlemlendi.

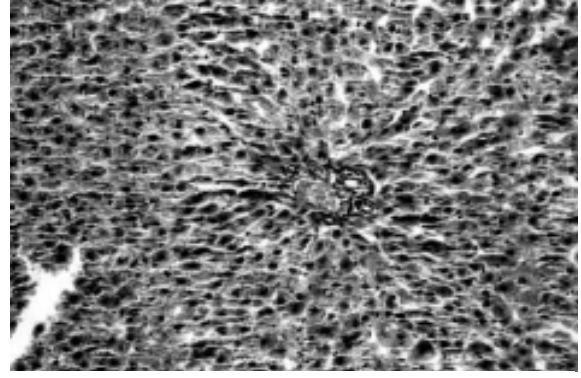
Histopatolojik incelemede ise, DES alan annelerin karaciğerinde bulanık şişme, Kupffer hücre hiperplazisi ortak bulgular olarak görüldü. Ayrıca deneklerin üçünde fokal hücre nekrozu, birinde de perivenöz santral venler çevresinde iltihabi hücre toplulukları görüldü. On iki adet denek yavru histopatolojik olarak incelendiğinde on'unda kısmen kuvvetli bulanık şişme, hepsinde az veya çok ekstramedullar hematopoiesis bulguları ve kalıntıları görüldü. Birisi ise tamamen otolitik değişikliğe uğramıştı. Son örnekte belirgin portal alanlarla sınırlı, oldukça yoğun iltihabi hücre infiltrasyonu ile intralobüler hücre nekrozları ve Kupffer hücre hiperplazisi görüldü. (Resim 1- 2).

Tablo I. Denek ve kontrol grubu sıçanların karaciğerleri arasında enzim aktivitelerinin değerlendirilmesi

Enzimler		Med	Min	Max	Sonuç
Glutasyon S transferaz, GST	D	30	20	45	U= 24;p>0,05
U/ mg- protein	K	39	15	49	
Gamaglutamil transferaz,GGT	D	12,5	10,0	14,0	U=28;p>0,05
U/ mg- protein	K	16,5	10,1	21,9	
Alkalen fosfataz ,ALP	D	340	320	430	U=36;p<0,05
U/ mg- protein	K	90	30	110	
Alanin amino transferaz, ALT	D	18.950	17.900	19.200	U =36;p<0,05
U/ mg- protein	K	73.500	68.000	76.150	
Aspartat amino transaminaz, AST	D	31.000	29.280	34.000	U= 36;p<0,05
U/ mg- protein	K	18.000	12.000	28.000	
Laktat dehidro- genaz,LDH	D	81.000	77.650	123.000	U= 32;p<0,05
U/ mg- protein	K	200.000	110.600	300.800	



Resim 1. Karaciğer dokusunda bir portal alanda lamina limitans'a sınırlı yoğun mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu ve sağ alt köşede tek hücre nekrozu (HEX100)



Resim 2. Karaciğer dokusunda V. Centralis çevresinde ışın tarzında uzanan Remak kordonları arasında hiperplastik-hipertrofik Kupffer hücreleri, arada degeneratif-regeneratif hücreler (HEX100)

