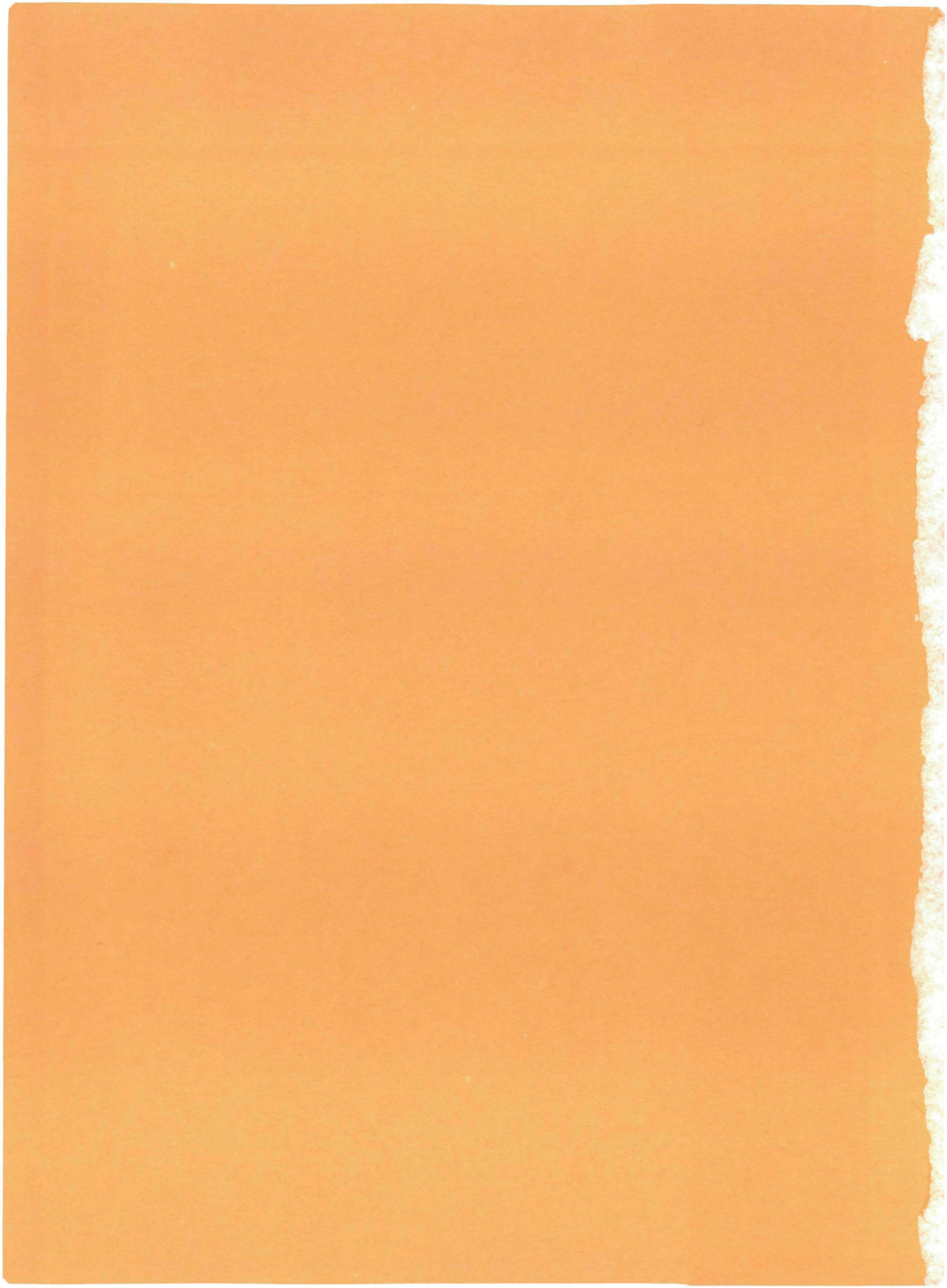


1885

GALZUREN en CHOLESTASE

Galzuurbepalingen in serum, gal en urine met behulp van de gaschromatograaf bij patiënten met cholestase.

G.P. VAN BERGE HENEGOUWEN



voor Maria, Mark en
Klaartje.

Promotor: Dr. J. H. M. van Tongeren

Coreferent: Dr. K-H. Brandt

Dit proefschrift werd bewerkt in de afdeling Inwendige Geneeskunde en in het Laboratorium voor Wetenschappelijk Onderzoek van het Gemeente Ziekenhuis te Arnhem.
De Gezondheidsorganisatie T.N.O. en de stichting "De Drie Lichten" verleenden subsidie voor dit onderzoek.

GALZUREN en CHOLESTASE

Galzuurbepalingen in serum, gal en urine met behulp van de gaschromatograaf bij patienten met cholestase.

BILE ACIDS and CHOLESTASIS

Analyses of bile acids in serum, bile and urine using gas-liquid chromatography in patients with cholestasis (with a summary in english).

Proefschrift ter verkrijging van de graad van doctor in de geneeskunde aan de Katholieke Universiteit te Nijmegen, op gezag van de Rector-Magnificus Prof Mr F J F M Duynstee, volgens besluit van het College van Decanen in het openbaar te verdedigen op vrijdag 25 oktober 1974, des namiddags te 4 00 uur

Door

Gerard Pieter van Berge Henegouwen

Geboren te Bemmel

Drukkerij Elerie Bennekom

Lijst met afkortingen	
Hoofdstuk I: Inleiding en vraagstelling	1
Hoofdstuk II: Literatuuroverzicht	4
II.1. Inleiding	4
II.2. Normale anatomie van het galwegsysteem	6
II.3. Overzicht van de stofwisseling van galzuren	7
3.1. Synthese en chemische eigenschappen van galzuren	9
3.2. De enterohepatische kringloop van galzuren	12
II.4. De normale galsecretie	13
4.1. Galsecretie door de canaliculus	14
4.2. Galsecretie door de ductulus	17
II.5. Indeling en diagnostiek van aandoeningen met cholestase	18
5.1. De extrahepatische cholestase	19
5.2. De intrahepatische cholestase	20
II.6. Galzuren en cholestase	29
6.1. De betekenis van monohydroxygalzuren voor het ontstaan van cholestase	29
6.2. De betekenis van andere galzuren voor het ontstaan van cholestase	33
6.3. Veranderingen in het galzuurmetabolisme tijdens cholestase bij de mens	35
6.4. Gevolgen van de retentie van galzuren tijdens cholestase	41
II.7. Veranderingen in het galzuurmetabolisme bij patiënten met levercirrhose	46
II.8. Therapeutische mogelijkheden bij stoornissen in het galzuurmetabolisme bij incomplete cholestase	48
8.1. Cholestyramine	48
8.2. Barbituraten	50

Hoofdstuk III: Methoden van onderzoek en patiënten	53
III.1. Gang van zake bij het onderzoek	53
III.2. Beschrijving van de isolatie en de kwantitatieve bepaling van galzuren met de gaschromatograaf in serum, gal en urine	55
2.1. Inleiding	55
2.2. Chemicaliën	57
2.3. Isolatie van galzuren	58
2.4. Bereiding van derivaten van de galzuren voor gaschromatografische bepaling	60
2.5. Gaschromatografische bepaling	61
2.6. Bereiding van standaardoplossingen van galzuren	61
2.7. Berekeningsprocedure	62
2.8. Toetsing van de bepalingsmethoden	63
III.3. Overige bepalingsmethoden	79
3.1. Chemische bepalingen in serum	79
3.2. Chemische bepalingen in urine en feces	79
3.3. Serologische bepalingen in serum	80
3.4. Jeukscore	80
III.4. Statistische analyse	81
4.1. Gebruikte toetsen	81
III.5. Samenstelling en selectie van de onderzochte personen	82
5.1. Normale personen	82
5.2. Patiënten met primaire biliaire cirrhose	83
5.3. Patiënten met levercirrhose	85
5.4. Patiënten met een obstructie van de extrahepatische galwegen	85
5.5. Patiënten met benigne intermitterende intrahepatische cholestase	89
5.6. Patiënten met primaire en secundaire scleroserende cholangitis	89
5.7. Patiënten met intrahepatische cholestase e.c.i.	91

Hoofdstuk IV: Resultaten van het onderzoek	94
IV.1. Inleiding	94
IV.2. Resultaten van galzuurbepalingen in serum, gal en urine	95
2.1. Normale personen	95
2.2. Patiënten met levercirrhose	100
2.3. Patiënten met primaire biliare cirrhose	104
2.4. Patiënten met een complete extrahepatische obstructie	109
2.5. Patiënten met een incomplete extrahepa- tische obstructie	112
2.6. Patiënten met een primaire en secundaire scleroserende cholangitis	113
2.7. Patiënten met benigne intermitterende intrahepatische cholestase	115
2.8. Patiënten met intrahepatische cholestase e.c.i.	122
IV.3. Vergelijking van de resultaten van galzuur- bepalingen bij patiënten met levercirrhose, primaire biliare cirrhose en complete extrahepatische obstructie	122
3.1. Serum	124
3.2. Gal	125
IV.4. Vergelijking van de resultaten van galzuur- bepalingen in serum en in urine	125
IV.5. Uitgebreid gaschromatografisch onderzoek naar de identiteit van bekende en onbekende pieken op het urinechromatogram	128
IV.6. Relatie tussen de jeukscore enerzijds en de galzuren en de leverfunctieproeven anderzijds	129
IV.7. Relatie tussen de serum galzuren, de lever- functieproeven en de ziekteduur.	130
IV.8. De invloed van verschillende behandelings- methoden op het galzuurpatroon in serum, gal en op jeuk	133
8.1. Cholestyramine	133
8.2. Galwegdrainage	134

Hoofdstuk V: Beschouwingen	140
V.1. Inleiding	140
V.2. Galzuurbepalingen in serum	141
2.1. De totale galzuurconcentratie, de individuele galzuren en de cholzuur/chenodesoxycholzuur-ratio	141
2.2. Monohydroxygalzuren in serum	144
V.3. Galzuurbepalingen in gal	146
V.4. Galzuurbepalingen in urine	149
V.5. Serum galzuren en jeuk	152
V.6. Het verband tussen verschillende chemische parameters van cholestase onderling en de ziekteduur	153
V.7. Het effect van cholestyramine, fenobarbital en galwegdrainage op de serum galzuurconcentratie, de jeuk en de leverfunctieproeven bij cholestase	155
7.1. Cholestyramine	155
7.2. Fenobarbital	156
7.3. Galwegdrainage	157
V.8. De betekenis van veranderingen in het galzuurmetabolisme, die optreden bij cholestase en cirrhose	158
8.1. Kwantitatieve veranderingen in het galzuurmetabolisme	158
8.2. Kwalitatieve veranderingen in het galzuurmetabolisme	160
Hoofdstuk VI: Samenvatting	165
Hoofdstuk VII: Summary	180
Literatuur	195
Nomenclatuur galzuren	219

Lijst met afkortingen:

ANA: antistof tegen celkernen (anti-nucleaire antistoffen)

AMA: antistof tegen mitochondriën (anti-mitochondriale antistoffen)

ASMA: antistof tegen glad spierweefsel (anti-"smooth muscle" antistoffen)

B.S.E.: Bezinkingssnelheid van de erytocyten

Chol/chen-ratio: de verhouding van cholzuur en chenodesoxycholzuur

n: totaal aantal patiënten

Neg.: negatief

OH-: hydroxylgroep

P.A.: Pathologische Anatomie

P.B.C.: Primaire biliaire cirrhose

Pos.: positief

$P_{tek.}$: overschrijdingskans bij gebruik van de tekentoets (§ III.4)

P_w : overschrijdingskans bij gebruik van de Wilcoxon's test (§ III.4)

P_s : overschrijdingskans bij de rangcorrelatietoets van Spearman (§ III.4)

r_s : rangcorrelatiecoëfficiënt van Spearman (§ III.4)

Sgot : Serum glutaminezuur-oxaalazijnzuur-transaminase

Sgpt : Serum glutaminezuur-pyrodruivezuur-transaminase

Sp. : spoor

T.F.A.: Trifluoracetaat

Tr. : Trace

Inleiding en vraagstelling

De uit de oudheid stammende wijsheid, dat gal belangrijk is voor gezondheid en ziekte van de mens, heeft vooral de laatste twee decennia aan betekenis gewonnen. Een schat van gegevens over de galsecretie en de samenstelling van de gal - met name over de galzuren en het metabolisme daarvan - onder normale en pathologische omstandigheden is bekend geworden. Een aantal van deze gegevens hebben therapeutische konsekventies.

Betere methoden om galzuren te bepalen in lichaamsvloeistoffen, en de toepassing van een isotopenverduunningsmethode voor de meting van de synthesesnelheid van galzuren en van de omvang van de galzurenpool, hebben het belang van galzuren voor de galsecretie en de vetvertering in de dunne darm aangetoond.

Daarnaast blijven nog vele vragen bestaan. Met name de rol, die galzuren zouden kunnen spelen bij het ontstaan en het onderhouden van galstase is ondanks veelbelovende onderzoeken nog onbekend.

Aan de waarde van kwantitatieve bepalingen van galzuren wordt nogal eens getwijfeld, hetgeen voornamelijk veroorzaakt wordt door de grote problemen die de meeste bepalingmethoden met betrekking tot betrouwbaarheid en reproduceerbaarheid met zich meebrengen.

Voor de bepaling van individuele galzuren - cholzuur, cheno-desoxycholzuur, desoxycholzuur en lithocholzuur - werd in dit onderzoek een gaschromatografische methode gebruikt. Deze methode verdient in vergelijking met andere meer gebruikelijke methoden de voorkeur wegens haar gevoeligheid en betrouwbaarheid. Bij de gaschromatografie is het noodzakelijk om niet vluchtige chemische verbindingen om te zetten in vluchtige derivaten. Per definitie verstaat men onder gaschromatografie het proces, waarbij een mengsel in zijn bestanddelen wordt gescheiden door een "carrier"-gas, dat langs een uiterst fijnkorrelige stationaire fase stroomt. Door het verschil in fysische en chemische eigenschappen ontstaat een scheiding van de componenten in het mengsel over de gasfase en de stationaire fase.

Het doel van dit onderzoek was om na te gaan of het bepalen

van de verschillende galzuurfracties in serum, gal en urine van waarde zou kunnen zijn voor de diagnostiek van een aantal aandoeningen van lever en galwegen in het bijzonder van aandoeningen die gepaard gaan met galstase. Bovendien zouden deze bepalingen ons inzicht in de betekenis van stoornissen in het galzuurmetabolisme bij cholestase kunnen verdiepen. Hierbij werd de beperking aangebracht dat geen onderscheid gemaakt zou worden tussen vrije en geconjugeerde galzuren en evenmin tussen aan glycine of taurine geconjugeerde galzuren.

I.1. Vraagstellingen

- a. Is er bij patiënten met aandoeningen van lever en galwegen een bepaald galzuurpatroon in het serum herkenbaar, dat een aanvulling zou kunnen betekenen van de gebruikelijke diagnostische hulpmiddelen; met andere woorden, zijn er significante verschillen in het galzuurpatroon bij patiënten met intrahepatische of extrahepatische cholestase en bij patiënten met levercirrhose t.o.v. elkaar en t.o.v. normale personen?
- b. Is er een verband tussen de galzuurpatronen in serum en in gal bij normale personen, bij patiënten met intrahepatische cholestase en patiënten met een levercirrhose?
- c. Is er een verband tussen de duur van de cholestase en het galzuurpatroon in het serum van patiënten met een extrahepatische cholestase? Is dit ook het geval bij patiënten met een intrahepatische cholestase?
- d. En hiervan afgeleid: Is er een verband tussen het galzuurpatroon in het serum en het histologische stadium in het leverbiopt bij patiënten met primaire biliaire cirrhose?
- e. Is er een verband tussen het galzuurpatroon in het serum en andere chemische parameters zoals bilirubine, alkalische fosfatase, 5'-nucleotidase, sgot, sgpt en cholesterol, bij cholestase en cirrhose?
- f. Zijn er met de gaschromatografische bepalingmethode monohydroxy-galzuren, speciaal lithocholzuur (3α -monohydroxy - 5β -cholaanzuur) en/of 3β -monohydroxy - $\Delta 5$ -choleenzuur, in serum, gal of urine van patiënten met P.B.C. of andere

vormen van cholestase aantoonbaar?

- g. Is er bij patiënten met cholestase een verband tussen de totale serum galzuurconcentratie en het galzuurpatroon enerzijds en het optreden van jeuk anderzijds?
- h. Bestaat er een verband tussen het effect van cholestyramine op de jeuk van patiënten met intrahepatische cholestase en het galzuurpatroon in het serum?
- i. Wat gebeurt er met het galzuurpatroon in serum en gal bij patiënten met cholestase, bij wie weer galafvloed werd verkregen door het aanleggen van een drain in de ductus choledochus of in een ductus hepaticus?
- j. Heeft kwantitatief onderzoek van de galzuren (met inbegrip van de sulfaatveresterde fractie) in de 24-uurs urine van patiënten nog waarde voor de diagnostiek van de verschillende vormen van cholestase?

Literatuuroverzicht

II.1. Inleiding

Cholestase of galstase is voor de klinicus gewoonlijk synoniem voor geelzucht, ontstaan ten gevolge van een verminderde of afwezige afvloed van gal naar de darm. Galstase wordt chemisch meestal gekarakteriseerd door een stijging van voornamelijk geconjugeerd bilirubine in serum met een duidelijk verhoogde activiteit van alkalische fosfatase en van andere enzymen, zoals 5'-nucleotidase, leucine-aminopeptidase en gamma-glutamyl-transpeptidase, terwijl de serum transaminasen een relatief geringe stijging vertonen. Een stijging van het geconjugeerde bilirubine is echter niet obligaat.

De oorzaak van de cholestase kan in het intrahepatische of extrahepatische galwegsysteem gelocaliseerd zijn. Extrahepatische cholestase vindt zijn oorzaak in mechanische afvloedbelemmering van gal door aandoeningen die zich bevinden tussen de beide ductūs hepatici en de papil van Vater. Voorbeelden zijn tumoren, stenen, congenitale a- of hypoplasie van de galwegen en ontstekingsprocessen. Hierdoor ontstaat een verwijding van het daarboven gelegen galwegsysteem. Hoewel de bifurcatie van de ductus hepaticus communis anatomisch nog tot het intrahepatische galwegsysteem behoort, wordt de door obstruerende aandoeningen van de bifurcatie (driewegcarcinoom) of van de in de porta hepatis gelegen ductūs hepatici ontstane cholestase als extrahepatisch aangemerkt. Intrahepatische cholestase noemt men die vormen van galstase, die een gevolg zijn van biochemische veranderingen in het galsecretiemechanisme van de levercel of van beschadigingen van het ductulaire epitheel, zoals bij het ontstaan van de primaire biliaire cirrhose (P.B.C.) waarschijnlijk het geval is.

Morfologisch herkent men de cholestase aan de verwijding van de galcanaliculi, aan galpigment in de hepatocyten en de Kupfferse cellen en aan galtrombi in de galwegen (Tabel II.1). Tevens kan men soms een "vederachtige" ("feathery") degeneratie van het levercelcytoplasma, een verstoring van de levercelplaten met focale necrose en een proliferatie van ductuli opmerken.

TABLE II.1.

Morphological and functional criteria of cholestasis.

A. Morphological criteria.

1. Macroscopic : green colored enlarged liver.
2. Microscopic : - bile thrombi in canaliculi and ductuli
- bile pigments in von Kupffer cells and hepatocytes
3. Ultrastructural : - shortening and/or disappearance of microvilli.
- canalicular dilatation
- hypertrophy of the smooth endoplasmic reticulum
- enlargement of the golgi-apparatus.

B. Functional criteria.

1. Retention of biliary products in the systemic circulation:^x
 - alkaline phosphatase, 5'-nucleotidase, leucine-aminopeptidase, and
γ-glutamyl-transpeptidase
 - bile acids
 - bilirubin
 - cholesterol
 - phospholipids
 - formation of an abnormal lipoprotein
2. Disturbance in the metabolism of these products
3. Due to a chronic interruption of the biliary bile acid excretion:
 - steatorrhea
 - hypoprothrombinaemia
 - osteomalacia

^x in order of importance.

Voor de patholoog-anatoom is het vaak moeilijk om tussen extra- en intrahepatische cholestase een onderscheid te maken, wanneer deze al enige tijd bestaat. Een gevolg van de cholestase is de aanwezigheid van meer dan normale hoeveelheden van (bijna) alle galprodukten in de circulatie. Naast voornamelijk geconjugeerd bilirubine komen alkalische fosfatase en galzuren in verhoogde concentraties in het bloed voor (Javitt, 1971; Tabel II.1.).

Onder deze definitie van cholestase zijn dus niet inbegrepen die syndromen, waarbij alleen geconjugeerd bilirubine en sommige andere organische anionen, zoals broomsulfaleïne, maar geen galzuren geretineerd worden. Bedoeld worden de syndromen van Dubin-Sprinz-Johnson en van Rotor. Ontstaat de galstase door een obstructie van de galwegen, dan worden galzuren, enzymen en geconjugeerd bilirubine waarschijnlijk wel door de hepatocyt gesecerneerd, doch hierna mogelijk via het ductulaire epitheel geresorbeerd en uitgescheiden in de bloedbaan. Het geconjugeerde bilirubine kan tot een bepaalde drempel door de levercellen weer geklaard worden. Het alkalische fosfatase wordt niet opgenomen in de levercel vanuit de bloedbaan en de galzuren slechts tot een bepaalde drempelwaarde, waarschijnlijk via een actief transportmechanisme. Zo kunnen situaties ontstaan waarbij een deel der galprodukten, zoals de alkalische fosfatase en de galzuren in verhoogde concentraties in het bloed worden aangetroffen, terwijl het bilirubinegehalte normaal is. Een voorbeeld hiervan is het allervroegste stadium van de P.B.C. (Popper en Schaffner, 1970).

II.2. Normale anatomie van het galwegsysteem (Elias 1967, Elias en Sherrick, 1969)

Door de hepatocyt wordt gal via de canaliculaire membraan in de canaliculi uitgescheiden, die een netwerk van capillairen tussen de levercellen vormen. De galcapillairen hebben geen eigen wand. Deze wordt gevormd door bepaalde structuurdifferentiaties (met microvilli) van de omsluitende levercelmembraan. Talrijke galcapillairen verzamelen zich in de voornamelijk periportaal gelegen cholangiolen of kanaaltjes van Hering, waarvan de wand zowel gevormd wordt door ductulusepitheel als door hepatocyten. Het kanaaltje van Hering mondt uit in een interlobulaire ductulus, die

samen met een takje van de arteria hepatica en van de vena portae in een portaal driehoekje gelegen is. De interlobulaire galductuli op hun beurt verenigen zich tot septale galductuli, welke tezamen weer uitstromen in de linker en rechter ductus hepaticus.

De ductuli zijn galbuizen, die met eenlagig kuboid of cilindrisch epitheel bekleed zijn.

In de porta hepatis vloeien de septale galbuizen tot ductūs hepatici ineen. De beide ductūs hepatici, de ductus hepaticus communis, de galblaas met de ductus cysticus en de ductus choledochus, welke de voortzetting vormt van de ductus hepaticus communis na de inmonding van de ductus cysticus, vormen samen het extrahepatische galwegsysteem.

II.3. Overzicht van de stofwisseling van galzuren

Het doel van dit overzicht is om een indruk te geven van de belangrijkste chemische eigenschappen en fysiologische functies van de galzuren.

Een drietal processen, waarbij stoornissen in het metabolisme van de galzuren een directe betekenis hebben voor de kliniek, zijn:

- de vetabsorptie in de darm
- de cholesterolsynthese
- de galproductie

De termen galzuren en galzouten worden gewoonlijk door elkaar gebruikt. Strikt genomen zou men zich tot de term galzuren moeten beperken, wanneer men de niet geïoniseerde vorm bedoelt, terwijl men de term galzouten zou moeten gebruiken wanneer men het heeft over de geïoniseerde vorm. In het spraakgebruik is echter de gewoonte ontstaan de term galzuren (bile acids) te gebruiken voor de vrije of ongeconjugeerde vorm en de term galzouten (bile salts) voor de geconjugeerde vorm (Heaton, 1972). In dit overzicht en in de volgende hoofdstukken zal in het algemeen voor beide vormen de term galzuren worden gebruikt. Wanneer geconjugeerde galzuren nadrukkelijk bedoeld worden, zal deze term worden gebruikt. Bij de mens zijn de galzuren onder normale omstandigheden in geconjugeerde en grotendeels in geïoniseerde vorm aanwezig.

Voor dit overzicht werd gebruik gemaakt van publicaties van Bergström e.a. (1960), Haslewood (1967), Hofmann en Small (1967),

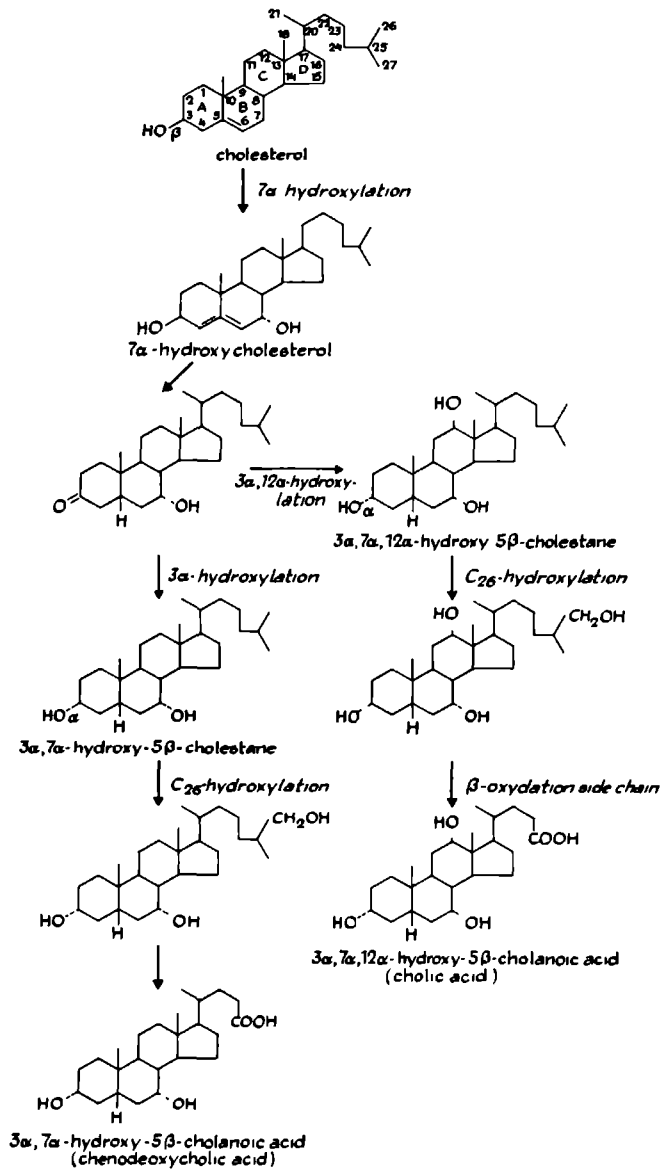


Fig 11. The synthesis of primary bile acids in the liver (Bergström et al, 1960, Danielsson, 1969)

Danielsson (1969), Small en Admirand (1969), Elliot e.a. (1971) en Mosbach (1972).

II.3.1. Synthese en chemische eigenschappen van galzuren

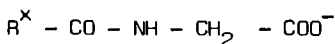
Van de galzuren worden bij de mens en de meeste zoogdieren alleen het cholzuur en het chenodesoxycholzuur in de lever gesynthetiseerd. Samen maken zij ongeveer 80% uit van de totale pool van galzuren. Zij worden primaire galzuren genoemd, aangezien zij in de hepatocyt uit cholesterol gevormd worden. Deze omzetting verloopt in enkele fasen (Fig. II.1.). Op microsomaal niveau vindt eerst een hydroxylering van de steroidring plaats. De eerste reactie - de 7α -hydroxylering van cholesterol - is zeer belangrijk, aangezien deze de reactie beperkende stap is bij de synthese van galzuren. Het terugkoppelingseffect van galzuren, die via het vena portae bloed naar de lever terugkeren, op de synthese van primaire galzuren wordt op dit niveau uitgeoefend (Shefer e.a., 1970; Mosbach e.a., 1971).