TARTIŞMA

DES östrojenik aktivitesi nedeni ile endojen ve eksojen östrojenlerin etkisini artırır (27) Hormon reseptör kompleksi çekirdekte kromatin ile etkileşip RNA polimeraz enzim aktivitesini ve RNA sentezi ile protein sentezini hızlandırır (28-31). DES karaciğerde glukuronik asitle DES glukuronat konjugatını oluşturur. Bu konjugat kısmen safra ve idrar ile atılır. Önemli bir kısmı ise safra üzerinden enterohepatik dolaşıma geçer (28). DES'in genotoksik metaboliti DES-4-4 quinone'un tümör oluşum insidansını yükselttiği bildirilmektedir (31) Ayrıca anabolik steroidlerin hedef organlarının timus, kemik iliği, karaciğer olduğu belirlenmiş olup karaciğerde sentrolobüler nekroz ve sinusoidal değişimlere yol açtıkları, vücutta uzun süre kalabilmelerinden dolayı karaciğer kanseri riskini yükselttikleri de iddia edilmektedir (32-34) Nagae ve ark (18) sıçan karaciğerine östrojenlerin etkisi ile ilgili yaptıkları araştırmada ALT ve LDH inhibisyonu bildirmişlerdir. Oral kontraseptif steroidlerin ise AST ve ALP değerlerini yükselttiği bilinmektedir (35) . Bulgularımız literatürde verilen ALT , LDH değeri inhibisyonu ve AST ile ALP değeri aktivasyonu bilgileri ile paraleldir.

DES alan annelerin karaciğerlerinde dikkati çeken en önemli bulgu, bulanık şişme tarzındaki

karaciğerin subletal zedelenmesini gösteren hafif morfolojik dejeneratif değişikliklerdir. Bunun yanısıra üç denekte tek hücre nekrozu ile karakterize fokal hepatik değişiklikleri ve bir denekte de santral venler çevresinde iltihabi hücre toplulukları görülmüştür. Buradaki tek hücre nekrozu akut hepatit başlangıcı bulgusu olarak değerlendirilirse, literatürde akut, kronik ve kolestatik hepatit nedeni olan aspirinden verapamil'e kadar uzanan yaklaşık 100 ilaçlık geniş spektrum içerisinde DES yoktur (36). Ancak burada ve yeni araştırmalarda DES ve benzeri anabolizanlar ve kontraseptif steroidler ile karaciğerde mutad dışı bir lipodistrofinin endikatörü olan mikrovasküler yağlanma (33) pür kolestazın prototipini temsil eden minimal portal inflamasyonla veya hepatosit zedelenmesi ile birlikte olabilen kanaliküler kolestaz (37), sarılık (38) ayrıca periportal sinüzidal dilatasyon (36) , siroz ve peliosis hepatitis (39) vasküler değişiklikler (40) adenom ve karsinomlar (hepatosellüler ve kolenjiokarsinom) (41-44) tarif edilmiştir Hepatit bulguları günümüzde kronik hepatitlerin sınıflandırılmasında kullanılan Knodell histolojik aktivite indeksinin " intralobuler dejenerasyon ve fokal nekroz " değişiklikler bölümündeki sadece 1 skora karşılık gelen " hafif değişiklikler" yani lobüllerin 1/3 'den azını tutan değişiklikler niteliğindedir. Bu değişiklikler bulanık şişme ile

birlikte değerlendirildiği zaman kısa süreli ilaç uygulamasına bağlı hepatik toksisite bulguları olarak düşünülebilir.

Güncel araştırmalara konu olan DES, insanları intrauterin dönemden başka besin zinciri yolu ile de tüm yaşam boyunca etkilemeye devam etmektedir. Ulaşabildiğimiz literatür taramalarında, doğrudan DES uygulanmasının ve fetal dönemde DES'e maruz bırakılmanın çeşitli tiplerde kanserlere neden olduğu rapor edilmektedir (1-8). Ancak yeni bir araştırmada ise DES ile kanser ilişkisinin, normal populasyon riskinin üzerinde olmadığı şeklinde görüşler ortaya çıkmaktadır (10). Araştırmamızda ise anne ve yavrulara yalnızca 19 gün süre ile DES verilmiş ve karsinojenik etki saptanmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Bozkurt M. Hayvan ürünlerinde anabolik (hormon) rezütləri ve ulusal yasal düzenlemeler, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 1988; 45; 260-287
2. Bracbill Y. Berndes H.Y. Dangers of DES. *Rewiew of a 1953 paper.Lancet (letter)* 1978;2:520
3. Herbst AL. Behavior of estrogen associated female genital tract cancer and its relation to neoplasia following intrauterine exposure toDES. *Gynecol Oncol.* 2000; 76(2):147-56
4. Matias Guiu X. Clear cell tumors of the female genital tract. *Semin Diagn Pathol.*1997; 14 (4):233-9
5. Hoch-Ligeti C. Angiosarcoma of the liver associated with DES. *JAMA* 1978; 240:1510-1511.
6. Ishak KG. Hepatic neoplasms associated with contraceptive and anabolic steroids. *Recent Result Cancer Res.*1979; (66):73-128.
7. IARC monograf on the carcinogenic risk of chemicals to humans: sex hormon 1979;(II) 21.
8. Kaufman R.H. Adam E. Hatch E. Noller K. Herbst A.L. Palmer JR. Hoover RN. Continued follow- up of pregnancy outcomes in DES-exposed offspring. *Obstet Gynecol* 2000;96 (4):483-9.
9. Colton T. Greendberg R. Noller K. Breast cancer in mother prescribed DES in pregnancy. *JAMA*, 1993; 28. Vol 269:2096-2100
10. Titus-Ernstoff L. Hatch E E. Hoover RN. Palmer J. Greenberg ER. Ricker W et all. Long term cancer risk in women given DES during pregnancy. *Br J Cancer*, 2001 Jan 5;84 (1):126-33.
11. Anonim. IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risk of chemical to human, World Health Organization, Ed; IARC Working group on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans: sex hormon 1971;(II) 21
12. Ersoy E. Aghte O. Ergun ŞH. Etlik piliçlerde DES yönünden ön çalışmalar, A.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi 1988; 35 (2,3):1-20.
13. Ersoy E. Aghte O. Ergun H. Sel T. The determination of DES in the feaches and tissues of chickens treated with DES in the feaches and tissues sample of calves,lamps and chicens collected from various areas of Turkey.A.Ü.Veteriner Fakültesi Dergisi 1992;35(2-3):215-231.
14. Göze İ. Yelkovan İ. Bakır S. Dietilstilbestrolün adenozin deaminaz aktivitesine etkisi. *Tr J Biol.* 1996; 20:179-182.
15. Göze İ. Çolak A. Gebelik döneminde DES verilen fareler ve yavrularında ADA enzim aktivitesi ile kromozomal değişimler ve MspI enzimi ile bant alanlarının saptanması. *Türk Ekopatoloji Dergisi.*1996; 2(3-4):73-78.
16. Göze İ. Bakır S. Yelkovan İ. Adenosine deaminase activity in DES administered rat and their offspring. *T J Med Res.* 1996;14 (4):125-127.
17. Nagta S. Yamagima M. Inove K. Estrogen regulates peptidilarginin deaminase levels in rat pituatry cell line in culture. *J Cell Physiol.*1990;145:333-339.
18. Nagee G. Miyamoto M. Miyamoto H . Effect of estrogen on liver plasma membrane in rats, *Toxicol Sci.*1992; 17(4); 185-195.
19. Kohisgashi K. Fukuda Y. Imura H. Inhibitory effect of tamoxifen on DES promoted hepatic tumorigenesis in male rats and its possible mechanism of action. 1988; 79 (11):1335-1339.