De hydroxylgroepen worden in α -positie aan het galzuurmolecuul gebonden. Dat wil zeggen dat zij loodrecht komen te staan op de vlakken, gevormd door de A-ring en de B, C en D-ringen. Dit is tegengesteld aan de hydroxylgroep die in β -positie op de C_3 -plaats aan het cholesterolmolecuul gekoppeld is. De hydroxylgroep ligt hier in het vlak dat gevormd wordt door de A, B, C en D-ringen (Fig. II.1.). Door een stereospecifieke verzadiging van de C_5 - C_6 dubbele binding ontstaat een cis-structuur van de A en B-ringen. De A en B-ringen zijn nu loodrecht ten opzichte van elkaar komen te staan, terwijl de B, C en D-ringen van de steroidkern in hetzelfde vlak komen te liggen. Hierdoor wordt het vlakke cholesterolmolecuul in een L-vormig gebogen galzuurmolecuul veranderd. Vervolgens vindt een zijketenoxydatie plaats, waarschijnlijk op mitochondriaal niveau. Hierdoor ontstaat een verkorting van een C_{27} - naar een C_{24} -molecuul. Tevens wordt het C_{24} -atoom tot een carboxylgroep geoxydeerd. Zo zullen afhankelijk van het aantal hydroxyleringen het cholzuur (3α , 7α , 12α -trihydroxy- 5β -cholaanzuur) en het chenodesoxycholzuur (3α , 7α -dihydroxy- 5β -cholaanzuur) ontstaan. Van cholestan spreekt men wanneer in de gehydroxyleerde steroidkern geen onverzadigde bindingen meer aanwezig zijn,

terwijl de zijketen nog intact is. Van cholaanzuur spreekt men wanneer in de steroidkern geen onverzadigde binding meer aanwezig is, een of meer hydroxylgroepen aan de steroidkern gekoppeld zijn, terwijl de zijketen reeds tot COOH is geoxydeerd. Van choleenzuur spreekt men wanneer zich in de gehydroxyleerde steroidkern nog een onverzadigde binding bevindt, terwijl de zijketen tot COOH geoxydeerd is.

Vervolgens vindt weer op microsomaal niveau in aanwezigheid van adenosinetrifosfaat, co-enzym A en Mg^{++} conjugatie plaats van de C_{24} -carboxylgroep aan de aminogroep van taurine of glycine, waardoor een peptidebinding ontstaat (Tabel II.2). Men kan nu spreken van geconjugeerde galzuren. Normaal zijn er 1 tot 6 maal, gemiddeld ongeveer 2, meer glycineconjugaten dan taurineconjugaten in het menselijk lichaam aanwezig. Afhankelijk van de pH zullen deze geconjugeerde moleculen gaan ioniseren, waarbij men strikt genomen van galzouten zou moeten spreken.

TABLE II.2. The different types of human bile acid conjugates.

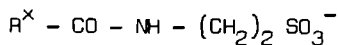


Glycocholate (cholylglycine)

Glycochenodeoxycholate (chenodeoxycholylglycine)

Glycodeoxycholate (deoxycholylglycine)

Glycolithocholate (lithocholylglycine)

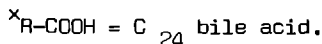


Taurocholate (cholyltaurine)

Taurochenodeoxycholate (chenodeoxycholyltaurine)

Taurodeoxycholate (deoxycholyltaurine)

Taurolithocholate (lithocholyltaurine)



In deze vorm zijn de galzuren krachtige detergentia. Uit het in water onoplosbare cholesterol is nu een amfifiel molecuul ontstaan, dat enerzijds een hydrofobe (steroidring), anderzijds een hydrofiele zijde (hydroxylgroepen, amidebinding en de sulfaatgroep van taurine of de carboxylgroep van glycine) heeft. Het galzuur

kan in deze vorm vergeleken worden met gewone zepen (natrium- of kaliumzouten van vetzuren). Het is dan ook redelijk oplosbaar in waterig milieu en heeft een oppervlakte actieve werking, d.w.z. een oppervlaktetenspanning verlagend effect op een lucht/water of een olie/water scheidsvlak. Het galzuur is in staat polymoleculaire aggregaten of micellen in water te vormen, waarin tevens slecht in water oplosbare lipiden, zoals cholesterol, monoglyceriden, fosfolipiden en vetzuren kunnen worden ingebouwd. De hydrofobe delen van de galzuren, met in de kern van de micel vetzuren, monoglyceriden en cholesterol zijn naar binnen gericht, terwijl de hydrofiele delen naar buiten in het omringende waterige milieu uitsteken. Hierdoor ontstaat een waterheldere oplossing van olie-achtige substanties in water.

De geloniseerde groep op de zijketen is voornamelijk verantwoordelijk voor de wateroplosbaarheid der galzuren. Deze houdt de galzuren bij een fysiologische pH in geladen vorm en verhindert zo de passieve diffusie door de lipidenmembraan van het galwegsysteem en de dunne darm. Een klein deel der primaire galzuren wordt niet geresorbeerd in de dunne darm. Dit wordt in het colon door anaerobe enterococcon, clostridium perfringens, lactobacillen en bacteroides gedeconjugerd tot vrije galzuren en vervolgens gedehydroxyleerd d.m.v. een 7α -dehydroxylering tot desoxycholzuur (3α , 12α -dihydroxy- 5β -cholaanzuur uit cholzuur) en lithocholzuur (3α -monohydroxy- 5β -cholaanzuur uit chenodesoxycholzuur). Desoxycholzuur en lithocholzuur worden secundaire galzuren genoemd. Een groot gedeelte van het desoxycholzuur en een minimaal deel van het slecht oplosbare lithocholzuur wordt in het colon geresorbeerd en in de lever weer omgezet in met taurine of glycine geconjugeerde galzuren.

De secundaire galzuren worden dus deels geresorbeerd, deels onveranderd in de feces uitgescheiden en deels door verdere bacteriële inwerking in een dertigtal andere galzuren omgezet, zoals uit onderzoek van feces van normale personen is gebleken.

De synthese van galzuren in de lever bedraagt normaal 0,2 tot 0,6 g per 24 uur en is gelijk aan die hoeveelheid galzuren, die per 24 uur met de feces verloren gaat. De synthese in de lever van galzuren wordt gereguleerd door een terugkoppelingssysteem, hetgeen inhoudt dat er een negatieve correlatie bestaat tussen de

hoeveelheid galzuren, die in de darm wordt teruggeresorbeerd en via het vena portae bloed weer aan de lever wordt aangeboden, en de mate van synthese van galzuren in de lever.

De omvang van de galzuurpool blijkt in grote mate afhankelijk te zijn van de frekwentie of de snelheid waarmee de galzuren in de enterohepatische kringloop circuleren. Gebleken is, dat de pool van een bepaald galzuur kleiner is naarmate ook de halfwaardetijd korter is (Low-Beer en Pomare, 1973). Ook heeft men ontdekt dat de synthese van het primaire galzuur chenodesoxycholzuur in hoge mate onderdrukt kan worden door het toedienen van het secundaire galzuur desoxycholzuur (Low-Beer e.a., 1972). Hierin ligt een aanwijzing besloten dat de synthese van galzuren in de lever deels afhankelijk is van darmbacteriën, die de galzuren kunnen dehydroxyleren.

II.3.2. De enterohepatische kringloop van galzuren

Een van de belangrijkste functies van de galzuren is het normaal doen verlopen van de vetvertering en de vetabsorptie. Tijdens de maaltijd worden de galzuren door contracties van de galblaas met de gal in het duodenum gebracht in een concentratie die varieert van 5 tot 25 mmol/l. "Mixed micelles", samengesteld uit galzuren en de bij de lipolyse vrijgekomen monoglyceriden en vetzuren, zorgen voor een effectief transport van deze produkten naar het absorberende oppervlak van de dunne darm. Deze micellen worden pas gevormd, wanneer de concentratie van de galzuren in het duodenum stijgt boven de zgn. kritische micellaire concentratie, die in de dunne darm 2 mmol/l bedraagt. De totale pool van de galzuren bedraagt normaal 2 - 4 g. Deze circuleert 6 à 10 keer per dag of 2 à 3 keer per maaltijd in de enterohepatische kringloop, waarbij ongeveer 95% van de pool telkens weer geresorbeerd wordt. De grootste resorptie vindt actief in het terminale ileum plaats. Ook vindt nog passieve diffusie van galzuren in het jejunum en het colon plaats. Men kan stellen dat per dag 10 à 30 g galzuren betrokken zijn bij de vetvertering in de dunne darm. De duur van het nuchter zijn, de galblaasfunctie, de snelheid van maagontleding, de vocht-hoeveelheid, die bij de maaltijd wordt genuttigd en de mate van darmmotiliteit zijn factoren, die bij normale personen een grote

schommeling in de concentratie van galzuren in de dunne darm veroorzaken.

Voor een overzicht van ziektebeelden die ontstaan, wanneer galzuren in de darm voor de vetvertering verloren gaan - bijv. na ileumresecties en bij een abnormale bacteriegroei in de dunne darm-, wordt verwezen naar de uitstekende publicaties van Garbutt e.a. (1971), Heaton (1972), Hofmann (1972) en Wilson en Dietschy (1972).

II.4. De normale galsecretie

De totale hoeveelheid gal, die wordt geproduceerd, wordt bepaald door de galsecretie in de canaliculi, in de ductuli en door de permeabiliteit van het galwegepitheel (Javitt, 1971). De normale samenstelling van levergal en galblaasgal is samengevat in Tabel II.3. Als belangrijkste organische stoffen zijn aanwezig: galzuren, fosfolipiden (lecithines), cholesterol en bilirubine. De Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} en Cl^- -concentraties blijken in de gal ongeveer gelijk te zijn aan die van plasma, terwijl HCO_3^- in de gal in veel hogere concentraties dan in plasma aanwezig kan zijn (Thureborn, 1962). Een stijging van het HCO_3^- -gehalte ziet men vooral optreden na stimulatie met secretine. De gal wordt dan ook meer verdund zodat de concentraties van de verschillende stoffen dalen. Op grond van de variërende HCO_3^- -concentratie kan de pH van gal schommelen tussen de 5,9 en 7,8.

Small e.a. (1966) en Hofmann en Small (1967) hebben aannemelijk gemaakt, dat het transport van lipiden in gal aanzienlijk vergemakkelijkt wordt door de vorming van "mixed micelles" tussen galzuren, cholesterol en fosfolipiden, zeker wanneer de galzuurfractie boven de kritische micellaire concentratie van 1 à 2 mmol/l stijgt. Op grond van in vitro studies hebben Admirand en Small (1968) een coördinatensysteem geïntroduceerd om de oplosbaarheid in de vorm van micellen van galzuren, cholesterol en fosfolipiden aan te geven. Hieruit is duidelijk geworden, dat alleen micellen gevormd worden, wanneer de concentraties van galzuren en fosfolipiden ten opzichte van die van cholesterol hoog genoeg zijn. Is de relatieve concentratie van fosfolipiden en galzuren ten opzichte van cholesterol te laag dan is de gal oververzadigd met cholesterol en bestaat de mogelijkheid tot vorming van cholesterolkristal-

TABLE II.3. Composition of human bile (g/100 ml).

	Hepatic bile	Gallbladder bile
Anorganic ions (Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ , Ca ⁺⁺ , etc)	0.6 - 0.9	0.5 - 1.1
Fatty acids	0.1 - 0.14	0.9 - 1.6
Cholesterol	0.004 - 0.21	0.01 - 1.3
Phospholipids (lecithins)	0.1 - 0.6	1.0 - 5.8
Bile acids	0.7 - 1.4	1.0 - 9.2
Other organic compounds (mucin, bilirubin diglucuronide etc)	0.2 - 1.2	1.0 - 4.2
H ₂ O	+ 95	85 - 90
pH	5.9 - 7.8	5.9 - 7.8

(Haslewood, 1967)

len. Vlahcevic e.a. (1970) en Small en Rapo (1970) hebben er op gewezen, dat de ratio tussen galzuren, fosfolipiden en cholesterol in levergal gelijk is aan die in galblaasgal. Ook in gal, opgevangen bij duodenumsondage, vindt men dezelfde ratio als in galblaasgal, zodat deze representatief voor galblaasgal is te noemen voor wat betreft de onderlinge verhouding van de genoemde producten (Sjövall, 1960).

Bij patiënten met cholesterolgalstenen wordt een significante vermindering - soms zelfs tot 50% van normaal - van de galzuurpool gevonden (Vlahcevic e.a., 1970^a). De betekenis hiervan is, dat de gal een overmaat aan cholesterol bevat in verhouding tot de andere componenten van de micellen, dus de galzuren en de fosfolipiden. Gal, die oververzadigd is met cholesterol wordt lithogene gal genoemd (Small, 1970). Op het probleem van het ontstaan van galstenen wordt hier niet verder ingegaan, maar zij verwezen naar overzichten van Soloway e.a. (1971) en Redinger en Small (1972).

II.4.1. Galsecretie door de canaliculus

Sperber (1959 en 1965) stelde de hypothese op, dat de voornaamste prikkel voor galsecretie door de hepatocyt het actieve transport van galzuren door de canaliculaire membraan is. Deze hypothese kwam naar voren door het bekend worden van het cholere-tische effect van galzuren. Door het ontstaan van een osmotische

gradient tussen levercel en de vloeistof in de canaliculus zouden water en elektrolyten door de canaliculaire membraan kunnen passeren. Wanneer met toenemende infusiesnelheid taurocholaat wordt toegediend dan ziet men een lineaire correlatie ontstaan tussen de galproductie en de excretie van galzuren. Dit is gebleken uit onderzoek bij de hond (Preising e.a., 1972), bij het konijn (Erlinger, 1972) en bij de mens (Scherstèn e.a., 1971). Een abrupte onderbreking van de enterohepatische circulatie van galzuren veroorzaakte een vermindering van de galsecretie tot ongeveer 50% van normaal in kortdurende experimenten (Thureborn, 1962). Scherstèn e.a. (1971) toonden voor het eerst aan, dat er een duidelijke correlatie bestaat tussen de galproductie en de excretie van galzuren in de gal. Deze correlatie heeft betrekking op de dihydroxy- en trihydroxy-galzuren, die het hoofdbestanddeel van de normale gal uitmaken. Dezelfde onderzoekers toonden ook aan, dat de secretie van cholesterol, maar vooral van lecithine in de gal grotendeels afhankelijk is van de secretie van galzuren (Nilsson, 1970).

Bij een abrupte onderbreking van de enterohepatische circulatie daalde de lecithine-excretie in de gal bijna even sterk als de excretie van galzuren (Nilsson en Scherstèn, 1969). Wanneer men galzuren per os toedient of inspuit in de vena portae bij proefdieren of toevoegt aan het perfusiemedium van de geïsoleerde en geperfundeerde proefdierlever, dan ziet men de lecithine-excretie in de gal weer snel toenemen (Swell e.a., 1968 en 1968^a, Heath e.a., 1970, Nilsson, 1970). Waarschijnlijk wordt de synthese en indirect de excretie van lecithine positief beïnvloed door de enterohepatische circulatie van galzuren (Nilsson, 1970, Balint e.a., 1971).

De invloed van galzuren op de cholesterolsecretie in de gal is minder nauwkeurig bekend. Een abrupte onderbreking van de enterohepatische kringloop veroorzaakt een daling van de cholesterolsecretie in de gal, doch deze is minder uitgesproken dan de daling van galzuren en lecithines (Nilsson e.a., 1969), terwijl toediening van galzuren relatief weinig effect op de cholesterolsecretie heeft (Bell e.a., 1971). De alles bijeen toch duidelijke correlatie tussen de excretie van galzuren, fosfolipiden en cholesterol in de gal suggereert een andere hypothese voor de canaliculaire galsecretie, die minder gekoppeld is aan het osmotische effect van galzuren. De drie componenten worden mogelijk vanuit de

canaliculaire membraan in de vorm van micellaire aggregaten uitgescheiden, hoewel micellen op zich een geringere osmotische activiteit hebben dan de drie componenten afzonderlijk (Hofmann en Small, 1967). De mogelijke invloed van galzuren op de cholesterolsecretie in de gal kan men niet los zien van een mogelijke invloed op de cholesterol synthese in de lever. Wij zullen hierop echter niet nader ingaan.

Naast de zogenaamde van galzuren afhankelijke canaliculaire galsecretie, die hierboven besproken is, blijkt een aanzienlijk deel (nogal wisselend bij de verschillende diersoorten) van de canaliculaire galproductie niet afhankelijk te zijn van de excretie van galzuren: de van galzuren onafhankelijke canaliculaire galsecretie. Een actief transport van natrium door de hepatocyt onder invloed van een in de celmembraan gelokaliseerd enzym - het $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ geactiveerde adenosinetrifosfatase - zou hiervoor verantwoordelijk zijn (Bakkeren, 1968 ; Erlinger e.a., 1969). Toediening van ouabaine dat het natriumtransport remt, veroorzaakt een verminderde galproductie zonder dat de secretie van galzuren vermindert (Erlinger e.a., 1970).

Wanneer men de galsecretie uitzet tegen de galzuurexcretie, dan ziet men, dat bij een galzuurexcretie van 0 er nog steeds gal wordt geproduceerd. Die hoeveelheid gal, die geproduceerd wordt, wanneer de excretie van galzuren tot 0 gereduceerd is, wordt de van galzuren onafhankelijke canaliculaire galfractie genoemd. Bij de mens zijn kwantitatieve gegevens over de galproductie en de samenstelling van de gal moeilijk op hun waarde te schatten wegens problemen bij het verkrijgen van levergal en gezien het feit dat de situatie, waarin gal wordt verzameld, vaak weinig fysiologisch is. Scherstèn e.a. (1971) hebben berekend dat een excretie van $1 \mu\text{mol}$ galzuur gepaard gaat met een waterexcretie van $14 \mu\text{l}$. De excretie van galzuren bij de mens met een normale enterohepatische circulatie werd berekend op ca $15,1 \mu\text{mol/min}$. De van galzuren afhankelijke galsecretie werd op ongeveer $0,21 \text{ ml/min}$ geschat. Op grond hiervan kon men berekenen dat de van galzuren onafhankelijke galfractie ca 50% van de totale galproductie bedroeg. Onlangs werd door Prandi e.a. (1973) de grootte van deze fractie bij de mens op 40% berekend.

Een verandering in de permeabiliteit van de canaliculaire membraan kan van invloed zijn op de totale galproductie. Simon en Arias (1972) legden in een recent overzicht de nadruk op de betekenis van kwantitatieve veranderingen in de eiwitsamenstelling van de canaliculaire membraan bij stoornissen in de galsecretie. De waarneming van Forker (1968), dat oestrogenen de permeabiliteit van de canaliculi kunnen veranderen, lijkt hierbij van belang. Toediening van oestrogenen aan proefdieren werd gevolgd door een vermindering van de galsecretie en door een vermeerdering van de klaring van sucrosen door de lever via galsecretie. Er zijn aanwijzingen dat dit effect van oestrogenen berust op een remming van de niet van galzuren afhankelijke canaliculaire galsecretie (Cumucio en Valdivieso, 1971).

Het is mogelijk dat teruggediffusie van galzuren via het ductus epitheel plaatsvindt, hetgeen kan resulteren in een verminderde galproductie.

II.4.2. Galsecretie door de ductulus

In de ductuli wordt aan de gal een vloeistof met een hoge concentratie aan bicarbonaat en chloride toegevoegd. Deze secretie door de galductuli staat onder invloed van secretine, gastrine, cholecystokinine en glucagon (Wheeler, 1969). Secretine heeft kwantitatief het grootste effect (Jones e.a., 1971). Wheeler heeft ook gewezen op de mogelijkheid van re-absorptie van vocht in de galwegen. Dat dit in de galblaas gebeurt, is reeds langer bekend.

Concluderend kan men stellen dat de hoeveelheid gal, die in het duodenum stroomt, afhankelijk is van de canaliculaire galproductie door de hepatocyt, die weer afhankelijk is van de frekwentie waarmee de galzuurpool binnen de enterohepatische kringloop circuleert. Tevens is de galproductie afhankelijk van de mate van re-absorptie van vocht in de galductuli of in de galblaas en van secretie in de galductuli en de grotere galgangen. Om deze redenen is het moeilijk exact het galvolume per 24 uur vast te stellen. Patiënten, die een cholecystectomie ondergaan hadden en bij wie de enterohepatische circulatie kunstmatig intact werd gehouden, produceerden een galvolume van 500-600 ml per 24 uur (Erlinger, 1972).

II.5. Indeling en diagnostiek van aandoeningen met cholestase

Op grond van klinische, chemische, radiologische, serologische en histologische criteria kan men meestal een onderscheid maken tussen intrahepatische en extrahepatische cholestase.

Het vinden van betrouwbare chemische parameters voor de diagnostiek is bijzonder moeilijk gebleken door de niet zelden identieke afwijkingen die bij de beide vormen van cholestase, vooral in een vroege fase, worden gezien. Het blijkt, dat zowel de chemische parameters als het histologische beeld van de leverbiopsie eerder een aanwijzing zijn voor de duur en de ernst van de cholestase dan voor een intra- of extrahepatische lokalisatie (Popper en Schaffner, 1970).

Een verhoging van de alkalische fosfatase- en de 5'-nucleotidase-activiteit in serum wordt als een specifieke en gevoelige parameter beschouwd bij stoornissen in de galsecretie (Phelan e.a., 1971). Deze enzymen zijn gelokaliseerd in de wand van de endotheelcellen en de canaliculaire membraan (Essner e.a., 1958; Wachstein en Meisel, 1958). Het 5'-nucleotidase, dat de nucleotidofosfaat-esters, adenosinemonofosfaat en inosinemonofosfaat, hydrolyseert, is meer specifiek voor stoornissen in de galafvloed. Dit geldt ook voor enzymen als het leucine-aminopeptidase en het gamma-glutamyl-transpeptidase. Het alkalische fosfatase in het serum is immers deels ook afkomstig uit bot en andere weefsels.

Het histologische beeld van de lever bij cholestase is op zich niet bewijzend voor een bepaalde diagnose, maar begeleidende fenomenen maken het de ervaren patholoog-anatoom soms mogelijk de juiste diagnose te stellen. Dergelijke fenomenen zijn o.a. de hepatitis, die gewoonlijk wijst op een intrahepatische oorzaak van de cholestase en de verwijding van de intrahepatische galgangen bij een extrahepatische oorzaak van cholestase.

Het vaststellen van een goede doorgankelijkheid van de galwegen kan op verschillende manieren worden nagegaan. Het meest eenvoudige is de bepaling van urobiline in de urine. Deze is echter bij een sterk toegenomen excretie van bilirubine in de urine minder bruikbaar. Het verdient dan ook aanbeveling de bepaling van urobilinogeen in de ontlasting hieraan toe te voegen (Brandt, 1958). Is de hoeveelheid urobilinogeen in de feces minder dan 5 mg

per dag, dan leert de ervaring, dat er sprake is van afwezigheid van gal in de darm, d.w.z. van een totale afsluiting der grote galwegen. Is deze bevinding in de loop van een à twee weken bij herhaling reproduceerbaar, dan is een blijvende, totale afsluiting van de grotere galwegen zeer aannemelijk. De oorzaak van de afsluiting blijkt meestal op een tumor te berusten (Brandt e.a., 1972). Waardevolle onderzoekmethoden, die kunnen worden toegepast bij het opsporen van obstructies in het extrahepatische galwegsysteem zijn o.a. de hypotone duodenografie, de leverscan met ¹³¹J-Bengaalrood, de percutane transhepatische cholangiografie en de cholangiografie na canuleren van de ductus choledochus via de papil van Vater tijdens duodenoscopie.

Wanneer de klinische situatie het toelaat, dan zal men in twijfelgevallen niet aarzelen een laparotomie te doen om de extrahepatische galwegen en vooral de hoog in de leverhilus gelegen ductus hepatici te inspecteren. Bij intrahepatisch gelokaliseerde obstructies zal men aan de extrahepatische galwegen dan geen afwijkingen vinden.

II.5.1. De extrahepatische cholestase

Hieronder wordt verstaan een complete of incomplete galafvloedstoornis door een obstruerend proces dat gelokaliseerd is in de extrahepatische galwegen. De oorzaak van de mechanische obstructie kan van velerlei aard zijn, met name bacteriële ontstekingen, tumoren en stenen. Een obstructie distaal van de samenvloeiing van de ductus cysticus en de ductus hepaticus communis veroorzaakt een uitgezette galblaas, die soms palpabel is. Vergrote lymfomen langs het ligamentum hepatoduodenale veroorzaken alleen geelzucht wanneer deze ook, zoals bij maligne aandoeningen, invasief in de ductus groeien. Alleen door druk van buiten af ontstaat zelden of nooit een belemmering van de galafvloed. Wanneer daarentegen een carcinoom in de leverhilus groeit, kan wel icterus ontstaan, doordat de ductus daar weinig of niet kunnen uitwijken (Popper en Schaffner, 1970).

Chemische parameters zoals de serum alkalische fosfatase- en 5'-nucleotidase-activiteit kunnen wisselend verhoogd zijn bij de extrahepatische cholestase. Zo vonden Stern e.a. (1973) dat bij meer

dan 20% van hun patiënten met dit type obstructie de serum alkalische fosfatase-activiteit minder dan tweemaal verhoogd was.

II.5.2. De Intrahepatische cholestase

Aan een intrahepatische cholestase kunnen verschillende oorzaken ten grondslag liggen (Tabel II.4). Een aantal voor dit onderzoek belangrijke syndromen zullen hieronder worden samengevat.

TABLE II.4. Causes of intrahepatic cholestasis.

-
- a. Acute viral hepatitis.
 - b. Alcoholic hepatitis.
 - c. Chronic active hepatitis and cholestasis.
 - d. Primary biliary cirrhosis stage I - IV.
 - e. Drug induced hepatitis and cholestasis.
 - f. Drug induced cholestasis without the histological features of hepatitis.
 - g. Jaundice of late pregnancy.
 - h. Benign recurrent intrahepatic cholestasis.
 - i. Primary sclerosing cholangitis.
 - j. Intrahepatic and extrahepatic biliary atresia.
 - k. Enzyme deficiencies: α_1 -antitrypsin deficiency, galactosemia and tyrosinemia.
-

5.2.1. De cholestatische vorm van een acute virushepatitis

Bij nauwkeurige observatie blijken vrij vele patiënten met een acute virushepatitis een, zij het meestal kortdurende, cholestatische fase door te maken. Bij een enkeling kan deze zelfs wekenlang persisteren.

5.2.2. Primaire biliaire cirrhose (Rubin e.a., 1965)

Fouik en Baggenstoss, 1969; Brandt en Furstner, 1970; Popper en Schaffner, 1970^a; Sherlock en Scheuer, 1973).

De naam primaire biliaire cirrhose is enigszins ongelukkig gekozen, daar alleen in het laatste stadium van de ziekte een echte biliaire cirrhose gezien wordt. De Engelse term "chronic non-suppurative destructive cholangitis" (Rubin e.a., 1965) geeft de kern van het ziektebeeld beter aan.

Het ziektebeeld van de P.B.C. ontwikkelt zich meestal slui-pend. Het gaat gepaard met een langdurige en gewoonlijk progressieve intrahepatische cholestase. In de beginfase van de ziekte bestaat er nogal eens vermoeidheid, anorexie, vermagering, terwijl jeuk als vroege uiting van een stoornis in de galafvloed al vóór de icterus aanwezig kan zijn.

By lichamenlijk onderzoek zal in de latere fasen een icterus opvallen met een hepato- en soms een splenomegalie. Spider naevi, xanthomen en xantheleasmatata kunnen aanwezig zijn. De serum concentratie aan galzuren is verhoogd en dit veroorzaakt waarschijnlijk de heftige jeuk bij deze patiënten.

Chemisch vallen vooral de verhoging van de serum alkalische fosfatase- en 5'-nucleotidase-activiteit op als eerste aanwijzing voor een gestoorde galafvloed. Het serum bilirubinegehalte is in latere fasen wisselend verhoogd. Vaak zijn de serum lipiden gestegen, doch dit is niet obligaat. Dit uit zich vooral in een toeneming van het vrije cholesterol t.o.v. het veresterde cholesterol. Ook de serum fosfolipiden en triglyceriden kunnen sterk verhoogd zijn.

Op basis van de histologische afwijkingen in het leverbiopt kan men het verloop van de P.B.C. naar Popper en Schaffner (1970^a) indelen in 4 stadia.

Stadium I: Cholangitis. In de beginfase van de ziekte is er een destructie van interlobulaire en septale galductuli. Deze zijn dan omgeven door een infiltraat van voornamelijk IgM-producerende plasmacellen en lymfocyten met depositie van complement verbruikende immuuncomplexen rond de betreffende galductuli (Paronetto e.a., 1970). Vaak worden in dit stadium al antilichamen tegen mitochondriën gevonden. De relatie van dit fenomeen met de leverbeschadiging is niet duidelijk (Doniach e.a., 1970). Het Australië-antigeen is negatief. Het proces beperkt zich in deze fase tot een vergroting van de portale ruimte zonder significante hepatocellulaire beschadiging of cholestase.

De klinische symptomen en laboratoriumbevindingen worden in dit stadium al overheerst door de gevolgen van een regurgitatie van gal: jeuk, een toename van de serum alkalische fosfatase-activiteit, soms reeds een

verhoging van de serumbilirubine-concentratie en niet zelden ook een hypercholesterolemie. Soms worden granulomen in de portale ruimten gezien, doorgaans in duidelijke relatie met intralobulaire galductuli. Soortgelijke granulomen kunnen o.a. ook voorkomen bij sarcoidosis, meestal echter zonder relatie met de portale ruimten. De Kveimtest wordt echter niet positief bij P.B.C. (Fox e.a., 1969).

Stadium II: Proliferatie van de ductuli. De destructie van de interlobulaire ductuli wordt gevolgd door proliferatie hiervan, door destructie van de grotere septale galductuli en een toename van bindweefsel in de porta gebieden. Dit gaat gepaard met icterus en toenemende jeuk als voornaamste symptoom. De intrahepatische cholestase zowel centraal als perifeer in de lobuli, is hierbij karakteristiek. Zij is een gevolg van een lesie op het niveau van de ductuli. Ook ontstaat er in dit stadium soms een periportaal ontstekingsinfiltraat, dat op "piece meal" necrose lijkt, zodat verwarring met een chronische agressieve hepatitis voor de hand ligt. Het is echter meestal wel mogelijk in dit stadium een onderscheid tussen deze twee histologische beelden te maken. Bij P.D.C. is de primaire lesie aan de cholangiolen en/of de interlobulaire galbuisjes te vinden. Bij de chronische agressieve hepatitis bevindt de ontsteking zich primair zowel in het periportale parenchym als in het galwegsysteem. Het galwegepitheel zou meerlagig worden en vaker vacuÛlen bevatten bij de chronische agressieve hepatitis, terwijl rupturen van de galbuisjes uitsluitend bij P.B.C. zouden voorkomen (Christofferson, e.a., 1972). Het ontstekingsinfiltraat bij P.B.C. bestaat uit lymfocyten, histiocyten, eosinofielen, neutrofielen en plasmacellen. Op den duur ontstaan bindweefselseptata, die de portale ruimten met elkaar verbinden. Hepatomegalie is meestal aanwezig, xanthomen worden niet zelden aangetroffen. Indien een hypercholesterolemie aanwezig is, is deze in dit stadium doorgaans het meest uitgesproken.

Stadium III. Fibrosevorming. De lever is vergroot en er wordt bij histologisch onderzoek een ernstige centrale en perifere cholestase gezien. De hoeveelheid bindweefsel in en rond de portavelden is sterk toegenomen, het aantal galductuli is aanzienlijk gereduceerd en normale galductuli worden praktisch niet meer gezien. Bovendien treedt regeneratie van leverweefsel op. De portale hypertensie kan aanleiding geven tot bloedingen uit oesofagusvarices.

Stadium IV. Cirrhose. In dit stadium is de lever vast en onregelmatig nodulair. Er zijn praktisch geen galductuli meer aanwezig in de portale ruimten. Een centrolobulaire of perifere cholestase wordt gezien, die ook bij andere typen van cirrhose kan voorkomen. Het histologische beeld heeft in dit stadium weinig specifieke kenmerken meer, zodat een afbakening van andere typen van cirrhose vaak moeilijk, zo niet onmogelijk is. De patiënten zijn meestal icterisch en overlijden gewoonlijk aan een leverinsufficiëntie. De hypercholesterolemie en de xanthomen, indien aanwezig, verdwijnen meestal geleidelijk in deze fase.

De duur van de ziekte wisselt sterk. Enerzijds kunnen patiënten jaren redelijk stabiel blijven in de vroege fase van de ziekte (Brandt en Bronkhorst, 1972). Anderzijds kan de ziekte ook een sterk progressief verloop hebben, waarbij de patiënten binnen korte tijd (1 à 2 jaar) komen te overlijden. Behalve de genoemde klinische, chemische en histologische criteria heeft het vinden van antistoffen tegen mitochondriën grote waarde voor de diagnose P.B.C.. Doniach (1972) vond bij 93% van de P.B.C.-patiënten antistoffen tegen mitochondriën (A.M.A.), Goudie (1966) bij 87%. Het vinden van A.M.A. is vrij specifiek voor P.B.C., vooral wanneer een hoge titer aanwezig is. Een negatieve bevinding pleit dan ook voor een extrahepatische obstructie. In een recent onderzoek werd echter gesuggereerd, dat een positieve reactie ook bij extrahepatische obstructie voor kan komen. Naarmate de obstructie langer aanwezig was, werd het aantal positieve bevindingen groter, terwijl ook de titers sterk stegen (Chun Lam e.a., 1972). Dit onderzoek is echter nog niet bevestigd. Ook bij de halothaan- en de chloorpromazinehepatitis

vindt men soms tijdelijk een matig positieve reactie (Rodriguez e.a., 1969), terwijl bij de chronische agressieve hepatitis en de cryptogene cirrhose ongeveer 25% van de patiënten A.M.A. in lage titers heeft (Doniach, 1972). Bij het stellen van de juiste diagnose kan men om bovenvermelde redenen voor grote moeilijkheden komen te staan en zal men soms niet aan een proeflaparotomie ter controle van het gehele extrahepatische galwegsysteem kunnen ontkomen. Hoewel een laparotomie natuurlijk het nodige risico voor de patiënt met zich meebrengt, zal de chirurg bij deze gelegenheid een wigexcisie uit de lever kunnen doen. De diagnose P.B.C. zal zo gemakkelijker histologisch gesteld worden dan met een percutaan verkregen leverbiopt (Hadziyannis e.a., 1970).

De etiologie van de ziekte is nog onbekend. De meeste onderzoekers zien de P.B.C. als een primair "auto-immune" leverziekte (Doniach en Walker, 1969). Het voorkomen van P.B.C. samen met andere "auto-immun" syndromen is ook een steun voor deze hypothese (Golding e.a., 1971; Read, 1971; van Berge Henegouwen e.a., 1973; 1973^a). De meest voor de hand liggende hypothese is, dat er een auto-aggressie aanwezig is, speciaal tegen de cholangiolen en de interlobulaire ductuli. Secundair hieraan ontstaat er een mechanische galafvloedbelemmering. De rol, die stoornissen in het galzuurmetabolisme hierbij zouden kunnen spelen, wordt besproken in § II.6.

Bij de therapie van de P.B.C. zou soms, althans in een vroege fase van de ziekte wel enige vertraging van het ziekteproces gezien kunnen worden met azathioprine. Ook de excretiefunctie van de lever lijkt soms enigszins te verbeteren. Onderzoek op grote schaal met dit medicament is thans in bewerking (Fisher en Schmid, 1967; Ross en Sherlock, 1971). Bij sommige patiënten is azathioprine ook een effectief middel tegen de jeuk gebleken (Alarçon-Segovia e.a., 1970; Gips, 1973). Hoewel corticosteroiden het algemeen welbevinden van de patiënt aanzienlijk kunnen verbeteren en in een incidenteel geval wel eens tijdelijk succes gezien wordt, is het effect hiervan gewoonlijk gering (Carman, e.a., 1955). Als therapie voor de vaak zeer hinderlijke jeuk heeft men een heel andere benadering gekozen. Aangezien de jeuk waarschijnlijk veroorzaakt wordt door opslag in de huid van galzuren, die door een belemmering van de galafvloed gereteneerd worden, heeft men aan de patiënten cholestyra-

mine per os toegediend. Bij een niet volledige obstructie van de galafvloed lukt het hiermee om op darmniveau de enterohepatische circulatie van galzuren te onderbreken (zie § II.8.). Het gevolg is een versterkte omzetting van cholesterol in galzuren en een mobilisatie van galzuren uit de weefsels. Binnen enige dagen vermindert de jeuk en daalt de serum concentratie van galzuren, bilirubine en cholesterol (Carey e.a., 1961, 1969; Murphy e.a., 1972). De uiteindelijke prognose van de ziekte wordt waarschijnlijk niet door het cholestyramine beïnvloed (Datta en Sherlock, 1966).

Onderzoekingen met fenobarbital tonen aan, dat dit middel de excretie van galzuren kan bevorderen, zodat het bij de behandeling van de P.B.C. toepassing zou kunnen vinden (zie § II.8; Admirand en Bauer, 1971; Stiehl en Admirand, 1972).

5.2.3. Geneesmiddelen-hepatitis

Dit is een leverbeschadiging, waarbij histologisch tekenen van een acute hepatitis worden gevonden. Vaak is er ook sprake van cholestase. Het ontstaan van de leverbeschadiging hierbij is meestal niet van een bepaalde dosis afhankelijk. Deze berust vaak op een overgevoeligheidsreactie, die kan ontstaan na herhaald gebruik van bepaalde medicamenten, zoals chloorpromazine, isoniazide en nifluminezuur (van Berge Henegouwen e.a., 1974^a). Vaak doet de reactie zich voor bij personen met een allergische constitutie. De uitgebreidheid van de lijst van medicamenten, die deze vorm van cholestase kunnen veroorzaken, wijst erop dat eenzelfde chemische structuur niet de oorzaak van deze reactie kan zijn (Perez e.a., 1972).

5.2.4. Geneesmiddelen-cholestase zonder de histologische tekenen van een hepatitis

Hier wordt bedoeld de cholestase, zoals die veroorzaakt kan worden door bepaalde steroïden. Bij deze groep bestaat wel een dosis afhankelijkheid. Onderzoek van de chemie der steroïden heeft een factor aan het licht gebracht, die verantwoordelijk is voor de cholestase. Hier is geen sprake van een overgevoeligheidsreactie. Alle personen die b.v. 17 α -methyltestosteron toegediend krijgen, ontwikkelen een min of meer uitgesproken cholestase (Schalm, 1962). Dit zou voornamelijk een effect op de van galzuren onafhan-

kelijke galfractie zijn (Erlinger, 1972). Om anabole steroïden te synthetiseren, die oraal werkzaam zijn en daarom tegen het 17β -hydroxy-steroiddehydrogenase in de lever beschermd moeten worden, ging men de 17β -hydroxylgroep vervangen door een 17α -alkylgroep. Dit had echter vaak een duidelijke cholestase tot gevolg. Van een aantal andere neutrale steroïden o.a., etiocholanolon en pregnanolon is aangetoond, dat voor hun pyrogene en cytotoxische werking de 3α -hydroxy- 5β H-structuur van groot belang is. Iedere hydroxylgroep die aan zulk een steroïdskelet wordt toegevoegd en naar de achterzijde van de steroïdring (in α -positie) gericht is, vermindert de toxiciteit (Palmer, 1969). De 17α -hydroxylgroep van de corticosteroidmetabolieten en de 7α - en 12α -hydroxylgroepen van chenodesoxycholzuur en cholzuur zijn in tegenstelling tot het toxische lithocholzuur (3α - 5β H-structuur) hier voorbeelden van (zie § II.6).

5.2.5. Recidiverende intrahepatische zwangerschapscholestase

Deze vorm van cholestase is zeer zeldzaam en komt ongeveer bij 1 op 2000 zwangerschappen voor (Haemmerli, 1969). Het begint meestal in de tweede helft van de graviditeit na de 26e week. Na de partus of na onderbreking van de zwangerschap verdwijnt de cholestase zeer snel. Vaak zijn de patiënten icterisch en hebben zij veel last van jeuk. Cholestyramine wordt aanbevolen als behandeling (Huisjes, 1971).

5.2.6. Benigne intermitterende intrahepatische cholestase (Summer-skill en Walshe, 1959; de Groote e.a., 1960; Tygstrup en Jensen, 1960 en 1969; Schapiro en Isselbacher, 1963; Williams e.a., 1964; Erlinger e.a., 1972)

Dit is een zeldzaam ziektebeeld, waarvan tot nu toe enige tientallen patiënten beschreven zijn. De patiënten maken langdurige perioden met icterus door (variërend van een maand tot soms negen maanden) met heftige jeuk, die spontaan overgaan. In de prodromale periode kan er vermoeidheid, anorexie en misselijkheid aanwezig zijn. De jeuk is al vóór de icterus aanwezig. Tijdens de icterische fase kunnen heftige bovenbuikspijnen optreden, terwijl de lever soms vergroot is. Het bilirubinegehalte in serum kan tot ongeveer 80 mg/l oplopen en is voornamelijk in geconjugeerde vorm aanwezig. Ook

de serum alkalische fosfatase-activiteit en de serum galzuren zijn in deze periode verhoogd. De icterus heeft een typisch cholestatisch karakter. De patiënten hebben echter nooit een complete obstructie. Tijdens de icterische fase ziet men in het leverbiopt een uitgesproken centrolobulaire cholestase. Soms zijn de galcanaliculi verwijd, soms vindt men een verbreding van de portale driehoekjes en treedt tydelijk een bindweefseltoename op met infiltratie van mononucleaire cellen. Vooral bij langdurige icterus ontstaat het beeld van een chronische pericholangitis. Er ontstaat echter nooit een secundaire biliaire cirrhose. Het cholestatische karakter van de icterus en de buikpijnen geven nogal eens diagnostische problemen en niet zelden wordt, soms bij herhaling, een laparotomie verricht om de galwegen te inspecteren. Hierbij worden nooit afwijkingen aan het extrahepatische galwegsysteem gevonden.

De ziekte kan zich op elke leeftijd openbaren, het meest frequent tussen het 10e en 20e levensjaar. Zij komt meer voor bij mannen, terwijl soms een familiair verband aanwezig is (Tygstrup en Jensen, 1969).

Opvallend is, dat de patiënten tussen de icterische fasen geheel gezond zijn en in het leverbiopt dan geen afwijkingen gezien worden. Als therapie voor de heftige jeuk, die waarschijnlijk veroorzaakt wordt door ophoping van galzuren in de huid, heeft men vooral het cholestyramine met succes gebruikt (Spiegel e.a., 1966). Ook fenobarbital is met succes toegepast. Het veroorzaakt een verbeterde galafvloed en de serum concentratie van de galzuren daalt (Stiehl en Admirand, 1972). Hoewel de oorzaak van deze ziekte onbekend is, pleit het voorkomen ervan in besloten gemeenschappen voor een genetisch bepaald enzymdefect.

5.2.7. Primaire scleroserende cholangitis (Warren e.a., 1966; Sherlock, 1968; Tinckler, 1971; Thompson e.a.; 1972; Markoff, 1973)

Dit is een zeldzame ziekte, die gekenmerkt wordt door een niet specifieke ontstekingsreactie met verspreide fibreuze verdikkingen van de extrahepatische galwegen, waarbij ook de intrahepatische galwegen mee kunnen doen. De aandoening kan sluipend ontstaan en snel progressief worden. Klinisch staat een toenemende icterus

met buikpijn op de voorgrond. De ziekte ontstaat meestal in de 4e of 5e decade en komt driemaal meer voor bij mannen dan bij vrouwen. Het beeld is dat van een obstructie-icterus. Een totale afsluiting van de galwegen, c.q. het afwezig zijn van gal in de darm, is geen obligaat verschijnsel. De diagnose wordt gesteld tijdens laparotomie. De extrahepatische galwegen zijn sterk fibrotisch verdikt en voelen aan als getromboseerde venen.

Meyers e.a. (1970) hebben de volgende criteria voor het syndroom opgesteld:

1. Progressieve geelzucht van het obstructie type.
2. Er mogen geen stenen in de galwegen aanwezig zijn.
3. Tevoren mogen geen chirurgische ingrepen aan de galwegen verricht zijn.
4. Er moet histologisch een gegeneraliseerde verdikking en stenose van een deel van het galwegsysteem aanwezig zijn.
5. Een cholangiocarcinoom en hoog in de hilus gelegen extrahepatische carcinomen moeten uitgesloten worden.
6. Een P.B.C. is niet in het spel.
7. Een colitis ulcerosa of ziekte van Crohn mogen niet aanwezig zijn. Deze aandoeningen zijn in combinatie met een scleroserende cholangitis beschreven (Atkinson e.a., 1964; Warren e.a., 1966). Bij deze combinatie zou men van een secundaire scleroserende cholangitis moeten spreken.

Histologisch toont de lever galstase en periportale fibrose. Wanneer intrahepatisch gelegen galgangen betrokken zijn bij het ziekteproces, kan verwarring met een P.B.C. ontstaan (Bhatial e.a., 1969). Bij het voortschrijden van de ziekte ontstaat een secundaire biliaire cirrhose met een portale hypertensie. De patiënten overlijden gewoonlijk 4 tot 6 jaar na het stellen van de diagnose.

Carey e.a. (1966) hebben gesuggereerd, dat de cholestase en de beschadiging van de galductuli, die wel bij een colitis ulcerosa gezien worden, het gevolg zijn van een abnormaal grote absorptie van potentieel toxische galzuren (lithocholzuur) door het beschadigde darmoppervlak.

Meyers e.a. (1970) vermelden redelijke resultaten met corticosteroiden, doch helaas was de "follow up" van deze patiënten niet langer dan een jaar. Andere immunosuppressiva zouden ook tij-

delyk een verbetering van de obstructie kunnen brengen (Warren e.a., 1966). Als therapeutische maatregel wordt wel drainage van de ductus choledochus of van een van de ductus hepatici geadviseerd, hoewel het soms moeilijk en zelfs onmogelijk is, om de drain in het vernauwde lumen op te voeren. Ondanks enig tydelijk succes van een dergelijke drainage ontstaat toch bij de meeste patiënten snel een recidief door het ontstaan van hogerop gelegen stenosen, waarbij opnieuw een belemmering van de galafvoer ontstaat. De uiteindelijke prognose is dan ook infaust. De toepassing van cholestyramine en antibiotica (doxycycline) bij deze patiënten bevindt zich nog in een experimenteel stadium.

II.6. Galzuren en Cholestase

In deze paragraaf zal eerst de rol, die stoornissen in het galzuurmetabolisme mogelijk spelen bij het ontstaan en onderhouden van cholestase en leverbeschadiging worden besproken. Vervolgens zal deze kennis die voornamelijk uit het dierexperiment verkregen is, getoetst worden aan de uit de literatuur bekende gegevens betreffende stoornissen in het galzuurmetabolisme, die gevonden zijn bij cholestatische syndromen en bij levercirrhose bij de mens. Schaffner en Popper (1969) hebben de hypothese opgesteld, dat een stoornis in de normale micelvorming in de gal een belangrijke factor zou kunnen zijn bij het ontstaan van intrahepatische cholestase. Deze zou voornamelijk veroorzaakt worden door synthese in de lever van monohydroxygalzuren. Hiermee zou men dan het biochemische substraat voor de gevonden morfologische afwijkingen in de lever in handen hebben. Hoewel een stoornis in de galsecretie onder invloed van een gestoorde micelvorming nog tamelijk speculatief is, lijkt het wel waarschijnlijk, dat de leverparenchymbeschadiging als gevolg van de cholestase, of deze nu van intrahepatische dan wel van extrahepatische oorsprong is, eerder door een gestoorde afvoer van galzuren dan van andere galbestanddelen, zoals bilirubine, veroorzaakt wordt (Hutterer e.a., 1972; Popper, 1972).

II.6.1. De betekenis van monohydroxygalzuren voor het ontstaan van cholestase

Holsti (1960 en 1962) toonde voor het eerst aan, dat door

lithocholzuur in een overmaat aan proefdieren toe te dienen, een cholestase en na langere tijd zelfs een cirrhose geïnduceerd kon worden. Lithocholzuur ontleent zijn naam aan het feit dat het bij lichaamstemperatuur onoplosbaar is in water. Het wordt onder normale omstandigheden door een bacteriële 7α -dehydroxylering in het colon uit chenodesoxycholzuur gevormd en slechts voor een gering gedeelte geabsorbeerd (Norman en Sjövall, 1960; Hellström en Sjövall, 1961). De geringe hoeveelheid lithocholzuur in de gal kan door inbouw in een micel samen met andere meer polaire galzuren wel in oplossing gehouden worden (Small en Admirand, 1969). Eén mol lithocholzuur kan in vitro door 9 mol di- of trihydroxygalzuren in een micellaire oplossing gebracht worden (Hofmann en Small, 1967). Dit verhindert dat lithocholzuur in kristallijne vorm neerslaat. Lithocholzuur samen met zijn 3β -isomeer isolithocholzuur, wordt in hoge concentratie in de menselijke feces aangetroffen (Rosenfeld en Hellman, 1962). Met gevoelige technieken (hoofdstuk III) lukt het om ook bij gezonde personen lithocholzuur in de gal aan te tonen. Norman en Palmer (1964) gaven oraal ^{14}C -24-lithocholzuur aan patiënten, die de volgende dag een cholecystectomie ondergingen. Zij vonden de radio-activiteit in de feces en in de galblaasgal terug. De radio-activiteit in de gal was afkomstig van lithocholzuur, isolithocholzuur en van een toendertijd onbekend galzuur, dat later als het 3α -sulfaatveresterde lithocholzuur werd geïdentificeerd (Palmer, 1967). De grootte van de totale lithocholzuurpool bij normale personen werd door Vlahcevic e.a. (1971) gemeten. Zij vonden een gemiddelde van 50 mg, hetgeen 1 tot 2% van de totale galzuurpool is.

Naast het lithocholzuur zouden ook andere monohydroxygalzuren een rol kunnen spelen bij syndromen die gepaard gaan met cholestase. Normaal vindt bij de synthese van galzuren uit cholesterol eerst een hydroxylering van de steroidring en in de tweede instantie pas een zyketenoxydatie tot C-24-galzuren plaats. Na incubatie van rattlevermitochondriën met ^{14}C -cholesterol wordt o.a. het 3β -OH- Δ 5-choleenzuur gevormd (Mitropoulos en Myant, 1967). Wanneer men 26-OH-cholesterol aan ratten en hamsters intraveneus toedient, dan ontstaat een snelle omzetting in mono-, di-, en trihydroxygalzuren (Wachtel e.a., 1968; Javitt, 1969). Als een van de monohydroxygalzuren werd het 3β -OH- Δ 5-choleenzuur hierbij gef-

dentificeerd, een verbinding die bij de gewone synthese van galzuren uit cholesterol niet wordt gevormd. Javitt (1969) heeft op grond hiervan de hypothese opgesteld, dat nog een andere syntheseweg van galzuren zou kunnen bestaan. In plaats van de normale voorrang van de hydroxylering van de steroidring boven de zijketenoxydatie zou onder pathologische omstandigheden, bijv. bij cholestase, een remming van deze hydroxylering kunnen ontstaan en de synthese van galzuren uit cholesterol kunnen beginnen met een zijketenoxydatie, hetgeen resulteert in een grotere kans tot het vrijkomen van monohydroxygalzuren en van chenodesoxycholzuur (zie Fig. II.2.). Intussen is door Anderson e.a. (1972) aangetoond, dat de synthese van chenodesoxycholzuur via 26-OH-cholesterol-C¹⁴ ook bij de mens mogelijk is. Hoewel het bestaan van deze alternatieve synthesemogelijkheid wel waarschijnlijk lijkt, is de kwantitatieve betekenis ervan onbekend.

Bij proefdieren blijkt behalve lithocholzuur, ook het genoemde 3 β -OH- Δ 5-choleenzuur een aanzienlijke reductie in de galsecretie te kunnen veroorzaken (Javitt en Emermann, 1968). Bij proefdieren veroorzaakt het lithocholzuur in lage dosis voornamelijk een galgangbeschadiging, bestaande uit proliferatie en hyperplasie van de ductuli, wat gepaard gaat met een vermindering van de galsecretie. Aangezien deze zelfde effecten, ten dele in vivo en ten dele in de geïsoleerde en geperfundeerde lever, bij ratten (Carey e.a., 1966; Palmer en Hruban, 1966), muizen, hamsters, cavia's (Palmer, 1969) bavianen (Carey e.a. 1966) en andere aapsoorten (Hunt, 1965) door lithocholzuur geïnduceerd kunnen worden, is het niet onredelijk te veronderstellen dat monohydroxygalzuren een leverbeschadiging en met name een beschadiging van galcanaliculi en galwegepitheel bij de mens zouden kunnen veroorzaken.

De door lithocholzuur bij proefdieren veroorzaakte cholestase kan worden tegengegaan door tegelijkertijd voldoende di- of trihydroxygalzuren toe te dienen, teneinde de verhouding van de andere galzuren tot lithocholzuur op molecuulbasis boven de 2 te houden. Hierbij wordt het lithocholzuur opgenomen in de micellen gevormd door de andere galzuren (Javitt en Emermann, 1968). Dat deze vorm van intrahepatische cholestase tot stand zou kunnen komen door een remmend effect van het lithocholzuur op de vorming van de van galzuren onafhankelijke galfractie, suggereert de studie van King en

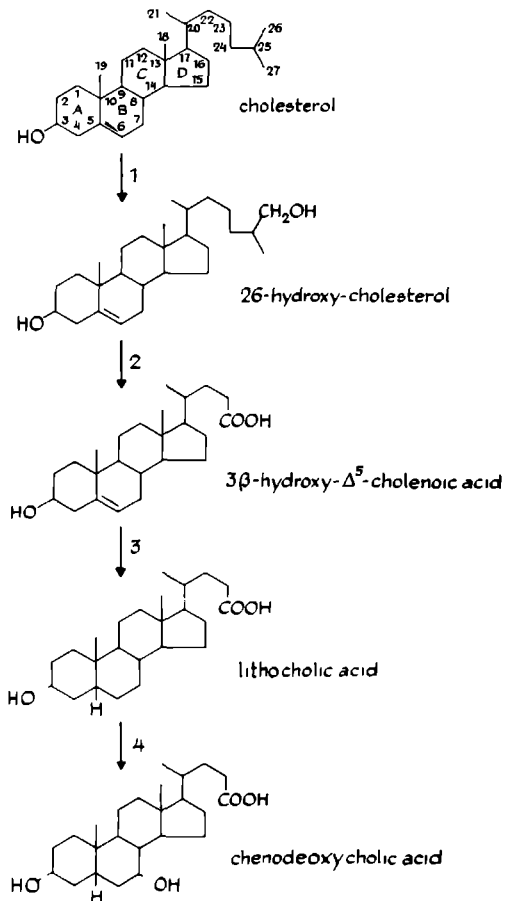


Fig 11 2 Alternative synthetic pathway of chenodeoxycholic acid (Mitropoulos and Myant 1967 Javitt, 1969)

- 1 hydroxylation of the side chain
- 2 β oxydation of the side chain
- 3 stereospecific saturation of C₅ -C₆ binding and conversion of 3 α into 3 β position
- 4 7 α hydroxylation

Schoenfield (1972) met de geïsoleerde en geperfundeerde hamsterlever. Tijdens de geïnduceerde cholestase bleef de excretie van galzuren constant, terwijl de natriumexcretie duidelijk verminderde. Bij dit kortdurende experiment werden slechts geringe concentraties lithocholzuur aan het perfusiemedium toegediend ($5 \mu\text{mol/l}$). Histologische afwijkingen werden er niet bij waargenomen. In eenzelfde soort studie met de geïsoleerde en geperfundeerde rattelever, waarbij concentraties tot $30 \mu\text{mol/l}$ lithocholzuur werden gebruikt, werden zowel elektronenmicroscopisch als lichtmicroscopisch duidelijke veranderingen aan de galcanaliculi in de vorm van dilatatie, verlies van microvilli en reduplicatie van de canaliculaire membraan gevonden (Fisher e.a., 1971). Deze morfologische afwijkingen bij cholestase waren al eerder door Schaffner en Javitt (1966) beschreven bij kortdurende in vivo experimenten met hamsters. Hierbij werden ook veranderingen gezien van het endoplasmatisch reticulum en aan de mitochondriën. De overeenkomst tussen de histologische afwijkingen, die door monohydroxygalzuren bij proefdieren veroorzaakt worden en die, welke bij patiënten met langdurige cholestase gevonden worden, waarbij kristalachtige partikels tegen de canaliculaire membraan kunnen worden gezien - een mislukte poging tot micelvorming? - is de grondslag geweest van de door Schaffner en Popper (1969) opgestelde hypothese, waarbij lithocholzuur als primaire oorzaak verantwoordelijk wordt gesteld voor sommige vormen van intrahepatische cholestase bij de mens.