20. Arora VK, Bhatia A, Sood K. Synergistic promotor effect of DES and phenobarbitone in DENA induced hepatic neoplasia in rats .I J Med Res.1989; 90(5):9-16.
21. Ekmekci A, Menevşe A, Menevşe S. Fare kemik iliği hücrelerinde DES ve vinblastinin indüklediği sayısal ve yapısal kromozom anomalileri ve bunlar üzerinde prostoglandin E1'in azaltıcı etkisi, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 1989; 46 (1) ; 17-28,
22. Dellarco VL ,Mavourin KH, Tice R. Aneuploidy and health risk assesment: current status and future directions, Environ Mutagen 1985; 7: 405-424,
23. Sakakibara Y, Saito I, Ichimoseki K, Oda T, Kaneko M. Effect of DES and its methyl ethers on aneuploidy induction and microtubule distribution in Chine hamster V79 cells, Mutat Res. 1991; (263): 269-276.
24. Habig WA, Tabst MS, Jacoby WV. Glutatyon S transferase Biochem.1974;7130-7134.
25. Ciba-Corning. Application Guide, 1993; 25066x Rev.C 2/93.
26. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. Biyoistatistik. Özdemir Yayıncılık.Ankara. 1993,pp 145-148.
27. Rico AG, Burgat-Sacaze V, Braun JP. Metabolism of endogeneous and exogeneous anabolic agents in cattle. In Anabolic Agents in Beef and Veal production Proceedings of a Workshop Held at Burussels.1981; (5, 6). 4556.
28. Şener S. Hayvansal ürünlerde kalıntı, TÜBİTAK , Veteriner ve Hayvancılık Özel İhtisas Komisyonu Raporu, Ankara ,1994.
29. Kidson C, Kirby KS. Selective lteration of Mammalian m-RNA synthesis; Evidence for differantial action of hormones gene transcription. Nature 1964 ; 4945 (203); 599-603.
30. Grodsky GM. Chemistry and Function of the hormones:I. Thyroid, pancreas,adrenal and gastrointestinal tract In: Harper's review of Biochemistry. 18 th.ed. Maruzen Asian Edition. 1981,pp 497-498.
31. Liehr JG. Vitamin C reduced the incidence and severity of renal tumor induced by estradiol or DES. Am. J of Clin Nutr1991;54 (6 suppl) 1256-1260.
32. Barnes DW, Page DG, Duke SS, White KL. Subchronic toxicology of DES in the mouse. Drug Chem Toxicol.1983; (6/5) 455-85.
33. Coe JE. Estrogen- induced hepatic toxicity and hepatic cancer: differences between two closely related hamster species. Liver.1998; Oct.,18 (5):343-51.
34. Coe JE. Estrogen induction of hepatocellüler carcinomas in Armenian Hamsters. Hepatology 1990; Apr;11(4):173-9
35. Bloodworth JM. Endocrine pathology general and surgical. Sec.edition.William-Wilkins Baltimore/ London 1982, pp
36. Lee RG. Diagnostic Liver Pathology Mosby Co. St Louis, Baltimore, Boston, Chicago, London, Madrid, Philedelphia, Sydney, Toronto..1994 pp 341-378.
37. Zimmerman HJ, Lewis JH. Drug induced cholestasis. Med. Toxicol.1987 2 :112-160.
38. Lieberman DA, Keeffe EB, Stenze P. Severe and prolonged contraceptive jaudince. J Clin Gastroenterol. 1984;6: 145-148.
39. van Erpecum KJ, Janssens AR, Kreuning J. Generalited peliosis hepatitis and chirrosis after long- term use of oral contraceptives . Am J Gastroenterol. 1988; 83:572-575.
40. Valla D, Le MG, Poynard T. Risk of hepatic vein thrombosis in relation to recent use of oral contraceptives .A care-control study. Gastroenterology. 1986; 90:807-811.
41. Rooks JB, Ory HW, Ishak KG. Epidemiology of hepatocellüler adenoma: the role of oral contraceptive use. JAMA. 1979; 242 :644-648
42. Littewood E, Barrison I, Murray- Lyon IM. Cholangiocarcinoma and oral contraceptives. Lancet 1980; 1:310-311
43. Goodman ZD, Ishak KG. Hepatocellüler carcinoma in women; probable lack of etiologic assosiation with oral contraceptive steroids. Gastroenterology 1982; 2: 440-444.
44. Neuberger J, Forman D, Doll R. Oral contraceptives and hepatocellüler carcinoma. Br Med J.1986; 292: 1355-1357.