II.6.2. De betekenis van andere galzuren voor het ontstaan van cholestase

Uit recent onderzoek van Hutterer e.a. (1972) blijkt, dat ook een retentie van normale di- of trihydroxygalzuren verantwoordelijk kan zijn voor de gevonden elektronen- en lichtmicroscopische afwijkingen bij cholestase. In vitro worden galzuren, indien in lage concentratie aanwezig, gebonden aan het lipoproteïnedeel van het enzym cytochroom P-450, een oxydase met diverse functies binnen het microsomale biotransformatiesysteem, dat in het gladde endoplasmatisch reticulum van de levercel is gelokaliseerd. Deze binding leidt tot een competitieve remming van de omzetting van chemische stoffen en geneesmiddelen. De galzuren kunnen hierdoor -

samen met andere steroïden - de hydroxylering van allerlei endogene en exogene substanties beïnvloeden.

Bij retentie van grote hoeveelheden galzuren in de lever of bij een langdurige inwerking van galzuren op het cytochroom P-450 zou een destructie van de bindingsplaats op het betreffende lipoproteïne ontstaan (Hutlerer e.a., 1972).

Bij nog hogere concentraties gaat door de detergentende werking het cytochroom P-450 zelf te gronde (Denk e.a., 1971 en 1971^d). Dihydroxygalzuren met α -OH-groepen, zoals chenodesoxycholzuur, zijn wat deze detergentende werking betreft aanzienlijk actiever dan galzuren met β -OH-groepen of α -trihydroxygalzuren. Om deze reden is het belangrijk te weten, dat galwegonderbinding bij ratten wordt gevolgd door een stijging van de dihydroxygalzuurconcentraties in de lever van 0,3 tot 0,6 mmol/l, hetgeen ruim binnen de marge ligt van de concentraties, waarbij het cytochroom P-450 vernietigd wordt (Greim e.a., 1972).

Retentie van galzuren kan dus het gladde endoplasmatisch reticulum beschadigen. Elektronenmicroscopisch onderzoek laat het beeld zien van een hypertrofie hiervan, maar dit zou toch functioneel inactief zijn (Schaffner en Popper, 1969; Schaffner e.a., 1971). De vorming van een overmaat chenodesoxycholzuur in de levercel zou voldoende zijn om de leverbeschadiging te kunnen verklaren. Bij de ratten met galwegonderbinding ziet men de synthese van galzuren veranderen in die zin, dat er via een alternatieve syntheseweg inerte galzuren worden gemaakt, d.w.z. galzuren zoals α -muricholzuur (3α , 6β , 7α -trihydroxy- 5β -cholaanzuur), 3 -muricholzuur (3α , 6β , 7β -trihydroxy- 5β -cholaanzuur) en ursodesoxycholzuur (3α , 7β -dihydroxy- 5β -cholaanzuur), die veel minder sterk detergentend werken en daardoor ook minder schadelijk zijn voor het cytochroom P-450. De geringe leverbeschadiging van cholestase bij de rat lijkt hiermee verklaard te worden (Greim e.a., 1972). De mens daarentegen heeft waarschijnlijk niet de beschikking over een dergelijk mechanisme. In de vroege stadia van ernstige galwegobstructies vindt men in de lever een hoge concentratie cholzuur, maar slechts geringe concentraties chenodesoxycholzuur. Bij de mens zou het voornamelijk stijgen van de intrahepatische cholzuurconcentratie kunnen wijzen op een tijdelijk beschermingsmechanisme, waarbij de ophoping van het meer toxische chenodesoxycholzuur verhindert

wordt. Bij langdurige cholestase ontstaat langzamerhand een duidelijke stijging van de chenodesoxycholzuurconcentratie, parallel met het ontstaan van ernstige leverparenchymbeschadiging en leverinsufficiëntie (Greim e.a., 1972^a). Deze door de cholestase veroorzaakte leverparenchymbeschadiging vindt men het beste weerspiegeld in de zogenaamde "vederachtige" (feathery) degeneratie van het levercelcytoplasma en in de fibrosevorming.

Bij sommige vormen van galwegatresie bij kinderen ziet men, evenals bij de intrahepatische cholestase bij volwassenen, deze leverbeschadiging met enige vertraging ontstaan. Dit zou kunnen berusten op een beschermingsmechanisme, waarbij relatief meer cholzuur geretineerd wordt in de lever dan chenodesoxycholzuur. Hierbij lijkt ook de bevinding van Samuels en Palmer (1973) van belang, die vonden, dat bij patiënten met een obstructie-icterus de cholzuurpool vergroot kan worden door een intrahepatische omzetting van chenodesoxycholzuur in cholzuur. Een dergelijke synthese van cholzuur was tot nu toe niet bekend bij de mens.

Bij een ernstige beschadiging van microsomale structuren zoals bij langdurige cholestase kan men zich bovendien voorstellen, dat de mitochondriale zijketenoxydatie-syntheseweg (Fig. II.2.) de overhand krijgt, waardoor het ontstaan van meer chenodesoxycholzuur en mogelijk ook van intermediaire stofwisselingsprodukten als lithocholzuur en 3β -OH- Δ 5-choleenzuur, verklaard zou kunnen worden. Hiervoor zou ook de volgende bevinding van Admirand en Trey (1968) kunnen pleiten. In levers van patiënten, die aan een acute massale levernecrose waren overleden, konden zij verhoogde concentraties lithocholzuur aantonen. In levers van patiënten met extrahepatische obstructie werd dit echter niet gevonden (Greim e.a., 1972^a en 1973). Terwijl de betekenis van stoornissen in het metabolisme van galzuren voor het ontstaan van cholestase bij de mens nog een open vraag blijft, biedt de retentie van bepaalde galzuren wel een verklaring voor de gevonden morfologische en functionele afwijkingen bij cholestase.

II.6.3. Veranderingen in het galzuurmetabolisme tijdens cholestase bij de mens

6.3.1. Algemene bevindingen:

Bij patiënten met cholestase door intrahepatische of extrahepatische oorzaken zijn de concentraties van cholzuur en minder uitgesproken van chenodesoxycholzuur verhoogd in het serum. Secundaire galzuren komen bij complete obstructies van de galwegen in de regel niet voor. De verhouding cholzuur t.o.v. chenodesoxycholzuur (chol/chen-ratio) is sterk verhoogd in vergelijking met die bij normale personen. Bij toenemende leverinsufficiëntie en bij levercirrhose daalt de chol/chen-ratio beneden 1,0 (Osborn e.a., 1959; Carey, 1969). Bij de P.B.C. werd dit bevestigd door Murphy e.a. (1972) en Kaplowitz, e.a. (1973).

6.3.2. Monohydroxygalzuren

Bij 8 van de 11 onderzochte patiënten met P.B.C. toonden Murphy e.a. (1972 en 1972^a) een verhoogde concentratie aan in het serum van monohydroxygalzuren. Tezamen waren deze concentraties 12-35% van de totale serum galzuurconcentraties. Een deel hiervan werd met een combinatie van dunne laag chromatografie en massaspectrometrie geïdentificeerd als een monohydroxygalzuur met een C5-C6 onverzadigde binding. Gesuggereerd werd dat dit het 3β -OH- Δ 5-choleenzuur zou kunnen zijn. Bij een aantal andere aandoeningen met cholestase werd ook een verhoogde concentratie van dit monohydroxygalzuur gevonden (Murphy e.a., 1972). Door andere onderzoekers werden met dunne laag- en gaschromatografie bij P.B.C. slechts sporen monohydroxygalzuren aangetoond (Rautureau e.a., 1967; Makino e.a., 1969; Neale e.a., 1971; van Berge Henegouwen e.a., 1973; Kaplowitz e.a., 1973). De patiënten van Murphy e.a. (1973) met een P.B.C., die een verhoogde serum monohydroxygalzuurconcentratie hadden, hadden allen ook een serum bilirubinespiegel boven de 30 mg/l. Bij lagere bilirubineconcentraties werd nauwelijks een verhoogde monohydroxygalzuurconcentratie gevonden. Dit suggereert dat de bevindingen van Murphy e.a. eerder een gevolg dan een oorzaak van cholestase zijn. Toediening van cholestyramine aan deze patiënten veroorzaakte een aanzienlijke daling van de totale serum concentratie aan galzuren, terwijl ook de serum monohydroxygalzuurconcentraties sterk gereduceerd werden.

Bij drie patiënten met een acute hepatitis werd door Carey en

Williams (1965) gaschromatografisch lithocholzuur in serum aangetoond. Williams e.a. (1972) beschreven een familiair voorkomen van een fataal verlopende cholestatische icterus met cirrhose. Bij twee kinderen, was het lithocholzuur in fors verhoogde concentraties in serum en gal aanwezig, terwijl ook de synthesesnelheid van chenodesoxycholzuur, de voorloper van lithocholzuur, sterk was toegenomen.

Back (1973) toonde gaschromatografisch monohydroxygalzuren in geringe concentraties aan in urine van patiënten, die leden aan intra- of extrahepatische cholestase, terwijl desoxycholzuur, dat de meest gevoelige indicator is voor bacteriële omzetting van galzuren in de darm, compleet afwezig bleek te zijn. Deze bevindingen suggereren, dat de synthese van monohydroxygalzuren - gevonden werden o.a. lithocholzuur en 3β -OH- Δ 5-choleenzuur - in de lever onder deze omstandigheden mogelijk is.

Gaschromatografisch onderzoek van urine van vier kinderen met aangeboren extrahepatische galgangatresieën leverde verschillende afwijkende monohydroxygalzuren op. Er werden gevonden 3β -OH- Δ 5-choleenzuur, 3β -OH- 5β -cholaanzuur (allolithocholzuur) en lithocholzuur (Makino e.a., 1971). Ook deze bevinding kan als een gevolg van de galafvloedbelemmering opgevat worden.

Hoewel men vroeger dacht, dat bij ernstige beschadiging van de mucosa van de dunne of dikke darm een meer dan normale absorptie van lithocholzuur zou kunnen optreden, werd dit niet bevestigd bij onderzoek van patiënten met de ziekte van Crohn of een colitis ulcerosa (Carey e.a., 1967^a; Neale e.a., 1971). Vena portae bloed werd echter niet onderzocht bij deze patiënten. Ook door toediening van chenodesoxycholzuur tot 1,5 g per dag aan galsteenlijders ontstaat geen verhoogde concentratie lithocholzuur in gal (Danzinger e.a., 1972).

Concluderend kan dan ook gesteld worden, dat monohydroxygalzuren als oorzaak van de cholestase uitzonderlijk zeldzaam een rol zullen spelen (Williams e.a., 1972). Over de betekenis van monohydroxygalzuren voor het onderhouden van de cholestase bestaat geen eenstemmigheid.

6.3.3. Andere kwalitatief afwijkende galzuren

Eyssen e.a. (1972) en Boon (1973) vonden in duodenumvocht

van twee neonaten met congenitale afwijkingen en een incomplete intrahepatische cholestase ten gevolge van een partiële atresie van de interlobulaire galgangen het trihydroxycoprostaanzuur en mogelijk ook het dihydroxycoprostaanzuur. Dit zijn C_{27} -galzuren en intermediaire produkten bij de normale synthese van C_{24} -galzuren bij de mens. In krokodillengal en bij andere reptielen komen deze C_{27} -galzuren voor als de voornaamste eindprodukten van de omzetting van cholesterol in galzuren (Haslewood, 1952). Bij deze pasgeborenen moet dit opgevat worden als een stoornis in de mitochondriale zijketenoxydatie.

Back (1973) kon in urine van patiënten met intra- en extrahepatische cholestase ursodesoxycholzuur aantonen. Salen e.a. (1974) vonden in de gal van patiënten met galstenen, die hiervoor chenodesoxycholzuur toegediend kregen, ursodesoxycholzuur in hoge concentratie. Deze bevindingen wijzen op een andere syntheseweg, waarbij chenodesoxycholzuur wordt omgezet in ursodesoxycholzuur in de lever of via bacteriële inwerking in de darm.

6.3.4. Sulfaatverestering van galzuren

Palmer (1967) heeft aangetoond, dat een deel der galzuren veresterd kan worden met een sulfaatgroep aan de 3α , 7α , of 12α OH-groep. 50% van oraal toegediend ^{14}C -lithocholzuur werd in gal teruggevonden in de beter oplosbare sulfaatveresterde vorm (Palmer, 1971). Hiermee werd aannemelijk gemaakt dat deze sulfaatverestering in ieder geval in de lever kan plaatsvinden. Bovendien is van andere toxische steroïden bekend, dat deze in de lever aan sulfaat gekoppeld kunnen worden (Palmer, 1969).

Door bij de dunne laag chromatografie gebruik te maken van een speciale loopvloeistof kunnen de tauro- en glycolithocholzuur-sulfaatesters vlak bij de opbrengplaats worden geïdentificeerd (Palmer en Bolt, 1971). Onder normale omstandigheden zal mogelijk een klein, kwantitatief onbelangrijk, deel van de galzuren met sulfaat veresterd zijn. Stiehl (1972 en 1974) kon met dunne laag chromatografie 3α -, 7α - en 12α -sulfaatesters van mono-, di- en trihydroxygalzuren in de urine terugvinden bij zowel extra- als intrahepatische cholestase. Door deze sulfaatverestering neemt de polariteit sterk toe en verloopt de klaring door de nier van galzuren ongeveer 15 keer effectiever.

In experimenten met geïsoleerde en geperfundeerde levers van de rat was al aangetoond dat het 3 α -sulfaatveresterde lithocholzuur minder cholestase induceerde dan lithocholytaurine of -glycine (Fisher e.a., 1971). Deze sulfaatverestering van galzuren, kan dan ook opgevat worden als een mogelijkheid van de lever om zich te ontdoen van potentieel schadelijke concentraties aan galzuren, en speciaal monohydroxygalzuren. Dit vindt enerzijds plaats via de sterk toegenomen klaring door de nier, anderzijds zullen deze sulfaatesters, mits er nog voldoende galafvloed naar de darm bestaat, door de sterkere zure eigenschappen minder in de darm worden teruggeresorbeerd (Low-Beer e.a., 1969).

Dat door de meeste onderzoekers praktisch geen lithocholzuur wordt teruggevonden in het perifere bloed bij cholestase kan een gevolg zijn van de veel effectievere klaring door de nier van de sulfaatveresterde fractie van dat galzuur (Admirand e.a., 1972). Aangezien door de sulfaatverestering de chromatografische eigenschappen van lithocholzuur sterk veranderen, is het twijfelachtig, of lithocholzuurbepalingen in gal, maar vooral in urine, zonder aparte sulfaathydrolyse vooraf, wel een juist beeld geven van de totale lithocholzuurconcentratie. Anderzijds kan men stellen, dat lithocholzuurbepalingen zonder aparte sulfaathydrolyse niet nutteloos zijn, daar in ieder geval de meer toxische fractie kan worden aangetoond (Palmer, 1972). Doordat bij cholestase retentie van galzuren ontstaat met overloop uit de lever naar de extracellulaire ruimte buiten de lever, wordt duidelijk, dat de renale klaring van galzuren een belangrijke rol zal spelen bij de afvoer van potentieel toxische galzuren. De renale klaring van galzuren zal effectiever verlopen naarmate de galzuren meer aan taurine gekoppeld zijn, meer OH-groepen bevatten en meer met sulfaat veresterd zijn (Weiner e.a., 1964; Stiehl, 1973). De eerste voorlopige resultaten van Admirand e.a. (1972) en Stiehl (1974) tonen aan, dat bij de intra- en extrahepatische cholestase praktisch geen sulfaatveresterde galzuren in serum aantoonbaar zijn, terwijl in de urine meestal meer dan 60% van de galzuren aan sulfaat veresterd is. Dit is ook bevestigd door onderzoekingen van Makino e.a. (1972 en 1973).

6.3.5. Kwantitatieve veranderingen in de synthese van primaire galzuren

Wat de invloed van cholestase op de synthese van primaire galzuren in de lever kan zijn, is niet moeilijk te voorspellen. Waarschijnlijk benadert de opvatting van Small e.a. (1972) het meest de werkelijkheid. Zij gaan ervan uit, dat de intrahepatische galzuursynthese gereguleerd wordt door wat zij noemen de kritisch remmende concentratie van galzuren. Wanneer de concentratie van de galzuren, die via de vena portae en de arteria hepatica (deze laatste speelt onder normale omstandigheden geen rol van betekenis) naar de lever terugkeren, deze kritisch remmende concentratie overschrijdt, dan stopt de synthese van galzuren in de levercel door remming van het enzym 7α -hydroxylase.

In pathologische omstandigheden, zoals bij cholestase en cirrhose, moet men met 4 factoren rekening houden:

- a. Hoe is de toestand van de lever? Is de gehele lever ziek of een deel? Is de levercel misschien minder gevoelig gemaakt voor het terugkoppelingsmechanisme bijv. door het gebruik van fenobarbital, waardoor de kritisch remmende concentratie hoger komt te liggen?
- b. Hoe is het gesteld met de totale levermassa? Is de normale architectuur van de lever behouden gebleven en krijgen de levercellen een normale aanvoer van bloed via de sinusoiden?
- c. Hoe is het gesteld met de opnamecapaciteit van de individuele levercel?
- d. Hoe is het gesteld met de concentratie van de galzuren in het bloed dat naar de lever stroomt?

Wanneer men deze factoren overweegt, dan kan men veronderstellen, dat bij cholestase door de continue toevoer van galzuren via de vena portae en de arteria hepatica, de synthese waarschijnlijk gedeeltelijk of geheel onderdrukt zal worden. Onder normale omstandigheden vindt deze toevoer meer stootsgewijs plaats ten tijde van de maaltijden. In de tussenliggende perioden met geringe aanvoer, bijv. 's nachts, kan de synthese dan flink oplopen. Bij de levercirrhose is de synthese waarschijnlijk ook verminderd, doordat de kritisch remmende concentratie voor de afzonderlijke levercellen in

de cirrhotische lever lager ligt dan voor de normale levercellen (Small e.a., 1972).

II.6.4. Gevolgen van retentie van galzuren tijdens cholestase

Door een belemmering van de galsecretie ontstaat enerzijds een tekort aan galzuren in de dunne darm, anderzijds een cumulatie van galzuren in de perifere circulatie.

6.4.1. Gevolgen van een tekort aan galzuren in de dunne darm

Door de verminderde galsecretie kan een tekort aan galzuren in het dunne darmlumen ontstaan. Wanneer de galzuurconcentratie in het duodenum daalt beneden de critische micellaire concentratie, dan zal het transport en de absorptie van de vrije vetzuren, de monoglyceriden en de vetoplosbare vitaminen nadelig beïnvloed worden. De vorming van "mixed micelles" is dan minder goed mogelijk en steatorroe kan optreden (Hofmann en Small, 1967). De afwezigheid van micellen hoeft echter niet noodzakelijk een ernstige steatorroe tot gevolg te hebben, aangezien de absorptie van vrije vetzuren onder deze omstandigheden door de hele dunne darm nog vrij effectief kan plaats vinden (Morgan e.a., 1969; Porter e.a., 1971).

Anders is het gesteld met de absorptie van vitamine A, D, E en K. Voor de absorptie zijn deze vitaminen bijna geheel afhankelijk van een goede concentratie aan galzuren in het dunne darmlumen (Forsgren, 1969). Osteomalacie als gevolg van vitamine D-tekort is dan ook een bekende complicatie van langdurige cholestase.

6.4.2. Cumulatie van galzuren in de perifere circulatie

De totale concentratie van galzuren in het serum is bij allerlei leverziekten verhoogd en kan bij de obstructie-icterus tot honderdmaal de normale waarde oplopen. Er lijkt een redelijke lineaire correlatie te bestaan tussen de totale galzuurconcentratie en het bilirubinegehalte in serum (Carey, 1969; Neale e.a., 1971). De totale galzuurconcentratie heeft waarschijnlijk geen waarde voor de diagnostiek van leverziekten, maar is wel een gevoelige parameter voor schommelingen in de functie van de lever, zoals deze bestaan bij de acute en chronische hepatitis (Korman e.a., 1973). Rudman en Kendall (1957^a), Osborn e.a. (1959) en Carey (1958) toonden voor

het eerst aan, dat de chol/chen-ratio of de trihydroxy-dihydroxy-galzuur verhouding in serum groter is dan normaal bij patiënten met een obstructie-icterus en lager dan normaal bij patiënten met een cirrhose. Normaal schommelt de chol/chen-ratio rond de 1,0 met een grote spreiding van 0,7 - 2,0 (Carey, 1969; Neale e.a., 1971). Bij de obstructie-icterus is de stijging van de chol/chen-ratio te danken aan een onevenredige toename van de serum cholzuurconcentratie, terwijl bij de cirrhose een onevenredige toename van het chenodesoxycholzuur bestaat. Carey (1969) ging ervan uit dat de stijging in serum van chenodesoxycholzuur veroorzaakt werd door een verminderde 12 α -hydroxylase-activiteit bij toenemende leverbeschadiging. In de literatuur bestaat de neiging om de trihydroxy-dihydroxy-ratio gelijk te stellen aan de chol/chen-ratio, omdat men aanneemt dat bij de verschillende leveraandoeningen het desoxycholzuur niet of slechts in geringe concentratie aanwezig is. De reden hiervan is echter, dat bij de dunne laag chromatografie geen goede scheiding verkregen kan worden tussen het chenodesoxycholzuur en het desoxycholzuur. Met behulp van de gaschromatografie is het wel mogelijk om een goede scheiding te verkrijgen tussen de vier belangrijkste galzuren. Het is dan ook juist om de chol/chen-ratio te gebruiken en de aan- of afwezigheid van desoxycholzuur apart te bestuderen.

In het algemeen kan men stellen, dat afhankelijk van de leverfunctie en mogelijk ook van de ernst en de duur van de cholestase, een bepaald galzuurpatroon in serum gevonden wordt. De chol/chen-ratio is aanvankelijk verhoogd ($>1,5$). Bij toenemende leverparenchymbeschadiging en leverinsufficiëntie daalt de chol/chen-ratio ($<1,0$), hetgeen als een omineus teken gezien zou kunnen worden (Carey, 1969).

Bij de obstructie-icterus en bij andere vormen van cholestase kan het desoxycholzuur afwezig of verminderd aanwezig zijn en door Makino e.a. (1969) is gesuggereerd, dat dit betekenis zou hebben voor de diagnostiek van de verschillende vormen van cholestase. De mate van conjugatie aan taurine of glycine van galzuren is bij de verschillende vormen van icterus nog niet uitvoerig bestudeerd.

Ongeconjugeerde galzuren worden in wisselende concentratie in normaal serum aangetroffen (Sandberg e.a., 1965; Makino e.a., 1969). Deze worden in verhoogde concentraties aangetroffen bij

patiënten met een toegenomen deconjugatie van galzuren in de dunne darm ten gevolge van een abnormale bacterieflora (Lewis, 1969). Tot nu toe is niet gebleken dat het scheiden van galzuren in ongeconjugeerde en geconjugeerde fracties zin heeft voor de diagnostiek van leverziekten (Paumgartner en Grabner, 1970; Neale e.a., 1971). De glycine-aurine verhouding van de geconjugeerde galzuren is normaal 2 à 4 : 1 (Carey, 1969; Neale e.a., 1971), maar deze is duidelijk verhoogd in die situaties, waarbij een malabsorptie van galzuren in de darm bestaat. Dit wordt veroorzaakt door een versnelde synthese van galzuren in de lever en door een relatief tekort aan taurine in een dergelijke situatie (Garbutt e.a., 1969). In het algemeen is deze verhouding iets lager bij patiënten met een cirrhose of een cholestase dan bij normale personen. Dit zou een gevolg kunnen zijn van een verminderde synthese van galzuren. Het kleinere aanbod van galzuren aan de darm heeft verder een meer volledige resorptie tot gevolg (Sjövall, 1960; Paumgartner en Grabner, 1970; Neale e.a., 1971).

Bij normale personen bedraagt de totale concentratie aan galzuren in het serum, gaschromatografisch bepaald, minder dan 2,5 µg/ml (Sandberg e.a., 1965; Roovers e.a., 1968). Deze kan 1 à 2 uur na de maaltijd tot het 3 à 4-voudige stijgen.

Hoe de correlatie tussen de serum galzuurconcentratie en de andere leverfunctietesten is, is niet precies bekend. Het lijkt erop dat er een goede correlatie bestaat tussen de totale serum galzuurconcentratie en het bilirubine en mogelijk ook met het serum cholesterolgehalte (Carey, 1969; Neale e.a., 1971; Murphy e.a., 1972; Kaplowitz e.a., 1973).

Een goede correlatie tussen de totale concentratie aan galzuren en de serum alkalische fosfatase- en 5'-nucleotidase-activiteit is er wel bij de P.B.C., maar is onduidelijk bij andere leveraandoeningen (Kaplowitz, 1973).

Het lijkt voorbarig om op grond van bepaalde serum galzuurpatronen onderscheid te maken tussen intra- en extrahepatische cholestase, hoewel men kan stellen, dat een volledige afwezigheid van desoxycholzuur in de perifere circulatie wijst op een totale obstructie, omdat dan geen cholzuur aan de bacterieflora in de darm wordt aangeboden. Volledigheidshalve moet men hier nog aan toevoegen, dat dit ook kan gebeuren door afwezigheid van een darmflora

bijv. na het gebruik van breed spectrum antibiotica. Ook ziet men de desoxycholzuurconcentratie in de gal afnemen na het gebruik van bepaalde laxantia en slecht verteerbare voedselbestanddelen, waarschijnlijk omdat de passagesnelheid en het volume in de darm vergroot worden (Pomare en Heaton, 1973). Omdat bij een complete galwegobstructie ook geen urobilinogeen in de feces wordt teruggevonden, lijkt het van belang om de correlatie na te gaan tussen de uitscheiding van urobilinogeen in de feces en de desoxycholzuurconcentratie in serum of urine bij patiënten met cholestase.

6.4.3. Mogelijke gevolgen van cumulatie van galzuren in de perifere circulatie

a. Schietschijfcellen ("target"cellen).

Bij verschillende vormen van icterus, in het bijzonder bij de obstructie-icterus worden erythrocyten gevonden die een schietschijfvorm ofwel een macroplanie hebben (Werre e.a., 1970). Cooper e.a. (1968) menen, dat dit als een effect van hoge concentraties galzuren op de erythrocytenmembraan en op de cholesterolconcentratie hierin gezien moet worden. Bij het toedienen van lithocholzuur en cholzuur per os aan Rhesusapen, kregen de met lithocholzuur gevoerde apen "spurr"-cellen in het bloed, hetgeen parallel liep met een stijging van de lithocholzuurconcentratie. De met cholzuur gevoerde apen vertoonden dit fenomeen niet (Cooper e.a., 1972). "Spurr"-cellen zijn erythrocyten met talrijke spitse uitlopers van de membraan. Er is een verhoogd cholesterolgehalte in de celmembraan aanwezig. De osmotische resistentie is normaal. Een onderzoek naar de correlatie tussen de afwijkingen in de erythrocytenvorm en de serum galzuurconcentratie bij patiënten met een alcoholcirrhose liet zien, dat bij patiënten met schietschijfcellen de concentratie van cholzuur en desoxycholzuur in serum ongeveer gelijk was aan de chenodesoxycholzuurconcentratie. Daarentegen was bij patiënten die "spurr"-cellen hadden het chenodesoxycholzuurgehalte significant hoger dan de twee andere galzuren (Cooper e.a., 1972^a).

b. Bradycardie

Sedert onheuglijke tijden heeft men de bradycardie, die soms gezien wordt bij de obstructie-icterus, toegeschreven aan een ophoping van gal. Sobotka (1937) heeft erop gewezen, dat het een

effect van galzuren zou kunnen zijn. Dit is echter nog niet met moderne methoden onderzocht.

c. Jeuk

Een verhoogde concentratie aan galzuren in serum is de meest constante bevinding bij patiënten met het type jeuk, dat bij een obstructie-icterus voorkomt. Situaties waarbij sterk verhoogde waarden van vrije vetzuren, fosfolipiden en cholesterol in het serum gevonden worden, zonder verhoogde concentraties aan galzuren, gaan niet met jeuk gepaard. Door cumulatie van galzuren in de extracellulaire ruimte ontstaat, afhankelijk van de mate van eiwitbinding van de galzuren, een opslag van galzuren in de huid. Bij patiënten met cholestase en jeuk vonden Schoenfield e.a. (1967 en 1969) op de huid significant hogere concentraties galzuren dan bij patiënten zonder jeuk. De volgende argumenten pleiten voor een verhoogde serum concentratie aan galzuren als oorzaak van de jeuk:

- galwegdrainage heft de jeuk op bij een complete obstructie-icterus.
- orale toediening van galzuren doet de jeuk bij een gestoorde galafvoer toenemen.
- toediening van cholestyramine veroorzaakt een daling van de galzuurconcentratie in serum en een snelle (binnen enkele dagen) vermindering van de jeuk (v. Itallie e.a., 1961).

Wanneer de relatie tussen de serum galzuurconcentratie en de jeuk wordt bestudeerd, dan ziet men soms een interval tussen het dalen van de galzuren in het serum en het moment, waarop de jeuk minder wordt. Omgekeerd kan het 1 à 2 dagen duren voor de jeuk verergert of ontstaat bij een stijging van de serum galzuurspiegel (Carey, 1969). Mogelijk hangt dit verschijnsel samen met de mate van eiwitbinding en de tijd die nodig is om galzuren uit de bloedbaan naar de huiddepôts te transporteren, waar prikkeling van afferente zenuwen de jeuk veroorzaakt (Herndon, 1972). Murphy e.a. (1972) vonden geen goede correlatie tussen de mate van jeuk en de concentratie van de individuele galzuren in het serum bij patiënten met P.B.C. of cholestase. Wel was er bij een lage verhouding van glycine tot taurine geconjugeerde galzuren meer kans op jeuk.

d. Hypercholesterolemie

Het ontstaan van een hypercholesterolemie en hyperfosfolipidemie met een daling van de cholesterolesters in serum is een regelmatig terugkerend symptoom bij de cholestase. Soms zijn er xanthomen aanwezig, doch dit is zeker niet obligaat. Met name bij toenemende leverinsufficiëntie kan het serum cholesterolgehalte weer normaal of zelfs verlaagd zijn. Bij een geringe of beginnende cholestase vindt men soms ook normale waarden. Het mechanisme van de hypercholesterolemie bij cholestase is niet geheel duidelijk. Aanvankelijk heeft men aangenomen, dat door de verminderde terugkeer naar de lever van galzuren via de enterohepatische circulatie bij cholestase een stimulerend effect op de cholesterolsynthese in de lever zou ontstaan. Dit is waarschijnlijk niet of maar ten dele waar. Wel is er bij cholestase een verhoogde cholesterolsynthese in de lever, doch deze lijkt eerder een gevolg van een verminderde cholesterolabsorptie in de darm, waardoor minder cholesterol, dat zelf een remmend effect op de cholesterolsynthese kan uitoefenen, aan de lever wordt aangeboden (Weis en Dietschy, 1971; Weis en Baas, 1972). Tevens is aangetoond, dat bij afwezigheid van galzuren in de darm de cholesterolsynthese in de hele tractus digestivus, maar vooral in de dunne darm sterk toeneemt (Dietschy, 1969). Voor een overzicht van het cholesterolmetabolisme onder normale omstandigheden wordt verwezen naar voortreffelijke overzichten van Dietschy en Wilson (1970) en Wilson (1972).

II.7. Veranderingen in het galzuurmetabolisme bij patiënten met levercirrhose

Bij patiënten met levercirrhose verschilt het galzuurmetabolisme ook weer aanzienlijk van dat bij normale personen (Vlahcevic e.a., 1971^a, 1972 en 1973). Door vermindering van het absolute aantal levercellen en van de functie van de afzonderlijke levercellen ontstaat waarschijnlijk een geringere omvang van de galzuurpool, doordat de synthese verminderd is.

Door funktieverlies van individuele levercellen ligt de kritisch remmende concentratie mogelijk op een lager dan normaal niveau (Miettinen, 1972; Small e.a., 1972). Anderzijds kan de aanvoer van galzuren via de vena portae verminderd zijn, doordat door col-

lateralen tussen de portale en de algemene circulatie minder galzuren de lever bereiken en ook via de zieke lever een deel van de galzuren uit het vena portae-bloed direct naar de algemene circulatie zal overlopen (Kaye e.a., 1971). Theoretisch kan dit een daling van de galzuurconcentratie in de lever tot gevolg hebben en een toename van de synthese van galzuren. Deze gegevens wijzen op de complexe situatie, die bij de levercirrhose kan bestaan.

De totale serum concentratie aan galzuren is vaak duidelijk verhoogd, maar dat is geen obligaatsverschijnsel. Ook hier is er een goede correlatie tussen de serum bilirubine- en de galzuurconcentratie (Rudman en Kendall, 1957^a; Carey, 1958; Rautureau e.a., 1967; Makino e.a., 1969; Neale e.a., 1971). In het algemeen bereiken de concentraties niet zulke hoge waarden als bij de patiënten met cholestase. De verhouding tussen de trihydroxy en dihydroxygalzuren of de chol/chen-ratio is minder dan 1, terwijl bij toenemende leverinsufficiëntie die verhouding nog minder zal worden. Uit turnoverstudies met radio-actief gemerkte galzuren blijkt, dat de totale pool aan galzuren meestal kleiner is dan normaal. Door een veranderde verdeling bedraagt de galzuurpool in de enterohepatische circulatie slechts 50% of minder van normaal, terwijl in de algemene circulatie juist een cumulatie van galzuren ontstaat (Vlahcevic e.a., 1972). De halfwaarde tijd is verlengd en de dagelijkse synthese van galzuren is in de regel minder dan 50% van normaal (Vlahcevic e.a., 1971^a; Williams en Senior, 1971). Volgens Vlahcevic e.a. (1971^a) wordt ook bijna geen desoxycholzuur teruggevonden in gal bij patiënten met een alcoholcirrhose. De totale desoxycholzuurpool is slechts 40 mg tegenover 300 mg bij normalen. Met gevoelige methoden, zoals de gaschromatografie, kon praktisch geen desoxycholzuur in serum worden aangetoond (Roovers e.a., 1968; Carey, 1969; Vlahcevic e.a., 1971^a).

Het absolute tekort aan galzuren bij de cirrhose-patiënt is eerder een gevolg van een verminderde cholzuursynthese dan van een verminderde chenodesoxycholzuursynthese (Vlahcevic e.a., 1972). Deze bevinding suggereert dat er een aanzienlijke reductie ontstaat in de omzetting van cholesterol naar cholzuur ten gunste van de synthese van chenodesoxycholzuur bij cirrhose-patiënten. Mogelijk is een tekort aan het enzym 12 α -hydroxylase hier debet aan (Carey e.a., 1967).

Carey e.a. (1966 en 1966^a) stelden de hypothese op, dat een te royale omzetting in de darm van chenodesoxycholzuur in het potentieel toxische lithocholzuur en een te grote absorptie hiervan de leverbeschadiging bij de cirrhose zou verergeren. Zij konden bij 18 van 57 patiënten met een cirrhose gaschromatografisch in het serum een 2- tot 5-voudig verhoogde concentratie lithocholzuur aantonen. De bevinding, dat de totale lithocholzuurpool bij de cirrhosepatiënt niet significant verschilt t.o.v. normalen, strookt echter niet met deze hypothese (Vlahcevic e.a., 1972).

Bij patiënten met een cirrhose werd een duidelijk verhoogde nuchtere secretie van verdunde gal met een sterk verminderde respons op cholecystokinine gevonden (Turnberg en Grahame, 1970; Bode e.a., 1971). Ook bij cirrhosepatiënten met een galdrain werd een verhoogde galsecretie gemeten, nadat een evenwichtssituatie bereikt was (Lenthall e.a., 1970). Deze bevindingen komen overeen met die van patiënten, die een cholecystectomie ondergaan hebben en pleiten voor een dysfunctie van de galblaas bij levercirrhose (Turnberg en Grahame, 1970), maar zouden ook kunnen wijzen op een onwerkzaam worden van cholecystokinine bij levercirrhose.

Behalve de genoemde veranderingen in het galzuurpatroon zijn er geen andere gegevens bekend over het voorkomen in serum of gal van kwalitatief afwijkende galzuren bij de cirrhose. De genoemde stoornissen in het metabolisme der galzuren zijn voornamelijk terug te voeren op een stoornis in de synthese.

II.8. Therapeutische mogelijkheden bij stoornissen in het galzuurmetabolisme bij incomplete cholestase

II.8.1. Cholestyramine

Wanneer verhoogde concentraties galzuren in de lever, mede van invloed zijn op het onderhouden van de cholestase, dan zou het alleszins redelijk zijn te trachten deze concentraties te verlagen. Bij de incomplete cholestase kan men dit doel bereiken door farmaca toe te dienen die met galzuren in de darm een irreversibele binding aangaan, waardoor de absorptie in de darm verhinderd wordt. Een dergelijk middel is het niet-absorbeerbare basische anionenuitwisselende resine, cholestyramine. Het heeft quaternaire ammoniumgroepen, waaraan chloride is gebonden. Galzuren (en andere organi-

sche stoffen) worden in de darm uitgewisseld tegen chloride-ionen. Het heeft vooral toepassing gevonden bij de behandeling van de essentiële hypercholesterolemie (type II van Frederickson), aangezien de galzuursynthese het belangrijkste eindproduct is van de cholesterolstofwisseling in het lichaam (Lees en Wilson, 1971). In vivo zijn verschillende effecten van cholestyramine aangetoond:

1. Het veroorzaakt een stijging in de fecale excretie van zure steroïden (galzuren) (Carey en Williams, 1961; Moore e.a., 1968; Grundy e.a., 1971) en het heeft weinig effect op de uitscheiding van neutrale steroïden (cholesterol) (Grundy e.a., 1971).
2. Het versnelt het verlies van radio-actief gemerkt cholyltaurine en zijn metaboliëten in de gal (Garbutt en Kenney, 1972; Heaton e.a., 1971).
3. Het veroorzaakt een snelle daling van de specifieke activiteit van ^{14}C -cholesterol in het serum en tevens een daling van de cholesterolpool in het lichaam (Grundy e.a., 1971).

Eenzelfde effect ziet men bij patiënten met een onderbreking van de enterohepatische kringloop op het niveau van het terminale ileum, (bijv. na ileumresecties). Bij de intrahepatische cholestase (waarbij nog galafvloed naar de darm bestaat) ziet men een daling van de serum galzuurconcentratie, meestal gevolgd door een vermindering van de jeuk. Tevens daalt het serum bilirubinegehalte. Dit middel wordt om deze reden toegepast o.a. bij P.B.C. en partiële intrahepatische galgangatresieën (Lottsfeldt e.a., 1963; Schaffner e.a., 1965; Datta en Sherlock, 1966; Sharp e.a., 1967; Murphy e.a., 1972; Javitt e.a., 1973). Bij P.B.C. bestaat de indruk, dat dit middel effectief is tegen de jeuk van de patiënt, maar dat het geen invloed heeft op het primaire proces zelf.

Sharp e.a. (1967) daarentegen vermelden behalve een daling van de serum- en de bilirubineconcentratie ook een verbetering van de andere leverfuncties bij kinderen met intrahepatische galgangatresieën. Tevens toonden deze kinderen een duidelijke groei- en gewichtsstijging tijdens cholestyraminetherapie. Contrôle leverbiopsieën werden evenwel niet verricht. Boon (1973) heeft er echter op gewezen, dat deze verbetering ook spontaan bij de intrahepatische galgangatresie kan voorkomen.

Door Johns en Bates (1969 en 1970) is aangetoond, dat cholestyramine meer affiniteit vertoont tot aan taurine dan tot aan

glycine geconjugeerde galzuren en meer tot mono- en dihydroxygalzuren dan tot trihydroxygalzuren. In de gal van normale personen wordt dan ook tijdens cholestyraminetoediening meer cholyglycine gevonden als tevoren, terwijl het desoxycholzuur niet meer wordt teruggevonden (Dam e.a., 1971; Heaton e.a., 1971). Garbutt en Kenney (1972) toonden aan, dat toediening van 16 g cholestyramine aan gezonde personen de totale pool aan galzuren - gemeten bij nuchtere personen - niet nadelig beïnvloedde, terwijl ook geen verhoogde vetuitscheiding in de feces kon worden aangetoond.

Als hypothese kan men stellen, dat door de relatieve toename van trihydroxygalzuren de micelvorming beter gaat verlopen bij de intrahepatische cholestase. Hierdoor zou de galsecretie kunnen verbeteren en de afvoer van potentieel toxische galzuren kunnen toenemen. Meer onderzoek vooral over het effect van cholestyramine op de histologische afwijkingen in de lever, lijkt hierbij van belang.

Gewaarschuwd moet worden tegen een ongecontroleerd gebruik van cholestyramine. Talrijke andere organische stoffen en geneesmiddelen blijken ook door cholestyramine irreversibel te worden gebonden. Doordat de vetoplosbare vitaminen niet goed meer geresorbeerd worden, kan osteomalacie ontstaan. Substitutie van vetoplosbare vitaminen moet bij hoge doses cholestyramine ernstig overwogen worden. Tevens kan tijdens cholestyraminetherapie de resorptie en het transport van lipiden gestoord worden. In dat geval verdient het aanbeveling om een vetarmdieet voor te schrijven of de voedingsvetten voor een deel te vervangen door "medium chain" triglyceriden.

Behalve cholestyramine worden ook lignine en neomycine toegepast als "bile salt sequestering agents". Over de effecten van deze middelen bij de cholestase is nog weinig bekend. Zij lijken minder effectief dan cholestyramine (Heaton, 1972).

II.8.2. Barbituraten

Fenobarbital induceert een betere werking van microsomale hydroxyleringsenzymen in de lever en van het voor de galzuursynthese belangrijke cholesterol-7 α -hydroxylase. Wanneer het in een dosering van 5 mg/kg/dag aan mensen en proefdieren wordt gegeven, ontstaat er een duidelijke hypertrofie van het endoplasmatisch

reticulum (Orrenius e.a., 1965). Tevens ontstaat een versnelde synthese van galzuren en een toename van de galsecretie met 30 à 50%.

Redinger en Small (1973) toonden in experimenten met Rhesus- apen aan, dat de verhoogde galsecretie aan een tweetal factoren kon worden toegeschreven:

1. De van galzuren onafhankelijke galfractie nam toe onder invloed van fenobarbital.
2. Ook de secretie van galzuren en fosfolipiden in de gal nam toe, terwijl de cholesterolsecretie ongeveer gelijk bleef.

Fenobarbital kan dus de maximale synthesesnelheid van galzuren verhogen of anders gezegd de drempel van de kritisch remmende concentratie in de levercel verhogen.

De waarneming dat onder invloed van fenobarbital een verhoogde galzuur- en fosfolipidensecretie, maar geen verhoogde cholesterolsecretie ontstaat, heeft tot de suggestie geleid dat dit middel ook therapeutische toepassing zou kunnen vinden bij het oplossen van galstenen.

Met fenobarbital verkrijgt men ook een daling van het serum bilirubinegehalte en van de totale galzuurconcentratie bij patiënten met een intrahepatische, niet volledige, obstructie door galgangatresie (Sharp en Mirkin, 1972; Stiehl en Admirand, 1972) en bij patiënten met P.B.C. en benigne intermitterende cholestase (Admirand en Bauer, 1971; Earnest, 1972; Stiehl en Admirand, 1972). Het bewerkstelligt bij deze patiënten een vermindering van de jeuk en tegelijkertijd neemt ook de uitscheiding in de feces van ¹³¹J-Bengaalrood en van galzuren sterk toe. Earnest (1972) meent, dat bij zijn patiënten met P.B.C. onder invloed van fenobarbital een toename van de galsecretie ontstaat, waardoor een herverdeling van galzuren in het lichaam over de verschillende compartimenten plaatsvindt. Zo gaan weer meer galzuren in de enterohepatische kringloop en minder in de algemene circulatie circuleren.

Concluderend kan men zeggen, dat fenobarbital waarschijnlijk door inductie van de intracellulaire hydroxyleringsreacties de omzetting van cholesterol in galzuren stimuleert. Hierdoor wordt een betere oplosbaarheid door de vorming van micellen in de gal bewerkt, waardoor de galsecretie zich tot op zekere hoogte kan

herstellen. Dat hierdoor ook tevens potentieel toxische galzuren mee worden uitgescheiden, is niet uitgesloten.

Meer kennis over de werking van fenobarbital in relatie tot het gestoorde galzuurmetabolisme bij de intrahepatische cholestase is vereist, voordat tot behandeling op grote schaal met dit middel kan worden geadviseerd. Het sederende effect van de hoge doses, die men meestal moet gebruiken, is in ieder geval een ongunstige bijwerking.

Methoden van onderzoek en patiënten

III.1. Gang van zaken bij het onderzoek

Bij de nuchtere patiënt werd 's ochtends voldoende bloed afgenomen om hieruit \pm 20 ml serum te verkrijgen. Hiervan werd direct \pm 10 ml tot -20°C ingevroren voor galzuurbepalingen. Uit de resterende hoeveelheid serum werden bilirubine, alkalische fosfatase, 5'-nucleotidase, sgot, sgpt, cholesterol en het eiwitspectrum bepaald. Deze bepalingen werden verricht in het klinisch chemisch laboratorium van het Gemeente Ziekenhuis (Hoofd: Dr. E.D.A. Sindram).

Bij alle patiënten werd het serum nuchter afgenomen, aangezien de galzuurconcentratie in perifeer bloed onder fysiologische omstandigheden een $\frac{1}{2}$ tot 1 uur na de maaltijd een tot tweemaal boven de normaalwaarde kan stijgen (Carey, 1969; Kaplowitz e.a., 1973^a).

Het grootste deel van de bij het onderzoek betrokken personen verbleef al enige tijd in het ziekenhuis en was ingesteld op een standaarddieet van \pm 2200 cal., bestaande uit: ongeveer 85 gram vet, 284 gram koolhydraten en 70 gram eiwitten.

Bij patiënten die geneesmiddelen innamen, werd het gebruik hiervan 12 tot 24 uur vóór het afnemen van het bloed gestaakt om een mogelijke verontreiniging op het chromatogram zoveel mogelijk te voorkomen.

Met de gaschromatografische methode zijn galzuren kwantitatief in gal het gemakkelijkste te bepalen, omdat zij hierin in hoge concentratie voorkomen, en enige extractieprocedures achterwege gelaten kunnen worden (Klaassen, 1971).

Duodenuminhoud is echter niet zo eenvoudig te verkrijgen, terwijl de samenstelling mede afhankelijk is van bijmenging met maag- en pancreassap. Om deze bijmenging zoveel mogelijk te voorkomen werden de galmonsters onder gestandariseerde omstandigheden afgenomen. Er werd gebruik gemaakt van een sonde volgens Dreiling met dubbel lumen (Davol inc. Providence, Rhode Island).

Onder doorlichting werd gecontroleerd of het einde van de

sonde in het distale deel van het duodenum lag, net iets vóór het ligament van Treitz. Tegelijk met het opzuigen van duodenuminhoud werd via het andere lumen maaginhoud opgezogen door intermitterende zuigdrainage.

Als voorbereiding voor de duodenumsondage werd de patiënt vanaf de vorige dag 17.30 uur nuchter gehouden. Tussen 8.00 en 9.00 uur werden de sondages verricht. Met behulp van de duodenumsonde is het mogelijk om galmonsters van verschillende herkomst te verkrijgen (Einhorn, 1927).

A-gal: lichtgeel van kleur, is een mengsel van gal, die rechtstreeks uit de lever stroomt met pancreas- en duodenumsecret, B-gal: is de geconcentreerde gal, welke de galblaas na contractie in het duodenum uitstort. Galblaascontracties werden opgewekt door intraveneuze toediening van cholecystokinine (Cecekin^R, Vitrum). 5 Minuten na het langzaam injiceren van 50 Ivy dog units, opgelost in 20 ml fysiologisch zout, werd bij een goede galblaasfunctie donkerbruine, heldere gal verkregen. Behalve een passagère verhoogde darmperistaltiek deden zich na toediening van cholecystokinine geen bijverschijnselen voor. Gedurende \pm 10 minuten werd B-gal verzameld.

De B-galmonsters werden in buisjes opgevangen die in een ijsbad waren geplaatst. Binnen 30 minuten werden zij ingevroren tot $- 20^{\circ}\text{C}$.

C-gal: Nadat de galblaas zich geledigd heeft, wordt de gal na verloop van tijd weer geel van kleur. Ook deze vloeistof is een mengsel van rechtstreeks uit de lever afkomstige gal en van pancreas- en duodenumsecret.

Indien geen medische indicatie voor de duodenumsondage bestond, werd de patiënt of proefpersoon om medewerking verzocht. Alle patiënten, die gesondeerd werden, waren tevoren röntgenologisch op de aanwezigheid van oesophagus- of maagvarices nagezien. In twijfelgevallen werd steeds endoscopie van maag en oesophagus verricht. Waren varices aantoonbaar, dan werd geen duodenumsondage verricht.

Bij een aantal patiënten werd ook de 24-uurs urine verzameld van 7.00 uur 's morgens tot de volgende ochtend 7.00 uur, voor bepaling van galzuren.

III.2. Beschrijving van de isolatie en de kwantitatieve bepaling van galzuren met de gaschromatograaf in serum, gal en urine

III.2.1. Inleiding:

Galzuren, in vrije of aan glycine of taurine gebonden vorm, kunnen geëxtraheerd worden uit serum, gal, dunne darminhoud, feces, urine en uit homogenaten van leverweefsel. Een groot aantal methoden voor extractie en kwantitatieve meting van galzuren uit de verschillende lichaamsvloeistoffen zijn heden beschikbaar.

Veel van deze methoden hebben min of meer ernstige nadelen voor wat betreft hun specificiteit en nauwkeurigheid. Voor een uitvoerige beschrijving van bepalingsmethoden van galzuren zij verwezen naar overzichtsartikelen van Haslewood (1967), Eneroth (1969), Sjövall (1964 en 1969), Kuksis (1969) Hofmann e.a. (1970), Eneroth en Sjövall (1971) en Heaton (1972). Deze artikelen bestrijken een groot aantal verschillende isolatiemethoden en kwantitatieve bepalingstechnieken, waarbij vooral de dunne laag chromatografie en de gaschromatografie, eventueel aangevuld met massaspectrometrie, wanneer het gaat om de identificatie van zeldzaam voorkomende galzuren, benadrukt worden.

Van den Heuvel e.a., (1960) beschreven als eersten een gaschromatografische toepassing voor de bepaling van galzuren. Sandberg en medewerkers (1965) gebruikten als eersten deze methodiek voor de bepaling van galzuren in serum. De methode is voldoende betrouwbaar voor een kwantitatieve meting van galzuren in serum, gal en urine, en tevens voldoende gevoelig om kleine hoeveelheden monohydroxygalzuren op te sporen (Kuksis, 1969).

Voor de extractie en zuivering van galzuren uit serum werd uitgegaan van de methode, zoals beschreven door Roovers, Evrard en Vanderhaeghe (1968). Voor die uit gal werd gebruik gemaakt van een methode, die in principe lijkt op die van Klaassen (1971). Voor de isolatie van galzuren uit urine werd eerst een zuivering met behulp van Amberlite-XAD₂ gedaan (Makino en Sjövall, 1972), waarna een solvolyses stap werd ingelast (Palmer, 1967).

Bij alle methoden werd gebruik gemaakt van een enzymatische hydrolyse van de amide-binding tussen glycine of taurine en de galzuren. Hierdoor ontstaan vrije galzuren, welke na omzetting in

geschikte derivaten op de gaschromatograaf geanalyseerd kunnen worden.

Na bereiding van methylesterderivaten van galzuren werd geen extra zuiveringsprocedure met een neutrale aluminiumoxydekolom ingelast, zoals beschreven is door Sandberg e.a. (1965), omdat hiermee een aanzienlijke hoeveelheid monohydroxygalzuren verloren kon gaan (Roovers e.a., 1968; Ali en Javitt, 1970). Makino en Sjövall (1972) beschreven recent een extractiemethode met behulp van een Amberlite-XAD₂-kolom, die dit nadeel niet zou bezitten. Kleine onzuiverheden, in de vorm van niet met bekende galzuren interfererende piekjes, waren soms in de chromatogrammen aanwezig. Dit veroorzaakte echter zelfs bij bepalingen in serum zelden problemen.

Voor de bepaling op de gaschromatograaf werden T.F.A.-methylesterderivaten van galzuren gebruikt, aangezien deze een betere scheiding lieten zien op de gebruikte kolom met 1%-ige OV-210 als stationaire fase (Kuksis, 1969). Er werd een lineaire correlatie tussen de toegediende hoeveelheid en de piekhoogte respons van de gaschromatograaf gevonden. Dit is niet het geval, wanneer acetaatderivaten worden gebruikt (Roovers e.a., 1968).

Een nadeel van de door ons toegepaste methode is, dat het percentage geconjugeerde galzuren niet direct te meten is. Indirect kan men de fractie geconjugeerde galzuren van de niet geconjugeerde fractie scheiden door de bepaling met hetzelfde monster te herhalen en hierbij de hydrolysestap over te slaan (Makino e.a., 1969). Gezien de bewerkelijkheid van de methode en het feit, dat in de vraagstelling van dit onderzoek een onderscheid tussen de geconjugeerde fractie en de niet-geconjugeerde fractie niet aan de orde was, werd hiervan afgezien.

Onderscheid tussen de aan taurine en aan glycine geconjugeerde galzuren is alleen mogelijk door het inlassen van een scheidingsprocedure met behulp van dunne laagchromatografie. Wanneer er geen malabsorptie van galzuren in de dunne darm bestaat, is het onderscheid tussen deze twee fracties echter van weinig waarde bij patiënten met leverziekten (Sjövall, 1960; Carey, 1969; Paumgartner en Grabner, 1970; Neale e.a., 1971).

Mono- of disulfaatveresterde galzuren, welke bij patiënten met cholestase in een gering percentage in het serum (< 5%) kunnen voorkomen, werden niet meebepaald in serum, aangezien ze tijdens de

enzymatische hydrolyse niet gedeconjugeed worden (Makino e.a., 1972). Vrije hydroxylgroepen aan de steroidkern vormen immers een noodzakelijke voorwaarde voor een goede werking van het enzym (Nair, 1969).

Palmer (1967) en Makino en Sjövall (1972) hebben methoden uitgewerkt om de sulfaatveresterde fractie van de overige galzuren gescheiden te bepalen. Bij een aantal bepalingen van galmonsters van patiënten met cholestase werden duplo-bepalingen met een solvolysestap verricht om in ieder geval de sulfaatveresterde fractie mee te bepalen, indien deze aanwezig was. Dit werd gedaan, omdat het bij patiënten met cholestase niet uitgesloten is, dat vooral monohydroxygalzuren in sulfaatveresterde vorm in de gal worden uitgescheiden (§ II.6).

III.2.2. Chemicaliën

Alle benodigde reagentia waren van de hoogste zuiverheidsgraad (E. Merck A.G., Darmstadt).

Amberlite-XAD₂ (Rohm and Haas Comp. Philadelphia) werd voor gebruik gewassen met 8 tot 10 volumina van achtereenvolgens water, methanol, aceton en water. Het gezuiverde absorbens werd in water bewaard.

Het enzym N-cholylglycinehydrolase (EC 3.5) (Schwartz-Mann Research Labs, New York) werd gebruikt om de geconjugeerde galzuren te hydrolyseren. Het enzym zou geen oxydatieve eigenschappen meer bevatten, welke Clostridium Perfringens-stammen, waaruit het enzym ontwikkeld is, kunnen hebben (Nair, 1967).

Lithocholzuur, chenodesoxycholzuur, natriumdesoxycholyltaurine en het natriumchenodesoxycholyltaurine werden verkregen van Sigma Chemicals Cy (St. Louis), natriumdesoxycholzuur van E. Merck A.G., cholzuur, natriumlithocholyltaurine, natriumcholyltaurine, natriumlithocholylglycine, natriumdesoxycholylglycine, natriumchenodesoxycholylglycine en het natriumcholylglycine werden verkregen van Calbiochem (Los Angeles). 3 β -monohydroxy- Δ 5-choleenzuur, 7-keto-3 α -monohydroxy-5 β -cholaanzuur (7-ketolithocholzuur) en 7-keto-3 α , 12 α -dihydroxycholaanzuur (7-ketodesoxycholzuur) werden verkregen van Steraloids Inc. (Pawling, New York).

De bovenvermelde galzuren werden gebruikt als standaardgal-

zuren. Zij bleken, ook na controle met behulp van dunne laag chromatografie (Gregg, 1966) voldoende zuiver (meer dan 98%).

N-methyl-N-nitroso-p-tolueensulfonamide (Diazaald) voor de bereiding van diazomethaan werd verkregen van Aldrich Chem. Co. Inc. (Milwaukee).

Voor de bereiding van trifluoracetaatderivaten werd trifluorazijnzuuranhydride van E. Merck A.G. gebruikt.

1% OV-210, op Gaschrom Q, en G49A (Packard-Becker, Delft) werden als stationaire fasen gebruikt.

III.2.3. Isolatie van galzuren

2.3.1. Uit serum

Aan 5 ml serum werd 5 ml 0,2 M acetaatbuffer (pH 5,6) toegevoegd. In de buffer waren tevens aanwezig EDTA en β -mercaptoethanol (van beiden 10-20 μ mol) om de enzymatische hydrolyse te activeren (Nair, 1969).

Om de voor een optimale enzymactiviteit noodzakelijke pH van 5,6 te bereiken, werden circa 3 druppels 1 M HCl bijgepipetteerd. Bij deze pH werd N-cholyglycinehydrolase in overmaat toegevoegd (0,1 tot 0,2 ml met een specifieke activiteit van \pm 12.000 Nair Units) (Nair, 1965 en 1967).

Het mengsel werd gedurende 3 uur geïncubeerd bij 37°C om de aanwezige geconjugeerde galzuren te hydrolyseren. Na drie uur incuberen bleek in ieder geval een maximale hydrolyse bereikt te zijn. Hierna werd 60 ml absolute ethanol toegevoegd en werd het mengsel gedurende één à twee min. in een kokend waterbad verwarmd om de aanwezige eiwitten te denatureren. Dit mengsel bleef gedurende een nacht in de koelkast bij 4°C staan. Daarna werd het gecentrifugeerd en gefiltreerd, waarna het residu nog enige keren met 96%-ige ethanol werd uitgewassen.

Het filtraat werd drooggedampt met behulp van een filmverdamer (Rotavapor) en daarna opgelost in 5 ml van een mengsel toluen-isopropanol-methanol-30% waterige NaOH (10 : 20 : 20 : 6) (Roovers e.a., 1968). Vervolgens werd 1 ml water toegevoegd, waarna het mengsel 4 keer met 5 ml petroleumether (K.P. 40°- 60°) werd uitgeschud om de neutrale steroïden in de bovenlaag, met name cho-

lesterol te verwijderen.

Na scheiding van de twee lagen werd de onderlaag aangezuurd met 6 M HCl (tot pH 1) en 4 keer geëxtraheerd met diethylether (onder zeer krachtig schudden!) waarbij de vrije galzuren in de etherlaag overgingen. De petroleumetherlaag werd nog 2 keer gewassen met water. De waterlagen werden aangezuurd en nog een keer uitgeschud met diethylether. Dit laatste bleek noodzakelijk, daar in deze laag soms nog galzuren aanwezig waren. De etherlaag werd 2 keer met water gewassen (tot zuurvrij) en daarna drooggedampt onder een stikstofstroom.

2.3.2. Uit gal

Een aantal stappen werden achterwege gelaten, omdat galzuren in overmaat in gal voorkomen.

Bij 0,1 ml gal werd 2,5 ml 0,1 M acetaatbuffer (pH 5,6) gevoegd. Vervolgens werd het monster gedurende 3 uur bij 37°C geïncubeerd met 0,1-0,2 ml enzym. Nadat het mengsel tot kamertemperatuur afgekoeld was, werd 5 ml water en ca 0,3 ml 6 M HCl toegevoegd. Nu werd het mengsel 4 keer uitgeschud met 10 ml diethylether. De gezamenlijke etherlagen werden drooggedampt onder een stikstofstroom.

Van een aantal galmonsters werd behalve de hierboven beschreven isolatieprocedure ook een tweede bepaling gedaan met een solvolyse vóór de enzymatische hydrolyse. Dit ging als volgt: aan 0,1 ml gal werd 1 ml ethanol, ca 0,1 ml 6M HCl en 9 ml aceton toegevoegd. Dit mengsel werd gedurende 2 à 3 dagen bij kamertemperatuur bewaard en daarna drooggedampt in een exsiccator. Het residu werd opgelost in 5% KOH in methanol en gedurende 2 uur gekookt onder refluxen. Na afkoelen werd de oplossing geneutraliseerd met Dowex 50 W - X 4, gefiltreerd en met methanol gewassen en daarna drooggedampt. Hiermede werd de solvolyse als voltooid beschouwd (Burstein en Lieberman, 1958; Palmer, 1967). Vervolgens werd het residu opgelost in 5 ml water en 5 ml 0,2 M acetaatbuffer (pH 5,6) en volgde incubatie met 0,1 ml enzym gedurende 3 uur bij 37°C. De diethylether extractie werd weer uitgevoerd als hierboven beschreven.

2.3.3. Uit urine

Galzuren werden uit urine geëxtraheerd met behulp van Amber-

lite-XAD₂ (Makino en Sjövall, 1972). Hiertoe werd ± 1 g Amberlite-XAD₂ toegevoegd aan 5 ml van de verzamelde 24 uurs urine. De oplossing werd hierna gedurende een uur geschud en vervolgens gewassen met water. De galzuren werden uit de Amberlite geëxtraheerd met methanol. Na droogdampen volgde solvolyse, zoals beschreven voor gal. Ieder urinemonster werd met en zonder solvolyse bewerkt om de fractie gesulfateerde galzuren gescheiden te kunnen bepalen.

Het residu, dat na solvolyse overbleef werd opgelost in 5 ml water. De enzymatische hydrolyse en de diethyletherextractie werden uitgevoerd, zoals beschreven voor serum en gal.

III.2.4. Bereiding van derivaten van galzuren voor gaschromatografische bepaling

Methylesterderivaten van geïsoleerde galzuren werden als volgt bereid (Vink, 1970): 4,28 g Diazald (N-methyl-N-nitroso-p-tolueensulfonamide), opgelost in 20 ml ether, werd in een scheitrechter gebracht. In een hieronder geplaatste erlenmeijer bevond zich een mengsel van 7 ml carbitol, 7 ml ether en 10 ml 60% KOH-oplossing. Het te bepalen monster werd opgelost in 10 ml van 10%-ige methanol in ether in een penicillineflesje. 100 μ g van de interne standaard werd hieraan toegevoegd. Als interne standaard werden gebruikt 7-ketolithocholzuur of 7-ketodesoxycholzuur. Het penicillineflesje werd in de uitlaatbuis van de erlenmeijer geplaatst en met ether verzadigde stikstof werd nu door de erlenmeijer geleid (circa 6 ml/min), terwijl de Diazald-oplossing langzaam in de erlenmeijer gedruppeld werd. Hierbij komt diazomethaan vrij dat met de stikstofstroom in het penicillineflesje terecht komt. De methylestervorming kan als volledig beschouwd worden als de monsteroplossing, op een witte achtergrond, lichtgeel gekleurd is (± 10 min). De overmaat diazomethaan werd weggenomen met een druppel van 10%-ige azijnzuur in ether. Het mengsel van de methylesterderivaten van galzuren werd drooggedampt onder een stikstofstroom.

Vervolgens werden galzure trifluoracetaat (T.F.A.)-derivaten gemaakt om een goede scheiding van de verschillende fracties galzuren op de gaschromatograaf te verkrijgen (Kuksis, 1969). Hiertoe werd 0,2 ml trifluorazijnzuuranhydride toegevoegd en de goed afgesloten buizen werden gedurende 15 min geïncubeerd bij 37°C. Het

mengsel werd vervolgens drooggedampt onder een stikstofstroom en opgelost in 0,2 ml aceton.

Een samenvatting van de isolatie en derivaatvormingsprocedure van galzuren in serum wordt gegeven in Tabel III.1.

TABLE III.1. Summary of the analysis procedure of bile acids in serum.

-
1. Conjugated and unconjugated bile acids in serum.
 2. Enzymatic hydrolysis of conjugated bile acids with N-cholyglycine hydrolase.
 3. Protein precipitation with ethanol at 100 ° C.
 4. Purification (mainly of neutral lipids and cholesterol) with toluene-isopropanol-methanol-30% NaOH (10 : 20 : 20 : 6) according to Roovers et al (1968) and extraction with petroleum ether.
 5. Extraction of bile acids from acidified water layer using diethyl ether.
 6. Preparation of bile acid methylesters using diazomethane.
 7. Preparation of trifluoroacetate methylester derivatives of bile acids.
 8. After dissolution of the derivatives in acetone, injection into a Packard-Becker 420 gas chromatograph, equipped with a column packed with 1% OV-210 as stationary phase.
-

III.2.5. Gaschromatografische bepaling

De galzure T.F.A.-methylesterderivaten werden gescheiden in een Becker 420 gaschromatograaf met U-vormige glazen kolommen van 100 cm lengte en 4 mm diameter, gevuld met 1% OV-210 op Gaschrom Q (100-120 mesh).

De detectie geschiedde met een vlamionisatiedetector. De temperatuur van het injectiepunt was 235°C, de kolomtemperatuur was 230°C en de detector was ingesteld op 240°C. Stikstofgas werd gebruikt als draaggas, de snelheid van de stroom werd constant op 60 ml/min gehouden. Voor de gaschromatografische bepaling in serum, gal en urine werd 2 µl van de acetonoplossing genomen.

III.2.6. Bereiding van standaardoplossingen van galzuren

Voor de bepaling van galzuren in serum en urine werden de volgende standaardoplossingen bereid. Een mengsel van telkens precies afgewogen hoeveelheden (\pm 0,50 mg) natriumcholyltaurine, natriumchenodesoxycholyltaurine, natriumdesoxycholyltaurine en na-

triumlithocholylyltaurine werd toegevoegd aan 5 ml serum van een nuchtere proefpersoon. Na het doorlopen van de hele procedure werden de T.F.A.-methylesterderivaten van deze galzuren opgelost in 2 ml aceton en hiervan werd $2 \mu\text{l}$ gebruikt voor gaschromatografische bepaling. Op dezelfde wijze werd een standaardoplossing van aan glycine geconjugeerde galzuren, toegevoegd aan normaal serum, bereid.

Dezelfde procedure werd gevolgd voor het doen van recovery-studies, waarbij een standaardoplossing van aan taurine geconjugeerde galzuren aan urine, gal en water werd toegevoegd.

Bij het berekenen van de concentratie galzuren in gal werd gebruik gemaakt van een standaardoplossing van aan taurine geconjugeerde galzuren, toegevoegd aan 5 ml water.

Ook standaardmengsels van de ongeconjugeerde zuren cholzuur, chenodesoxycholzuur, desoxycholzuur en lithocholzuur werden bereid. Vanwege hun onoplosbaarheid in water werden zij eerst opgelost in methanol ($100 \mu\text{g/ml}$).

III.2.7. Berekeningsprocedure

Aangezien de toegevoegde hoeveelheid interne standaard per monster steeds dezelfde was, kon de hoeveelheid van een galzuur berekend worden met behulp van de volgende formule:

$$MX = \frac{PX}{P_{\text{ref.}\chi}} \times \frac{P_{\text{int. stand. ref.}}}{P_{\text{int. stand.}\chi}} \times M_{\text{ref.}\chi}$$

MX = De te berekenen hoeveelheid van het galzuur χ in het serummonster.

PX = Piekhoogte van het te berekenen galzuur.

$P_{\text{ref.}\chi}$ = Piekhoogte van het referentiegalszuur χ in een standaardoplossing van tauroconjugaten toegevoegd aan normaal serum.

$P_{\text{int. stand. ref.}}$ = Piekhoogte van de interne standaard in een standaardoplossing tauroconjugaten aan normaal serum.

$P_{\text{int. stand.}\chi}$ = Piekhoogte van de interne standaard in het te bepalen monster.

$M_{\text{ref.}\chi}$ = De hoeveelheid van referentie galzuur χ , dat als tauroconjugaat toegevoegd werd aan normaal serum.

De interne standaard 7-ketolithocholzuur of 7-ketodesoxycholzuur werd gebruikt als correctiefactor, waarbij zowel in het te bepalen monster als in de standaardoplossing de recovery van deze interne standaard gecorrigeerd werd naar de te verwachten piekhoogte. De corresponderende pieken op het chromatogram van de standaardoplossing van tauroconjugaten toegevoegd aan serum komen overeen met bekende hoeveelheden van resp. cholzuur, chenodesoxycholzuur, desoxycholzuur, lithocholzuur en de interne standaard.

Hoewel het onder bepaalde omstandigheden mogelijk is de hoeveelheden galzuren uit een ijkcurve te berekenen, wordt door het toepassen van de genoemde formule rekening gehouden met mogelijke fluctuaties van de respons van de verschillende galzuren ten gevolge van 1: specifieke verliezen tijdens de bereiding van derivaten, 2: specifieke verliezen tijdens de gaschromatografische procedure en 3: of beiden. Daarom doen de piekhoogte-verhoudingen van de standaardoplossing van tauroconjugaten, toegevoegd aan normaal serum, ook dienst als een soort correctiefactor, wanneer men de genoemde formule hanteert. Een voorwaarde voor deze toepassing is natuurlijk dat de genoemde standaard-oplossing op dezelfde kolom bijna tegelijkertijd met het te bepalen monster moet meelopen.

De concentratie galzuren in serum werd berekend in μg per ml, in gal in mg per ml, en die in urine in $\text{mg}/24$ uur.

III.2.8. Toetsing van de bepalingmethode

2.8.1. Specificiteit van de bepaling

Met de gebruikte gaschromatografische methode werd een redelijke scheiding verkregen van een standaardmengsel T.F.A.-methylesterderivaten van lithocholzuur, desoxycholzuur, chenodesoxycholzuur, cholzuur en de interne standaard 7-ketolithocholzuur of 7-ketodesoxycholzuur, in die zin, dat er geen overlapping tussen de verschillende componenten aanwezig was (Fig. III.1.a). De analyse-tijd op de gaschromatograaf was ca 35 min.

Met 7-ketolithocholzuur (Klaassen, 1971) als interne standaard werd bij bepalingen in gal niet altijd een redelijke scheiding verkregen. Bij aanwezigheid van grote hoeveelheden cholzuur trad soms een hinderlijke overlapping met 7-ketolithocholzuur op. Daarom

werd overgegaan op 7-ketodesoxycholzuur als interne standaard, dat wel volledig van cholzuur gescheiden wordt op het chromatogram. De relatieve retentietijden (desoxycholzuur = 1,0) zijn vermeld in Tabel III.2.

TABLE III.2.

The relative retention times of trifluoroacetate methylester derivatives of bile acids on 1% OV-210 (desoxycholic acid = 1.0 = 8 min and 30 sec).

Lithocholic acid	0.65
Deoxycholic acid	1.00
Chenodeoxycholic acid	1.36
Cholic acid	2.13
7-ketolithocholic acid	2.42
7-ketodesoxycholic acid	3.21

Bij patiënten, die een cholecystectomie ondergaan hebben, is het mogelijk, dat door een intensievere kringloop van de galzuren een toename van de bacteriële degradatie van primaire galzuren ontstaat. Het gevolg hiervan is een geringe kans op vorming van ketogalzuren, afgeleid van de primaire galzuren cholzuur en chenodesoxycholzuur. Deze ketogalzuren zouden in de enterohepatische kringloop van galzuren kunnen worden opgenomen (Hepner e.a., 1973; Malagelada e.a., 1973). Het zou daarom van belang kunnen zijn om bij bepalingen in gal van patiënten, die een cholecystectomie ondergingen, een monster, waaraan de interne standaard niet is toegevoegd, mee te laten lopen. Dit kan men doen, wanneer toevallig een onevenredig hoge piek van de interne standaard op het chromatogram wordt gevonden. Dit werd door ons echter nooit gezien.

De zuivering van de monsters voor wat het cholesterol betreft was niet compleet. Dit bleek, omdat soms een cholesterolpiek in het chromatogram aanwezig was (Fig. III.1). Dit was vooral bij de bepaling in serum merkbaar, omdat hierin nu eenmaal relatief een overmaat cholesterol aanwezig is. In gal is de situatie anders, aangezien daarin galzuren in overmaat aanwezig zijn, zodat bij bepalingen in gal van een cholesterolpiek nooit hinder werd gevonden. Bij bepalingen in urine werd nooit een cholesterolpiek waargenomen.

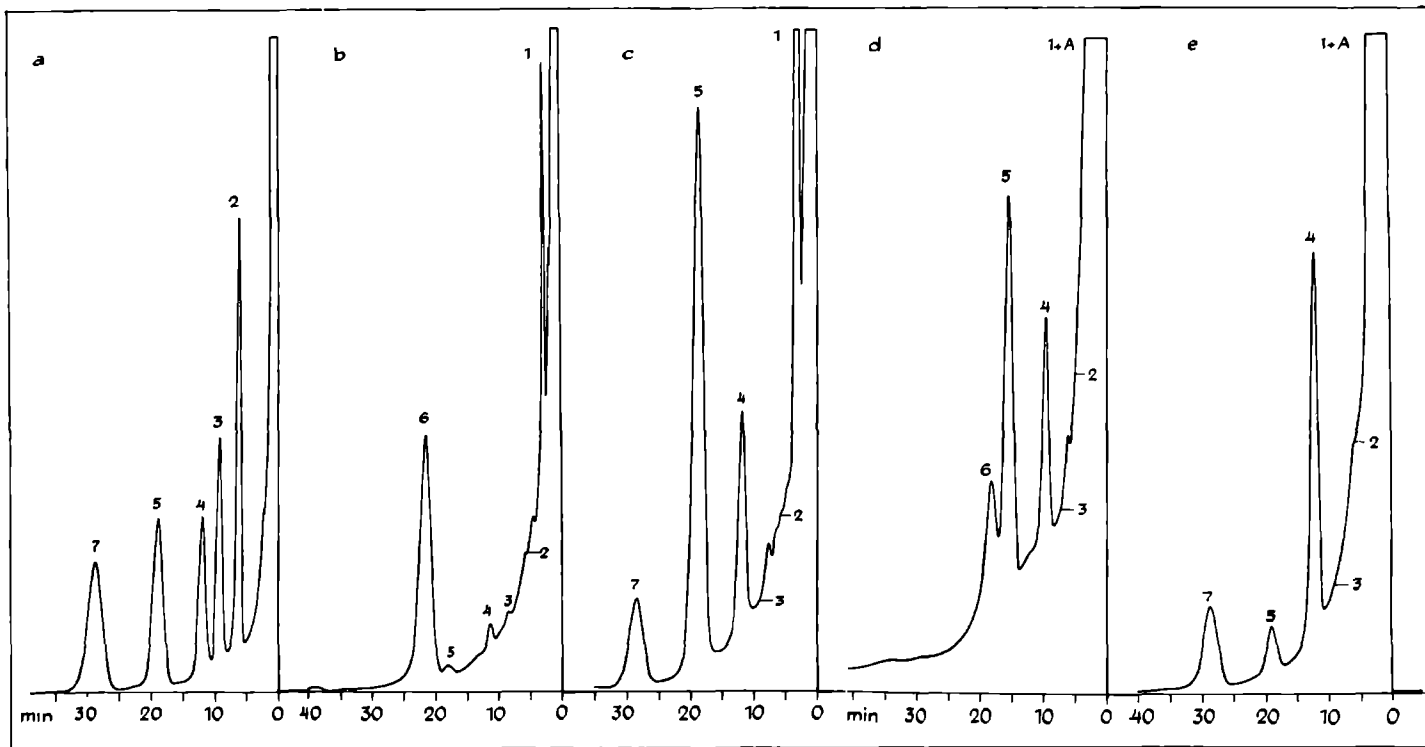


Fig. III.1. Gas chromatographic separation of T.F.A. methylester derivatives of:

- a. reference bile acids (in water).
- b. bile acids in serum of fasting normal subject.
- c. bile acids in serum of a patient with complete extrahepatic obstruction.
- d. bile acids in serum of a patient with primary biliary cirrhosis, stage II.
- e. bile acids in serum of a patient with cirrhosis of the liver.

Acetone(A), cholesterol(1), lithocholic acid(2), deoxycholic acid(3), chenodeoxycholic acid(4), cholic acid(5). 7-ketolithocholic acid(6) or 7-ketodeoxycholic acid(7) were used as Internal Standards.

Soms werden ook kleine piekjes, die niet met retentietijden van bekende galzuren overeenkwamen, aangetroffen. Er werd geen verdere poging gedaan deze te identificeren. Met 1% OV-210 als stationaire fase kon geen goede scheiding tussen de twee monohydroxygalzuren, lithocholzuur en 3β -monohydroxy- Δ^5 -choleenzuur verkregen worden. Aangezien deze scheiding voor de vraagstelling van het onderzoek toch belangrijk kon zijn, werd naar een andere stationaire fase gezocht, die wel een goede scheiding tussen de genoemde componenten zou kunnen geven. Met een G49A-kolom werd wel een goede scheiding tussen de methylesters van beide galzuren verkregen (Fig. III.2). De overige galzuren hadden langere retentietijden.

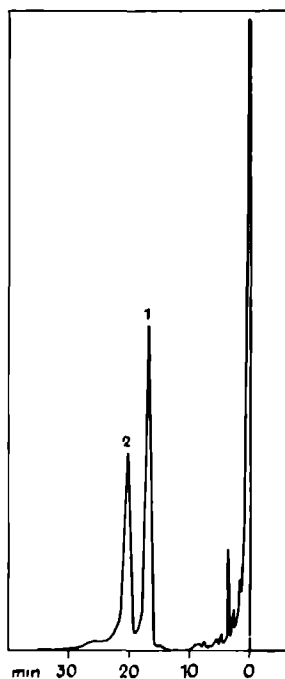


Fig III 2. Gas chromatographic separation of methylester derivatives of reference lithocholic acid(1) and 3β -OH- Δ^5 -choleonic acid(2) in water on G49A as stationay phase

Voor het verkrijgen van een indruk van de bepaling van galzuren in serum worden voorbeelden gegeven van chromatogrammen van resp., serum van een normale proefpersoon (Fig. III.1.b), serum van een patiënt met een actieve levercirrhose (Fig. III.1.e), serum van een patiënt met een complete extrahepatische obstructie (Fig. III.1.c), serum van een patiënt met een primaire biliaire cirrhose, stadium II (Fig. III.1.d) en serum van een proefpersoon vóór en één uur na ontbijt (Fig. III.3).

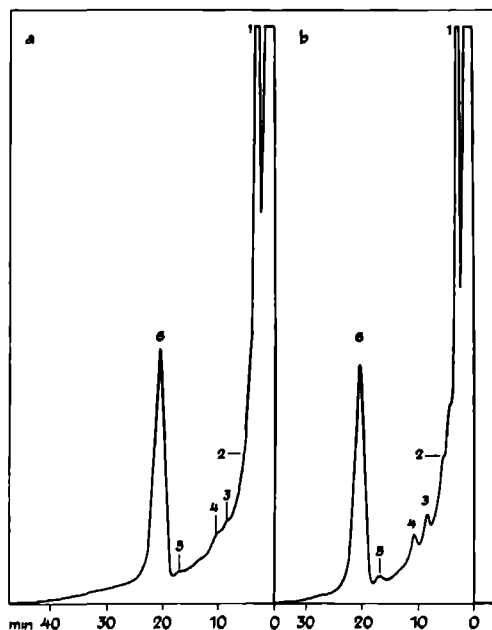


Fig III 3 Gas chromatographic separation of T F A methylester derivatives of bile acids in serum of a normal control subject a fasting serum b 1 h after lunch cholesterol (1), lithocholic acid(2), deoxycholic acid(3), chenodeoxycholic acid(4), cholic acid(5) and 7-ketolithocholic acid(6) as Internal standard
The increase in peak heights of the different bile acids after lunch is distinct

2.8.2. Recovery van standaardoplossing van galzuren

Standaardoplossingen van aen taurine of glycine geconjugeerde galzuren in water, serum, gal en urine doorliepen de hele bepalingprocedure. Wanneer werd uitgegaan van één oplossing van geconjugeerde of ongeconjugeerde galzuren, die in één serie 8 keer geanalyseerd werd, dan bleken de recoverypercentages der verschillende galzuren in serum en water niet significant te verschillen (Tabel III.3).

TABLE III.3.

Recoveries of reference bile acids, added in known amounts to serum (A, D and F) water (B and E) and bile (C) and estimated in an 8-fold analysis carried out simultaneously.

	Sodium cholytaurine	Sodium chenodeoxycholytaurine	Sodium deoxycholytaurine	Sodium lithocholytaurine
A. Serum mean recovery (%)	84.8	93.1	96.3	86.7
S.D. (%)	0.5	0.8	0.9	1.1
B. Water mean recovery (%)	87.5	93.9	98.2	90.6
S.D. (%)	0.4	1.4	1.6	1.0
C. Bile mean recovery (%)	89.2	92.2	98.5	81.0
S.D. (%)	0.8	0.5	0.7	1.0
	Sodium cholyglycine	Sodium chenodeoxycholyglycine	Sodium deoxycholyglycine	Sodium lithocholyglycine
D. Serum mean recovery (%)	94.8	92.0	90.5	89.6
S.D. (%)	1.6	1.5	0.8	2.6
E. Water mean recovery (%)	97.2	89.5	93.0	87.9
S.D. (%)	1.4	1.6	0.9	0.8
	Cholic acid	Chenodeoxycholic acid	Deoxycholic acid	Lithocholic acid
F. Serum mean recovery (%)	97.0	100.2	98.6	107.8
S.D. (%)	1.0	0.7	1.0	0.8

Behoudens de recovery van natriumlithocholytaurine in gal was er geen duidelijk verschil tussen de recovery van de geconjugeerde galzuren in water en in gal (Tabel III.3) Tussen de recoverypercentages van aan glycine en die van aan taurine geconjugeerde galzuren bestond voor wat betreft cholzuur en desoxycholzuur een duidelijk verschil. Dit zou kunnen samenhangen met de substratspecificiteit van het N-cholylglycinehydrolase (Nair, 1969).

Van een standaardoplossing van de ongeconjugeerde galzuren cholzuur, chenodesoxycholzuur, desoxycholzuur en lithocholzuur, welke in bekende hoeveelheden toegevoegd waren aan serum, werd na het doorlopen van de hele procedure 97 - 107% teruggevonden (Tabel III.3).

Als referentie voor alle recoverystudies werden in aceton opgeloste T.F.A.-methylesterderivaten van ongeconjugeerde galzuren gebruikt. Aangenomen werd, dat de recovery van deze galzuren 100% was. Aangezien de recoverypercentages van standaardmengsels geconjugeerde galzuren voor de hele procedure varieerden van 84 tot 98% en de recovery van de ongeconjugeerde zuren ca 100% was, werd aangenomen dat het belangrijkste en enige verlies van betekenis bij deze recoveryexperimenten ontstond tijdens de hydrolysestap en niet tijdens de verschillende extractie- en zuiveringsprocedures. De recovery bleek niet verbeterd te worden door hetzij meer enzym toe te voegen, hetzij de hydrolyse langer dan 3 uur te laten duren.

Natuurlijk bieden deze recoverystudies van geconjugeerde galzuren in water, serum, gal of urine geen volledige garantie, dat de hoeveelheid galzuren in een monster ook werkelijk bepaald wordt. Zo is bijvoorbeeld bekend, dat de mate van eiwitbinding van de verschillende galzuren kan verschillen, Vooral lithocholzuur zou sterk aan serum eiwit gebonden zijn (Rudman en Kendall, 1957). Dit zou kunnen betekenen, dat er tijdens de eiwitprecipitatie een deel van de in een monster aanwezige galzuren verloren gaan.

De recoverypercentages van oplossingen van aan taurine geconjugeerde galzuren, die telkens opnieuw bereid en op verschillende tijdstippen bepaald werden, lieten minder gunstige resultaten zien dan de in Tabel III.3. genoemde percentages voor deze galzuren, die in één serie bewerkt worden. In Tabel III.4. worden deze recoverypercentages voor serum, gal en urine weergegeven.

TABLE III.4.

Recoveries of tauro-conjugated bile acids, added in known amounts to serum (A), bile (B) and urine (C) and estimated at different times under the same conditions. The bile acid standard solutions were freshly prepared before every analysis.

	Sodium cholyltaurine	Sodium chenodeoxy-cholyltaurine	Sodium deoxy-cholyltaurine	Sodium litho-cholyltaurine
A. Serum mean recovery (%)	80.6	90.0	94.9	81.8
S.D. (%)	6.0	7.7	6.7	7.6
n = 33				
B. Bile mean recovery (%)	86.0	93.6	100.0	83.5
S.D. (%)	4.5	6.0	7.0	8.5
n = 8				
C. Urine mean recovery (%)	with solvolysis			
n = 4	83.5	81.5	80.0	78.0
	without solvolysis			
	88.0	90.0	87.5	83.5

De recoverypercentages van een standaardoplossing van de verschillende galzuren in normaal serum, waarbij van elk galzuur 10 $\mu\text{g/ml}$ was toegevoegd, was hetzelfde als van een standaardoplossing waarbij 100 $\mu\text{g/ml}$ van elk galzuur was toegevoegd; alleen de recovery van lithocholzuur bedroeg 10% minder dan in het laatste geval. De recoverypercentages van de verschillende galzuren, toegevoegd aan urine van een proefpersoon waren bevredigend, maar lagen doorgaans iets lager dan die in gal of serum. Dit is te verklaren uit de extractie met Amberlite-XAD₂ vooraf. Makino en Sjøvall (1972) geven extra verliezen op van $\pm 10\%$ bij deze stap. Hoewel in de urinemonsters altijd een solvolysestap volgens Palmer (1967 en 1971) werd gedaan, moet toch worden opgemerkt, dat de genoemde recoverypercentages geen zuivere maat behoeven te zijn voor de bepaling van sulfaatveresterde galzuren, aangezien immers standaardpreparaten van deze aan sulfaat veresterde galzuren niet beschikbaar waren.

2.8.3. Gevoeligheid van de bepalingsmethode

Als blanco werd de interne standaard, opgelost in methanol, gebruikt. Na het doorlopen van de gehele procedure was het resultaat slechts één piek, die van de interne standaard.

De limiet voor de bepalingmethode in serum werd op ongeveer 0,3 $\mu\text{g/ml}$ galzuur vastgesteld. In urine was dit 0,3 mg/l en in gal 0,01 mg/ml. De gevoeligheid van de met een vlamionisatiedetector uitgeruste gaschromatograaf was ongeveer 10-20 ng per galzuur, waarbij de gevoeligheid voor lithocholzuur het hoogst was.

2.8.4. Nauwkeurigheid van de bepalingmethode

De nauwkeurigheid van de gaschromatografische meting werd getest met monsters van verschillende concentraties. Hierbij werd een lineaire correlatie gevonden tussen de geïnjecteerde hoeveelheid galzuur (0,05-0,5 μg) en de piekhoogte, wanneer de gevonden piekhoogte gecorrigeerd was op de interne standaard (Fig. III.4). Roovers e.a., (1968) vonden met acetaatmethylesterderivaten van galzuren geen duidelijke lineaire respons.

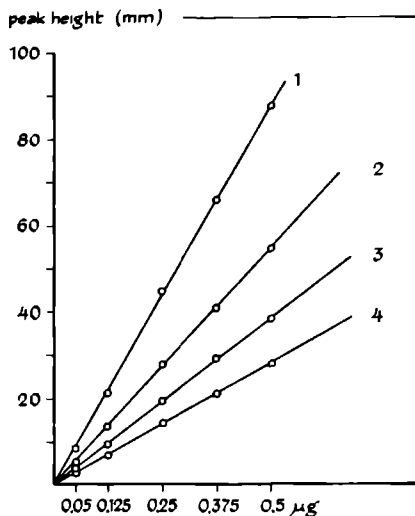


Fig. III.4. Dose response correlation of lithocholic acid (1), deoxycholic acid(2), chenodeoxycholic acid(3) and cholic acid(4).
A linear correlation is present between the injected dose of T.F.A methylester derivatives of bile acids and the peak height response on the gas chromatograph

Verdunningscurves van een galmonster (0,01 ml - 0,1 ml) lieten ook een lineaire correlatie zien tussen de hoeveelheid galzuur en de piekhoogte (Fig. III.5).

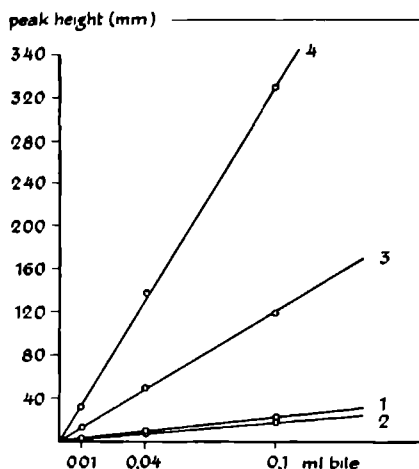


Fig III 5 A linear correlation is present between bile acid concentrations in different dilutions of a bile sample and the peak height response on the gas chromatograph Lithocholic acid(1), deoxycholic acid(2), chenodeoxycholic acid(3) and cholic acid(4)

Met iedere serie serumbepalingen, die in één zitting onder exact gelijke omstandigheden werd uitgevoerd, liep een standaardmengsel van geconjugeerde galzuren, opgelost in serum, mee. Op deze wijze kon voor een eventueel verlies, geleden tijdens de hydrolyse, worden gecorrigeerd. Bovendien werd vóór de methyleringsstap als interne standaard 7-ketolithocholzuur of 7-ketodesoxycholzuur toegevoegd om te lage uitkomsten als gevolg van een onbekend verlies bij de T.F.A.-methylestervorming en bij de gaschromatografische procedure te ontdekken.

De nauwkeurigheid van de meting in serummonsters is het minst in het normale gebied. Om een indruk te verkrijgen van de normaalwaarden van de verschillende galzuren, die in serum aanwezig zijn bij gezonde personen, werd een groot aantal bepalingen in enkelvoud gedaan in een groep normale personen. Op deze wijze werd een redelijke indruk verkregen van een normaal serum chromatogram

(Fig. III.1.b). Bovendien kon hieruit worden afgeleid, dat de totale hoeveelheid galzuren in serum altijd kleiner dan 2,5 $\mu\text{g/ml}$ was. De resultaten van serumbepalingen bij 30 normale personen zijn samengevat in Tabel III.5. Tevens zijn in deze tabel de normaalwaarden vermeld, die met gaschromatografische technieken door andere onderzoekers zijn verkregen.

In onze studie werd voor de totale serum galzuurconcentratie een gemiddelde van 0,7 $\mu\text{g/ml}$ serum gevonden. Deze normaalwaarden komen redelijk overeen met die van Sandberg e.a. (1965), Roovers e.a. (1968) en Makino e.a. (1969).

De nauwkeurigheid van de bepaling in serum werd bovendien nagegaan door cholzuur in 18 serummonsters te bepalen, met behulp van een recent ontwikkelde zeer gevoelige radio-immunoassay (Simmonds e.a., 1973). De 18 serummonsters werden gezonden naar Dr. A. F. Hofmann (Gastroenterology Unit, Mayo Clinic, Rochester, Minn.). Het resultaat hiervan was zeer bevredigend (Fig. III.6).

De methode werd ook getest door bepaling van galzuren in B-gal van normale personen. Bij deze groep van 17 personen werd een redelijke standaarddeviatie van de galzuurconcentratie in B-gal gevonden (Tabel III.6). Sjövall (1960) vond een verhouding van cholzuur : chenodesoxycholzuur : desoxycholzuur in B-gal van 3 normale personen van 1,0 : 0,9 : 0,6. Vlahcevic e.a. (1970^b) vonden bij een groep van 8 normale personen een verhouding van 1,0 : 0,8 : 0,3 : 0,07 (met lithocholzuur), Malagelada e.a., (1973) toonden bij 10 gezonde jonge mannen een ratio aan van 1,0 : 1,2 : 0,4. In onze studie werd een verhouding gevonden van 1,0 : 1,0 : 0,2 : 0,04.

In 5 ml van 24-uurs urine van normale personen konden nagevoeg geen galzuren worden aangetoond.

2.8.5. Reproduceerbaarheid van de bepalingsmethode

Om de reproduceerbaarheid van de bepalingsmethode te testen, werden een aantal galzuurbepalingen in serum, gal en urine van patiënten met cholestase in duplo verricht. De totale concentratie aan galzuren in de serummonsters, die in duplo bepaald werden, vertoonden een spreiding van 5,5 - 278,1 $\mu\text{g/ml}$.

TABLE III.5. Means and ranges of serum bile acids ($\mu\text{g/ml}$) in normal fasting persons.

Reference	Cholic acid	Chenodeoxy- cholic acid	Deoxycholic acid	Lithocholic acid	Total bile acids	Number of persons studied
Sandberg et al (1965)	0.19 0.03-0.65	0.34 0.05-1.30	0.24 0.06-0.45	- -	0.76 0.29-2.26	16
Roovers et al (1968)					1.16-1.91	3
Makino et al (1969)	0.2 tr.-0.36	0.2 tr.-0.55	0.2 0.04-0.55	- -	0.6 0.12-1.46	20
Pellizzarri et al (1973)	0.16 0.01-0.46	0.13 0.01-0.50	0.07 0.01-0.46	trace -	0.36 0.04-0.72	28
Present study	0.2 tr.- 1.0	0.3 tr.- 1.0	0.1 tr.- 1.0	trace -	0.7 0.3- 2.5	30

TABLE III.6. Results of bile acid analyses in B-bile (bile rich duodenal fluid after cholecystokinin stimulation) of normal fasting persons.

	Cholic acid	Chenodeoxycholic acid	Deoxycholic acid	Lithocholic acid	Total bile acids
Mean (mg/ml)	12.91	13.31	2.92	0.56	27.74
Range (mg/ml)	5.32-33.30	5.00-23.90	0.82-6.87	0.27-1.01	14.02-58.01
S.D. (mg/ml)	3.88	3.53	0.88	0.18	6.84
n = 17					

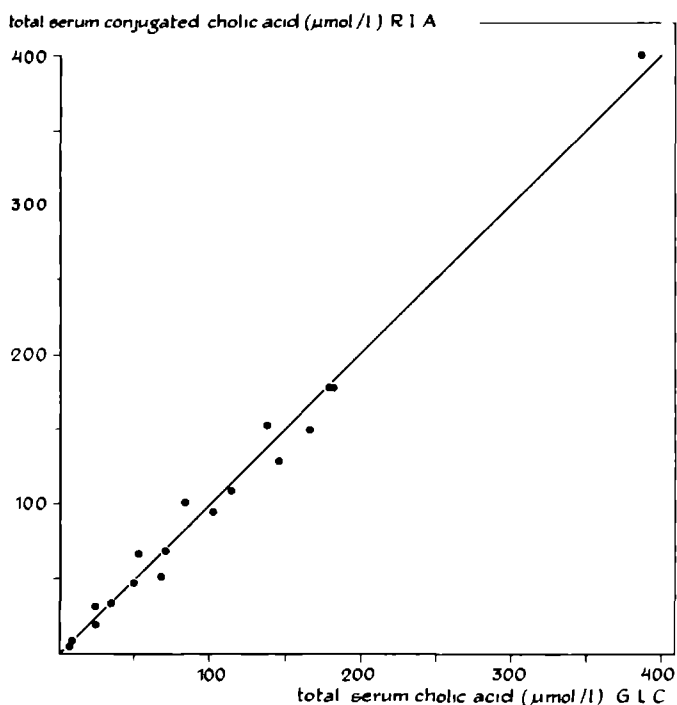


Fig III 6 Correlation between the total serum cholic acid concentration analysed by gas liquid chromatography G L C) and the cholic acid concentration analysed by the radioimmuno assay (R I A) of Simmonds et al (1973) (n=18)

TABLE III.7. Results of serial duplicate analyses of serum from patients with liver diseases.

The ratio of the primary bile acids cholic acid and chenodeoxycholic acid had a range of 0.2 - 4.2 with a S.D. of ± 0.1 .

No	Cholic acid	Chenodeoxy- cholic acid	Deoxycholic acid	Lithocholic acid	Total bile acids ($\mu\text{g/ml}$)
1	2.0	8.7	-	-	10.7
	2.2	10.6	-	-	12.8
2	6.5	6.7	0.9	-	14.1
	8.4	6.6	0.8	-	15.8
3	24.3	9.2	-	-	33.5
	23.9	8.5	-	-	32.4
4	3.2	4.0	-	-	7.2
	3.5	3.8	-	-	7.3
5	4.5	2.5	1.0	-	8.0
	4.7	3.2	0.9	-	8.8
6	23.6	20.7	2.2	-	46.5
	25.6	22.8	1.7	-	50.1
7	88.6	23.5	-	-	112.1
	88.8	21.1	-	-	109.9
8	56.0	60.5	-	-	116.5
	57.0	61.5	-	-	118.5
9	4.6	6.5	1.8	Trace	12.9
	5.6	7.9	1.7	Trace	15.2
10	22.2	8.6	-	-	30.8
	22.4	8.2	-	-	30.6
11	9.8	11.2	-	-	21.0
	10.2	10.3	-	-	20.5
12	9.1	9.6	-	-	18.7
	10.5	10.3	-	-	20.8
13	67.8	24.9	-	-	92.7
	66.5	26.7	-	-	93.2
14	3.8	11.4	-	-	15.2
	3.9	11.3	-	-	15.2
15	4.3	12.5	2.1	-	18.9
	4.5	13.0	2.9	-	20.4
16	8.8	25.8	4.8	Trace	39.4
	10.4	26.5	4.6	Trace	41.5
17	207.9	69.4	-	-	277.3
	206.5	71.6	-	-	278.1
18	32.1	44.8	-	-	76.9
	29.4	44.2	-	-	73.6
19	11.7	12.3	7.5	0.9	32.4
	11.8	12.5	6.9	0.9	32.1
20	25.5	10.0	9.8	Trace	45.3
	24.1	11.7	7.6	Trace	43.4
21	2.8	3.9	0.9	-	7.6
	2.9	2.8	0.7	-	6.4
22	18.5	50.7	0.9	-	70.1
	20.0	52.7	1.1	-	73.8
23	5.2	21.4	6.0	-	32.6
	5.5	22.2	6.4	-	34.1
24	32.4	22.3	-	0.6	54.3
	29.1	24.1	-	0.5	53.7
25	1.8	5.7	0.3	-	7.8
	1.9	5.8	0.2	-	7.9
26	1.9	2.2	1.5	-	5.6
	2.1	2.2	1.2	-	5.5
27	77.0	25.4	2.5	-	104.9
	74.5	23.9	2.3	-	100.7
S.D. ^x	0.9	0.8	0.3	-	1.4

^xCalculation S.D. to $S = \pm \sqrt{\frac{\sum (x^i - \bar{x})^2}{2N}}$

De resultaten van de duplobepalingen worden weergegeven in Tabel III.7. Hieruit blijkt dat de standaarddeviatie bij duplobepalingen van serum galzuren onder pathologische omstandigheden heel aanvaardbaar is.

Tevens werden een aantal bepalingen in duplo verricht van galmonsters (Tabel III.8).

TABLE III.8 Results of serial duplicate analyses of bile samples from patients with liver diseases.

The ratio of the primary bile acids cholic acid and chenodeoxycholic acid had a range of 0.46-3.38 with a S.D. of ± 0.10 .

No	Cholic acid	Chenodeoxycholic acid	Deoxycholic acid	Lithocholic acid	Total bile acids (mg/ml)
1	7.57	2.38	0.17	0.31	10.43
	7.77	2.30	0.21	0.30	10.58
2	0.67	0.89	0.11	0.20	1.87
	0.79	1.12	0.08	0.12	2.11
3	2.89	2.94	0.48	0.09	6.40
	2.86	3.14	0.38	0.07	6.45
4.	1.55	3.02	0.00	0.06	4.63
	1.29	2.79	0.00	0.04	4.12
5.	0.64	0.63	0.02	0.13	1.42
	0.84	0.73	0.02	0.11	1.67
6	0.85	1.20	0.07	0.03	2.15
	0.79	1.25	0.06	0.00	2.10
7	2.15	0.69	0.03	0.00	2.87
	2.10	0.66	0.02	0.00	2.78
S.D. ^x \pm	0.11	0.13	0.03	0.02	0.20

^x Calculation S.D. as in Table III.7.

TABLE III.9. Results of serial duplicate analyses of urine samples from patients with liver diseases.

The cholic acid/chenodeoxycholic acid ratio had a range of 0.66-4.97 with a S.D. of 3.13.

No	Cholic acid	Chenodeoxy- cholic acid	Deoxycholic acid	Lithocholic acid	Total bile acids (mg/l)
1	3.52	1.05	0.13	0.00	4.70
	3.33	0.68	0.13	0.00	4.46
2	2.44	1.90	0.11	0.00	4.45
	2.86	1.60	0.14	0.00	4.60
3	4.37	2.95	0.28	0.00	7.60
	4.46	2.45	0.34	0.30	7.55
4	8.65	6.41	0.50	0.00	15.56
	8.35	5.74	0.41	0.00	14.50
5	6.65	4.11	0.21	0.00	10.97
	7.82	4.60	0.34	0.00	12.76
6	22.06	33.05	0.50	2.14	57.75
	20.30	29.41	0.39	2.41	52.51
7	30.01	22.83	1.11	1.30	55.25
	30.01	22.40	1.13	1.61	55.15
8	2.61	0.90	1.03	0.80	5.35
	2.81	0.76	1.20	0.81	5.58
S.D.	0.22	0.29	0.09	-	0.43

Calculation S.D. as in Table III.7.

In Tabel III.9. worden de uitkomsten van bepalingen in duplo in urine weergegeven. Hierbij dient te worden opgemerkt, dat bij alle duplo bepalingen een periode van minstens twee maanden tussen de beide bepalingen lag. Alle bepalingen werden onder exact gelijke omstandigheden door dezelfde persoon verricht. Dit laatste punt is waarschijnlijk een belangrijke factor bij de verklaring voor de redelijke resultaten voor wat betreft de reproduceerbaarheid van de bepaling.

De reproduceerbaarheid van de bepaling werd ook gemeten door herhaalde bepalingen van geconjugeerde of vrije galzuren in water

of serum. De gemiddelde recoverypercentages van deze monsters, welke in één serie 8 keer bepaald werden, vertoonden slechts geringe standaarddeviaties (Tabel III.3). De bepalingmethode voor serum en gal is uitvoerig elders beschreven (van Berge Henegouwen e.a., 1974^b).

III.3. Overige bepalingmethoden

III.3.1. Chemische bepalingen in serum

(Klinisch Chemisch Laboratorium, Gemeente Ziekenhuis Arnhem).

- Totaal bilirubine: methode volgens Witmans, Schalm en Schulte (1961) (spreiding 2 - 10 mg/l.)
- Alkalische fosfatase-activiteit: gewijzigde methode volgens Bessey (1946) uitgedrukt in eenheden King en Armstrong (Spreiding: 3 - 12 E.). Deze uitkomsten kunnen worden herleid tot de tegenwoordig in vele laboratoria gebruikte U/l (mits de gewijzigde Bessey-techniek is toegepast met 2-aminomethylpropanol-1-buffer) door vermenigvuldiging met 9,41.
- 5'-nucleotidase-activiteit: methode Persijn e.a. (1968, 1969, 1969^a, 1970) (Spreiding : 2 - 11 E.).
- Eiwitspectrum: Papier electroforesetechniek met analytron Beckman Model RB (Spreiding: 39 - 57 g/l voor albumine; voor gammaglobuline 6 - 14 g/l.) (Muller en Verschure, 1954).
- Cholesterol: methode volgens Huang (1961). Bij verhoogd bilirubinegehalte werd de methode volgens Grigaut gebruikt. (Spreiding: 1,7 - 2,5 g/l.) (Muller en Verschure, 1954).
- Sgot: methode LKB (Karmen, 1955) (normaal: < 30E).
- Sgpt: dezelfde methode (Wroblewski en La Due, 1956) (normaal: < 20E).

III.3.2. Chemische bepalingen in urine en feces

(Klinisch Chemisch Laboratorium, Gemeente Ziekenhuis Arnhem).

- Urobiline in de urine: semikwantitatieve meting, reactie van Schlesinger, sterkte uitgedrukt in : -, +, ++ en +++.
- Bilirubine in de urine; semikwantitatief, reactie van Fouchet, sterkte uitgedrukt in : -, +, ++ en +++.
- Urobilinogeen in de feces: kwantitatieve meting, de reactie van Terwen-Watson, zoals aangegeven door Brandt (1958).

III.3.3. Serologische bepalingen in serum

(Laboratorium voor Immunologie, Gemeente Ziekenhuis Arnhem.

Hoofd: Mevr. O. Zanen-Lim, arts).

- Immuno-electroforese: Agarelectroforesetechniek volgens Scheidegger.
- LE-cel fenomeen: Stollingsmethode volgens Zimmer-Hargraves. Van 20 ml vers bloed wordt een "buffy-coat"-preparaat gemaakt. De uitstrijkjes hiervan worden gekleurd volgens May-Grünwald-Giemsa. Verdeling in negatief en positief, waarbij de aanwezigheid van een sporadische LE-cel ook als positief werd beoordeeld. (Alle bepalingen werden verricht door Mej. J.M. Romijn, Hematologisch Laboratorium, Gemeente Ziekenhuis Arnhem).
- Antilichamen tegen celkernen (ANA): Coupes van rattelever worden geïncubeerd met serum van de patiënt en fluorescerend Coombs-serum (Centraal Laboratorium Bloedtransfusie Dienst, Amsterdam) verdund met natrium-barbitonebuffer (pH 7,2).
- Antilichamen tegen mitochondriën (AMA): zelfde methode als ANA; incubatie echter met rattenierweefsel.
- Antilichamen tegen gladspierweefsel (ASMA): Idem, echter incubatie met rattemaagcoupes. Beoordelingen van ANA, AMA en ASMA in negatieve, zwak positieve, positieve en sterk positieve immunofluorescentie.
- Australië-antigeen (Hepatitis-B-antigeen): Counterelectroforesetechniek (Pesendorfer, 1970) en soms immunodiffusietechniek volgens Ouchterlony.
- Antilichamen tegen Australië-antigeen: Counterelectroforese met specifiek antiserum.

III.3.4. Jeukscore

Hoewel het symptoom jeuk subjectief is, werd toch getracht door dagelijks hiernaar te informeren en eventuele krabeffecten op te sporen, een bepaalde jeukscore bij te houden (Tabel III.10).

TABLE III. 10. Criteria of the pruritus score.

0 (-)	no pruritus
1 (+)	slight pruritus without distinct scratch marks, especially present at night.
2 (++)	moderate intermittent pruritus with distinct scratch marks present.
3 (+++)	severe, often intractable pruritus, day and night present, with scratch marks.

III.4. Statistische analyses

De statistische analyse werd verricht onder leiding van Drs Ph. van Elteren (Mathematisch-Statistische Adviesafdeling van de Universiteit van Nijmegen).

Dit gebeurde o.a. met behulp van een I.B.M.-computer (no 370-158) van het Universitair Rekencentrum.

Een resultaat wordt significant genoemd, als de overschrijdingskans (P) van de toets tussen 0,1% en 5% ligt en zeer significant als deze kans niet groter is dan 0,1%. Ligt de overschrijdingskans tussen de 5% en 10% dan wordt gesproken van een aanwijzing voor een relatie of verschil.

III.4.1. Gebruikte toetsen

Daar bij het onderzoek in het algemeen grootheden zijn betrokken met een zeer scheve verdeling, veelal met slechts een ordinale schaal, is konsekwent gebruik gemaakt van verdelingsvrije toetsingsmethoden.

De volgende toetsen zijn toegepast:

- de tekentoets (Rümke en van Eeden, 1961), opgegeven wordt de tweezijdige overschrijdingskans onder het symbool P_{tek} .
- de toets van Wilcoxon voor twee steekproeven (Mann-Whitney-U-test) (Rümke en van Eeden, 1961). De overschrijdingskans wordt met het symbool P_w opgegeven.
- de rangcorrelatietoets van Spearman (de Jonge, 1958). Hiermee kan worden nagegaan, of tussen twee variabelen een stijgend of dalend verband bestaat. De rangcorrelatiecoëfficiënt r_s en de

tweezijdige overschrijdingskans P_g worden hierbij opgegeven.

III.5. Samenstelling en selectie van de onderzochte personen

Bij het onderzoek waren betrokken normale personen, patiënten met levercirrhose en patiënten met cholestase van intra- of extrahepatische oorsprong. Daar bij patiënten met galstase soms moeilijk van een evenwichtssituatie gesproken kan worden - deze bestaat eigenlijk alleen bij een langer bestaande totale afsluitingsicterus - werden alleen bepalingen gedaan, wanneer de patiënten gedurende langere tijd (meer dan 6 weken) dezelfde behandeling hadden ondergaan, zodat een eventuele invloed van bijv. medicatie met immunosuppressiva als azathioprine of prednison op het galzuurmetabolisme "gestabiliseerd" zou zijn. De toediening van direct met het galzuurmetabolisme interfererende middelen zoals cholestyramine, neomycine, breedspectrumantibiotica, laxantia en barbituraten was minstens 6 weken vóór het onderzoek gestaakt. Wel werden bij een groep patiënten met P.D.C., primaire scleroserende cholangitis en intrahepatische cholestase e.c.i. ook galzuurbepalingen gedaan tijdens behandeling met cholestyramine en fenobarbital om de invloed op de galzuurconcentratie in het serum en op de jeuk na te gaan.

Bij patiënten met intrahepatische cholestase, en in het bijzonder met P.B.C., is het vaak moeilijk van een stabiele situatie te spreken, omdat bij een deel der patiënten de mate van galstase spontaan nogal kan variëren en soms zelfs een cyclisch verloop blijkt te hebben (Fouik en Baggenstoss, 1969 en eigen waarnemingen).

III.5.1. Normale personen

Deze bestonden deels uit patiënten, die op het ambulatorium van het ziekenhuis waren opgenomen. Als voorwaarde werd gesteld, dat op grond van anamnese, lichamelijk onderzoek en röntgen- en laboratoriumonderzoek, maagdarm-, lever- en galwegziekten uitgesloten waren. De patiënten gebruikten geen medicatie en waren ingesteld op het boven beschreven standaarddieet. De meeste patiënten waren opgenomen voor algeheel intern onderzoek wegens atypische, bij poliklinisch onderzoek niet te duiden klachten en voor kleine chirurgische ingrepen. Verder werden bepalingen in serum en in gal gedaan bij gezonde vrijwilligers, die geen medicijnen gebruikten en

geen dieetvoorschriften hadden.

Bij al deze personen werd onderzocht in serum: bilirubine, alkalische fosfatase, 5'-nucleotidase, sgot, sgpt, cholesterol en eiwitspectrum. Alle functieproeven vielen bij deze personen binnen de normale grenzen.

III.5.2. Patiënten met Primaire Biliaire Cirrhose (P.B.C.)

19 Patiënten met een bewezen P.B.C. werden onderzocht. Criteria voor de diagnose P.B.C. met de histologische stadiumindeling volgens Rubin e.a. (1965) werden reeds vermeld in § II.5. In Tabel III.11. wordt een overzicht gegeven van de belangrijkste klinische, chemische, serologische en histologische gegevens ten tijde van het onderzoek van serum-, gal- en urinemonsters. Bij 2 patiënten was histologisch gezien sprake van een overlap met een chronische agressieve hepatitis, hetgeen wel vaker wordt waargenomen, vooral in naaldbiopsiën (Popper en Schaffner, 1970^a). Patiënt 4 en patiënt 17 waren zusters.

Bij 4 patiënten was er tevens sprake van een collageenziekte, te weten: 3 patiënten met rheumatoïde arthritis (pat. 2, 7 en 9) en 1 patiënt met sclerodermie (pat. 13). Het gelijktijdig voorkomen van twee "primaire auto-immuun" syndromen bij eenzelfde patiënt is op zich niet ongewoon (van Berge Henegouwen e.a., 1973 en 1973^a; Sherlock en Scheuer, 1973).

Bij 10 patiënten werd door middel van een laparotomie het extrahepatische galwegsysteem onderzocht. Jeuk was een wisselend voorkomend verschijnsel bij deze groep patiënten.

Een groot deel van hen had ten tijde van het onderzoek therapie met immunosuppressiva. Dat de ernst van het symptoom jeuk door dit soort middelen verminderd kan worden, is waarschijnlijk. Azathioprine zou bij P.B.C. effectief zijn tegen de jeuk zonder invloed uit te oefenen op de galzuurconcentratie in het serum (Alarçon-Segovia e.a., 1970).

Bij onze groep patiënten leek onder invloed van azathioprine slechts 1 patiënt minder last van jeuk te hebben (patiënt 1). Cyclophosphamide leidde tot een zeer duidelijke vermindering van de jeuk bij patiënt 9. Prednison leek bij de meeste patiënten geen invloed te hebben op de jeuk. Bij 2 patiënten verergerde de jeuk samen met een duidelijke achteruitgang van de leverfuncties tijdens

TABLE III.11. Clinical data of patients with primary biliary cirrhosis (P.B.C.) at the time of bile acid analysis.

Patient number	Age yrs	Sex	Duration of illness yrs	Pruritus	Hepato-megaly	Spleno-megaly	Xanthoma	Serum albumin g/l	Serum γ -globulin g/l	Serum immunoglobulins increased	ANA	AMA	Liver biopsy and P.B.C. stage	Medication	Details
1 ^{xx}	46	F	15	-	+	-	+	34.0	27.5	IgM	Neg.	Pos.	P.B.C. II	Azathioprine	-
2	65	F	12	++	+	-	+	36.0	8.5	IgM	Neg.	Pos.	P.B.C. II	Azathioprine	Rheumatoid arthritis
3 ^{xx}	76	F	1	++	+	-	-	32.5	38.5	IgM	Neg.	Strongly pos.	P.B.C. I	-	Cholecystectomy
4	56	F	4	++	+	-	+	33.5	15.0	IgM	Neg.	Strongly pos.	P.B.C. III	Prednisone	-
5	56	F	4	+	+	+	+	27.5	23.5	IgM	Neg.	Strongly pos.	P.B.C. III	-	-
6	74	F	2 (?)	-	+	-	+	52.5	13.5	IgM	Neg.	Strongly pos.	P.B.C. I	-	Gallstones
7	70	M	3	-	+	-	-	50.5	5.5	Normal	Pos.	Strongly pos.	P.B.C. I	Cyclophosphamide	Rheumatoid arthritis
8 ^{xx}	52	F	6	+	+	+	+	34.5	13.5	IgA,IgM	Neg.	Pos.	P.B.C. III	Prednisone	-
9	56	F	3	-	+	+	-	39.5	14.5	IgM,IgG	Neg.(?)	Strongly pos.	P.B.C. ^x (?) IV C.A.H.	Cyclophosphamide	Rheumatoid arthritis
10 ^{xx}	37	F	3	++	+	+	+	38.5	10.5	IgA,IgM	Pos.	Pos.	P.B.C. II	Prednisone/Azathioprine	-
11	47	M	6	-	-	-	-	42.0	14.5	IgM	Neg.	Strongly pos.	P.B.C. III	Azathioprine	-
12 ^{xx}	59	M	4(?)	-	+	+	-	44.9	28.3	IgM,IgG	Pos.	Strongly pos.	P.B.C. IV	-	-
13 ^{xx}	48	F	5	++	+	+	-	23.0	33.0	IgM	Neg.	Strongly pos.	P.B.C. III	-	Scleroderma Cholecystectomy
14 ^{xx}	53	M	1	-	+	-	-	37.0	13.0	IgM	Neg.	Strongly pos.	P.B.C. I	-	-
15 ^{xx}	51	F	7	++	+	-	+	34.0	17.5	IgA,IgM,IgG	Pos.	Weakly pos.	P.B.C. ^x II C.A.H.	Azathioprine/Prednisone	Cholecystectomy
16 ^{xx}	60	F	11	-	+	+	-	40.5	11.5	Normal	Neg.	Pos.	P.B.C. III	Prednisone	-
17	62	F	8	+	+	-	-	37.3	24.5	IgM,IgA	Neg.	Strongly pos.	P.B.C. IV	Spironolactone Furosemide	Ascites
18 ^{xx}	78	F	13	-	+	+	+	39.0	19.5	IgM	Neg.	Pos.	P.B.C. III	-	-
19	39	F	3	+	+	+	+	36.5	15.0	IgM	Neg.	Strongly pos.	P.B.C. II	-	-

^xHistological overlap of P.B.C. and chronic aggressive hepatitis (C.A.H.).

^{xx}The extrahepatic biliary system was investigated at laparotomy and cholangiography. A liver wedge biopsy for histological examination was performed on this occasion.

het gebruik van prednison. Het gebruik van andere middelen tegen jeuk zoals antihistaminica, werd minstens 2 dagen vóór het onderzoek gestopt.

De duur van de ziekte werd als volgt gedefinieerd: Als startpunt werd genomen

- a. óf het moment, waarop de patiënt icterisch was geworden of over jeuk was gaan klagen. Dit ging steeds gepaard met bovenbuikspijnen, verminderde eetlust, vetintolerantie of vermagering.
- b. óf het moment, waarop voor het eerst een verhoogd(e) serum alkalische fosfatase-activiteit of bilirubinegehalte was vastgesteld.

Bij de meeste patiënten was het geen probleem met deze criteria het beginpunt en daarmee bij benadering de duur van de ziekte te bepalen. Daarbij bestond wel de mogelijkheid van fouten door de subjectieve interpretatie van de patiënt. Het is duidelijk dat men de ziekteduur niet 'zonder meer gelijk kan stellen aan de duur van de cholestase.

III.5.3. Patiënten met levercirrhose

Een groep van 18 patiënten met een levercirrhose werd onderzocht. Voor klinische, chemische, serologische en histologische gegevens wordt verwezen naar Tabel III.12. De patiënten uit deze groep hadden verschillende vormen van cirrhose, pathologisch-anatomisch in te delen in micro-, macro-, of gemengd nodulaire vormen (Sherlock, 1971; Scheuer, 1973).

De oorzaken van de cirrhose waren de volgende:

1. Posthepatitische of postnecrotische cirrhose.
2. Alcoholische cirrhose.
3. Chronische actieve hepatitis met hyperimmune kenmerken.
4. Haemochromatose.
5. Cryptogene cirrhose.

Ook hier werd gelet op jeuk. De duur van de ziekte bleek vaak niet te achterhalen.

III.5.4. Patiënten met obstructies in de extrahepatische galwegen

16 patiënten werden in deze groep onderzocht. Alle patiënten hadden cholestase, hetgeen ook histologisch bevestigd werd. 13

TABLE III.12 Clinical data of patients with liver cirrhosis at the time of bile acid analyses

Patient number	Age yrs	Sex	Pruritus	Hepato-megaly	Spleno-megaly	Spider naevi	ANA	ASMA	AMA	LC-cells	Hepatitis B Antigen	Serum albumin	Serum γ - globulin	Liver biopsy	Etiology	Medication
1	48	M	+	+	-	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	42.0	22.5	Micronodular	Alcoholic	-
2 ^x	58	M	-	+	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	19.0	38.0	Micronodular	Posthepatic	Prednisone
3	68	M	-	+	-	-	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	39.5	18.5	Macronodular	Haemochromatosis	-
4 ^x	58	M	+	+	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	38.7	15.0	Macronodular	Posthepatic	Diuretics
5	39	F	-	+	+	-	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	36.5	15.5	Macronodular (?)	Posthepatic	Prednisone Azathioprine
6	52	F	+	+	-	+	Neg.	Weakly pos.	Weakly pos.	Neg.	Neg.	38.5	9.5	Macronodular	Cryptogenic	Seer
7	57	F	-	+	+	+	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	39.0	14.0	Mixed nodular	Chronic active hepatitis	-
8 ^x	19	F	+	-	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	37.5	18.0	Mixed nodular	Cryptogenic with cholestasis	-
9	62	M	+	+	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	42.5	12.5	Micronodular	Alcoholic	-
10	28	F	-	+	+	-	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	44.0	14.0	Macronodular (?)	Chronic active hepatitis	Prednisone
11 ^x	51	M	++	+	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	37.0	15.0	Micronodular	Cryptogenic Alcoholic ?	-
12	39	M	-	+	+	+	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	37.0	13.0	Macronodular	Posthepatic	-
13	17	F	-	-	+	-	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	37.5	18.5	Macronodular	Chronic active hepatitis	Prednisone
14 ^x	64	F	+	+	-	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	23.0	9.5	Micronodular	Cryptogenic Alcoholic	Diuretics
15	68	F	+	+	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	35.5	24.0	Micronodular	Alcoholic	Diuretics
16	17	M	-	-	+	+	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	40.5	9.5	Macronodular	Cryptogenic	Prednisone
17	59	M	-	+	-	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	41.0	18.0	Micronodular	Alcoholic	-
18 ^x	68	F	-	+	+	-	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	51.0	7.0	Mixed nodular	Cryptogenic	-

^xWith distinct features of portosystemic shunting.

patiënten hadden een complete extrahepatische obstructie en 3 patiënten een incomplete extrahepatische obstructie van de galwegen (zie Tabel III.13). De duur van de ziekte werd op dezelfde wijze gedefinieerd als bij de P.B.C.-patiënten. Hyperimmune kenmerken waren bij geen van de patiënten aanwezig. Hepatitis B-antigeen was aantoonbaar bij 1 patiënt (patiënt 6), die een obstructie-icterus had ten gevolge van een pancreaskopcarcinoom. Geen van de patiënten kreeg enige jeukverminderde of andere medicatie tijdens het onderzoek. Ook hier werd de jeukscore (Tabel III.10) gehanteerd. Ofschoon er in deze groep veel maligniteiten voorkomen, werden bij geen van de patiënten bij laparotomie of obductie metastasen in de lever aangetoond.

Of een obstructie compleet of incompleet was, werd nagegaan aan de hand van de uitscheiding van urobiline in de urine en urobilinogeen in de ontlasting. Werd gedurende 7 of meer dagen een spoor tot geen urobiline in de urine aangetroffen, dan werd overgegaan tot verzamelen der ontlasting gedurende 3 dagen voor bepaling van urobilinogeen. Tijdens deze periode mochten de patiënten geen antibiotica of laxantia gebruiken. Werd gedurende deze periode minder dan 5 mg urobilinogeen per dag in de ontlasting aangetoond, dan werd aangenomen dat de obstructie compleet was (Brandt, 1958) en werd binnen een week tot laparotomie overgegaan. Bij sommige patiënten was ondanks de afwezigheid van urobilinogeen in de ontlasting een spoor urobiline in de urine aantoonbaar, hetgeen Brandt verklaart door uitscheiding van sporen geconjugeerd bilirubine naar de darm buiten het galwegsysteem om (Brandt, 1958). Geconjugeerd bilirubine zou met serum eiwitten, die ook onder normale omstandigheden (tot ongeveer 30 ml plasma per dag) in het darm-lumen kunnen worden uitgescheiden (v. Tongeren, 1967), in de darm terecht kunnen komen. Aangezien de reactie van Schlesinger in de urine veel gevoeliger is dan de urobilinogeenreactie in de feces, is het te verklaren, dat deze reactie in de urine soms een spoor positief is bij een negatieve reactie in de feces.

Bij een aantal patiënten werden tevens achtereenvolgende bepalingen van galzuren gedaan in serum en in draingal na het opheffen van de obstructie door een operatie.

TABLE III.13. Clinical data of patients with extrahepatic obstruction of the biliary tract at the time of bile acid analyses.

Patient number	Age yrs	Sex	Duration of illness (months)	Pruri-tus	Urine		Faeces Urobilinogen mg/day	Necropsy and/or laparotomy	Liver biopsy	xx Diagnosis	C or I
					Urobilin	Bilirubin					
1	56	M	12	+++	+	-	114.0	+	E.O.	Choledochal duct ca	I
2	65	F	24 (?)	+	+	+	?	+	S.B.C.	Stones in common bile duct	I
3	77	M	2	-	trace	+	<5.0	+	E.O.	Invasive growth of gastric ca in choledochal duct	C
4	45	F	6	+++	-	+	0	+	E.O. S.B.C.	L. Hepatic duct ca	C
5	67	M	3	+++	trace	+	0	+	E.O.	Pancreas ca	C
6	59	M	2	+++	-	+	0	+	E.O.	L. Hepatic duct ca	C
7	98	M	3	+++	trace	+	<5.0	+	E.O.	Choledochal duct ca	C
8	72	M	1	++	-	+	0	+	E.O.	Pancreas ca	C
9	73	M	6	+	-	+	0	+	E.O.	Pancreas ca	C
10	49	M	4	++	-	+	<5.0	+	E.O.	Pancreas ca	C
11	39	F	5	+	-	+	<5.0	+	E.O.	Ca of the confluence of both hepatic ducts	C
12	73	M	1	+++	+	+	83.0	+	E.O.	Stones in common bile duct	I
13	59	M	2	+++	-	+	0	+	E.O.	Pancreas ca	C
14	53	M	1	+	trace	+	<5.0	+	E.O.	Complete obstruction of both hepatic ducts of unknown origin	C
15	57	M	1	+	trace	+	0	+	E.O.	Ampulla Vateri ca	C
16	77	M	1	+++	-	+	<5.0	+	E.O.	Pancreas ca	C

^x Classification in complete (C) and incomplete (I) obstructive jaundice.

^{xx} E.O. Extrahepatic obstruction . S.B.C. Secondary biliary cirrhosis.

III.5.5. Patiënten met benigne intermitterende intrahepatische cholestase

Leden uit één familie met dit syndroom werden onderzocht. Het betrof een zus en een broer (patiënt 1 en 2) en 2 nichten van hen (patiënt 3 en 4). Dit familie-onderzoek zal elders uitvoerig worden beschreven (de Pagtere.a.). De patiënten voldeden geheel aan de criteria voor dit syndroom, genoemd in hfdst. II. Algemene gegevens van de patiënten zijn samengevat in Tabel III.14. Patiënt 1 werd tweemaal onderzocht tijdens cholestase, waarbij de galstase al over het maximum heen was. Patiënte 4 werd verschillende malen onderzocht tijdens een normale fase en tevens werden bepalingen verricht tijdens enige fasen met cholestase. Patiënt 5 behoorde niet tot deze familie. Hij werd als representant gezien van de niet-familiaire vorm, zoals deze oorspronkelijk door Summerskill en Walshe (1959) is beschreven. De diagnose werd hier per exclusieum gesteld. Terwijl het histologisch onderzoek van de lever in de normale fase geen enkele afwijking liet zien, werd in het biopt tijdens de cholestase een ernstige centrolobulaire cholestase gezien zonder noemenswaardige afwijkingen van het leverparenchym. Bij deze patiënt werden enkele malen galzuurbepalingen gedaan tijdens behandeling met diverse choleretica.

Bij al deze patiënten was het onderzoek op ANA, AMA, ASMA, het Australië-antigeen en LE-cellen negatief. Bij 3 patiënten werd tevens een onderzoek van galzuren in gal verricht.

III.5.6. Patiënten met primaire en secundaire scleroserende cholangitis

4 Patiënten met een primaire en 2 met een secundaire scleroserende cholangitis werden onderzocht. Bij alle 6 patiënten werd deze diagnose tijdens operatie (met pathologisch-anatomisch onderzoek van de lever) gesteld. Alle 4 patiënten met de primaire vorm voldeden aan de criteria, genoemd in § II.5. De gegevens worden samengevat in Tabel III.15.

Opvallend was, dat ook bij deze patiënten tijdelijk het beeld van een complete obstructie-icterus kon bestaan, waarbij minder dan 5 mg urobilinogeen per dag in de feces werd uitgescheiden.

Patiënt 2 overleed thuis 1 jaar na het stellen van de diagno-

TABLE III.14 Clinical data of patients with benign recurrent intrahepatic cholestasis at the time of bile acid analyses.

Patient number	Age yrs	Sex	Pruritus	Cholestasis	Duration of cholestatic episode (months)	Serum albumin g/l	Serum γ -globulin g/l	Liver biopsy	Medication	Date of investigation
1	47	F	++	+	18	44.0	12.4	+	3 x Prednisone	30-10-70
	49	F	+	+	12	44.5	10.5	+	-	2-12-72
2	36	M	-	-	-	45.0	12.5	+	1 x -	2-12-72
3	15	F	-	-	-	48.0	8.0	+	2 x -	30-10-70
	17	F	-	-	-	46.0	8.0	-	-	9-12-72
4	5	F	+	+	12	47.0	8.0	-	-	30-10-70
	7	F	-	-	-	52.5	6.0	-	-	9-12-72
	8	F	+++	+	4-6 weeks	-	-	-	-	Oct.1970-March 1974
5	20	M	++	+	3 weeks	50.0	11.8	+	2 x -	Nov.- Dec. 1973

TABLE III.15. Clinical data of patients with primary (P) and secondary (S) sclerosing cholangitis at the time of bile acid analyses.

Patient number and Diagnosis	Age yrs	Sex	Duration of illness yrs	Pruritus	Urine		Faeces		Serum Albumin g/l	Serum γ -globulin g/l	Liver biopsy	Treatment	Complications ^x
					Urobilin	Bilirubin	Urobilinogen mg/day						
1	P 43	M	2	+++	+	+	14.5	40.5	15.5	S.Ch.	T-drain	After 1 year S.B.C.	
2	P 51	F	1 $\frac{1}{2}$	++	-	+	<5.0	27.0	16.0	S.Ch.	T-drain	† Coma hepaticum	
3	P 62	M	6	++	+	-	125.0	30.0	40.0	S.Ch. S.B.C.	T-drain	† Coma hepaticum	
4	S 52	F	10	-	+	+	56.0	33.5	13.0	S.B.C.	-	S.S.C.	
5	S 51	M	2	+	+	+	96.0	46.0	10.5	E.O.	-	S.S.C.	
6	P 50	F	8	+++	sp	+	5.7	40.5	17.0	S.Ch.	T-drain	S.B.C. † Haemobilia.	

^x S.B.C. = Secondary biliary cirrhosis.

S.Ch. = Sclerosing cholangitis.

S.S.C. = Secondary sclerosing cholangitis due to iatrogenic lesions of the common bile duct.

E.O. = Extrahepatic obstruction.

se en een obductie kon niet worden verricht. Patiënt 3 overleed 3 jaar na het stellen van de diagnose. Bij de obductie werd de diagnose bevestigd.

Bij patiënt 1 en 3 werden meerdere serumbepalingen gedaan, terwijl ook de draingal na operatie bij deze patiënten werd onderzocht. ANA, AMA, ASMA, LE-cellen en Australië-antigeen werden niet aangetoond bij deze groep. Bij patiënt 2, 3 en 6 was de scleroserende cholangitis ook intrahepatisch gelokaliseerd, bij patiënt 1 was dit waarschijnlijk niet het geval. Patiënt 6, bij wie in verband met een toenemende icterus door een bijna complete belemmering van de galafvoer een exploratie van de galwegen werd ondernomen, overleed in aansluiting aan deze ingreep aan de gevolgen van een haemobilie.

2 Patiënten met een secundaire scleroserende cholangitis werden in deze groep ingedeeld. Bij beide patiënten was de ductus choledochus bij een cholecystectomie, die elders was uitgevoerd, gelaedeerd. Bij patiënt 4 bestond een ernstige laesie waarvoor tot 3 keer toe een nieuwe drain in de galwegen, tot intrahepatisch, moest worden aangelegd. Bij patiënt 5 was de laesie minder ernstig en van tijdelijke aard. Hier was de oorzaak van de scleroserende cholangitis te wijten aan het achterlaten van een in de ductus choledochus geplaatst drainagebuisje.

III.5.7. Patiënten met intrahepatische cholestase e.c.i.

Bij 4 patiënten werd geen duidelijke oorzaak gevonden voor de bestaande cholestase (Tabel III.16). Patiënt 1 vertoonde het beeld van een niet complete obstructie-icterus. Elders was een laparotomie gedaan voor onderzoek van het extrahepatische galwegsysteem. Er werden toen geen afwijkingen vastgesteld. Bij de operatie werd een wigexcisie uit de rechter leverkwab genomen voor histologisch onderzoek. De cholestase hierin was te sterk uitgesproken om van een zuivere intrahepatische cholestase te kunnen spreken. Tekenen van hepatitis ontbraken.

Voor en tijdens behandeling met cholestyramine werden bij deze patiënt bepalingen van de serum galzuren verricht. Patiënt 4 had een chronisch persisterende hepatitis met een positieve AMA. De serum alkalische fosfatase-activiteit en de sgot en sgpt waren

TABLE III.16 Clinical data of patients with intrahepatic cholestasis of unknown origin at the time of bile acid analyses.

Patient number	Age yrs	Sex	Duration of illness yrs	Pruritus	Urine		Faeces	Serum Albumin g/l	Serum γ -globulin g/l	Liver biopsy
					Urobilin	Bilirubin	Urobilinogen mg/day			
1	45	M	0.5	++	+	+	40	34.0	11.5	Cholestasis
2	41	F	2	+	+	+	-	50.5	10.0	Cholestasis - P.B.C. stage II ??
3	50	F	12	++	+	+	50	26.5	21.5	Cholestasis - Cirrhosis ?
4	35	M	4	-	+	-	-	48.0	8.5	C.P.H.

* C.P.H. = Chronic persistent hepatitis.

verhoogd bij deze patiënt.

De patiënten 2 en 3 waren zusters van elkaar. Patiënt 2 had behalve een normaal serum bilirubinegehalte, leverfunctiestoornissen, wijzend op intrahepatische cholestase. Op grond van het leverbiopt was een P.B.C. niet uit te sluiten. De AMA was echter negatief. Patiënt 3 was reeds 10 jaar bekend met een ernstige intrahepatische cholestase e.c.i.. De AMA was ook hier negatief. Op grond van het leverbiopt werd het waarschijnlijk geacht, dat een levercirrhose aanwezig was. Een P.B.C. kon echter niet worden aangetoond. Het klinische beeld bij deze patiënte verergerde begin 1973 vrij abrupt met het toenemen van de icterus. Het serum bilirubinegehalte steeg tot 107 mg/l. Een broer van de patiënten 2 en 3 overleed in 1963 in het Gemeente Ziekenhuis te Arnhem ten gevolge van een bloeding uit oesophagusvarices. Bij de obductie werd een cirrhose vastgesteld. Ook hij vertoonde klinisch en chemisch een ernstige intrahepatische cholestase.

Op grond van het familiale karakter van de aandoening bij de patiënten 2 en 3, en het feit dat de cholestase hier duidelijk op de voorgrond stond, werd besloten deze patiënten bij elkaar in de groep van patiënten met intrahepatische cholestase e.c.i. onder te brengen.

Resultaten van het onderzoek

IV.1. Inleiding

In dit hoofdstuk worden de resultaten van de galzuurbepalingen in serum, gal en urine bij gezonde personen en patiënten met cirrhose en patiënten met cholestase gepresenteerd. De resultaten van galzuurbepalingen in serum, gal en urine van normale personen werden deels reeds in hoofdstuk III vermeld. Hieruit is duidelijk geworden dat bij normale nuchtere personen de serum concentraties van de individuele galzuren extreem laag zijn. In urine van normale personen konden slechts sporen galzuren aangetoond worden. Bij vergelijken van het galzuurpatroon in de verschillende groepen zullen gegevens over de totale galzuurconcentratie, de afzonderlijke galzuren en over de chol/chen-ratio worden vermeld. Speciaal zal worden gelet op de aanwezigheid van de secundaire galzuren desoxycholzuur en lithocholzuur.

Vele auteurs spreken over monohydroxygalzuren i.p.v. over lithocholzuur, wanneer op het chromatogram een piek gevonden wordt met dezelfde retentietijd als lithocholzuur. In hoofdstuk III is reeds gedemonstreerd, dat met de toegepaste methode lithocholzuur en 3β -hydroxy- Δ 5-choleenzuur dezelfde retentietijd hadden. Men dient daarom wel te bedenken, dat er geen volledige zekerheid kan bestaan over de identiteit van een bepaalde piek, zonder tevens een massaspectrometrisch onderzoek te doen. Dit probleem geldt sterker voor lithocholzuur dan voor de overige di- of trihydroxygalzuren, omdat deze piek zich nu eenmaal bij de bepalingen in serum en urine bijna altijd op het afdalende deel van de piek bevond, die veroorzaakt werd door het oplosmiddel aceton. Wanneer van lithocholzuur gesproken wordt, dan wordt bedoeld monohydroxygalzuur, dat dezelfde retentietijd op de OV-210 stationaire fase heeft als lithocholzuur.

Omdat in de urine van patiënten met cholestase, zelfs van patiënten met een complete extrahepatische obstructie, regelmatig op het chromatogram een piek gevonden werd met dezelfde retentietijd als lithocholzuur, was het van belang een uitgebreider onder-

zoek naar de identiteit hiervan te doen. Daartoe verzochten wij Prof. Dr H. Eyssen van het Rega Instituut van de Katholieke Universiteit te Leuven om nader onderzoek naar de identiteit van deze piek te doen. Deze bevindingen worden beschreven in § IV.5.

Ook zal aandacht besteed worden aan de aanwezigheid van sulfaatveresterde galzuren in gal en urine van patiënten met verschillende leverziekten.

In § IV.4. zal de relatie tussen de jeukscore en het galzuurpatroon tezamen met andere chemische parameters worden besproken en in § IV.5. wordt nagegaan in hoeverre er een verband bestaat tussen het galzuurpatroon en de andere chemische parameters.

De invloed van bepaalde behandelingsmethoden bij cholestase, zoals het toedienen van cholestyramine en drainage van galwegen, op het galzuurpatroon in serum, gal en urine en op de jeuk zal besproken worden in § IV.6. In deze paragraaf worden ook de uitkomsten vermeld van een aantal opeenvolgende bepalingen bij drie patiënten vóór, tijdens en ná drainage van de galwegen. Per groep zullen eveneens de uitkomsten van galzuurbepalingen in gelijktijdig verkregen serum- en galmonsters of serum- en urinemonsters met elkaar vergeleken worden.

IV.2. Resultaten van galzuurbepalingen in serum, gal en urine

IV.2.1. Normale personen

2.1.1. Serum

Galzuurbepalingen werden verricht bij een groep van 15 mannen en 15 vrouwen. De gemiddelde leeftijd was 37,9 jaar (S.D. 14,5). De sgot in deze groep was significant hoger dan de sgpt ($0,001 < P_{\text{tek.}} < 0,005$) hetgeen overeenkomt met de bevindingen van Brandt e.a., (1969). De uitkomsten van de galzuurbepalingen in serum zijn reeds vermeld in Tabel III.4. Hierin worden deze uitkomsten vergeleken met de resultaten van andere onderzoekers, die vergelijkbare technieken gebruikten. In kolom 1 van Tabel IV.1. worden deze gegevens nog eens vermeld samen met de uitkomsten van de leverfunctieproeven.

TABLE IV.1. Results of serum bile acid analyses, liver function tests, pruritus score and duration of illness, studied in the different group of patients.

Group	Cholic acid µg/ml	Chenodeoxy- cholic acid µg/ml	Deoxy- cholic acid µg/ml	Litho- cholic acid µg/ml	Total bile acids µg/ml	CA/CDCA ^{xx} ratio	Bilir. mg/l	Alk.Phosph. U	S ¹ -Nuc1. U	Sgot U/100 ml	Sgpt U/100 ml	Cholest. g/l	Pruri- tus score	Duration of illness months
1. Normal controls (n=30):														
Mean	0.23	0.31	0.13	-	0.7	0.7	6.6	7	5	13	12	2.18	0	-
Range	tr.-1.0	tr.-1.0	tr.-1.0	tr.	0.3-2.3	0.6-1.1	3.8-9.6	3-12	2-9	11-18	7-17	1.54-2.70	0	-
S.E.M. ^x	0.05	0.07	0.06	-	0.21	0.1	0.4	0.4	0.5	0.4	0.6	0.06	-	-
2. Liver cirrhosis (n=18)														
Mean	3.2	9.9	0.4	-	13.6	0.4	23.0	20	22	80	76	2.21	0.2	?
Range	0.2-19.1	1.2-35.7	0.0-1.5	0.0-0.3	1.8-49.9	0.2-0.7	6.0-65.4	7-49	6-36	28-238	18-176	1.42-3.78	0-1	?
S.E.M. ^x	0.62	2.5	0.1	-	3.1	0.04	7.2	5	6	19	15	0.19	-	?
% of total	25.6	66.2	6.6	-	100									
3. Primary biliary cirrhosis (n=19):														
Mean	15.4	8.8	0.3	-	24.5	1.6	25.6	67	150	68	61	3.23	1.0	72.5
Range	0.7-68.0	1.2-27.0	0.0-1.8	0.0-0.4	2.5-92.5	0.6-6.7	5.5-96.4	23-132	31-437	28-204	22-156	1.73-12.30	0-2	12-180
S.E.M. ^x	5.1	2.5	0.1	-	7.0	0.3	6.6	9	32	10	9	0.56	-	11.3
% of total	52.4	43.4	2.9	-	100									
4. Complete extrahepatic obstruction (n=13)														
Mean	55.7	27.2	0.2	-	82.3	2.3	206.2	64	145	91	138	3.71	2.2	2.9
Range	32.0-72.0	16.8-38.8	0.0-0.7	0.0-0.3	58.0-116.2	1.2-3.8	117.6-375.0	20-99	20-998	35-144	63-233	2.01-5.28	1-3	1-6
S.E.M. ^x	5.2	3.3	0.1	-	5.9	0.3	23.8	10	72	15	22	0.55	-	0.6
% of total	66.2	33.3	0.0	-	100									
5. Incomplete extrahepatic obstruction (n=3)														
Mean	16.5	10.7	1.9	-	29.1	1.4	26.2	72	147	142	122	2.31	1.9	12.3
Range	6.7-14.2	6.7-14.2	0.3-5.1	0.0-0.3	13.5-49.1	0.8-2.4	8.0-36.8	57-95	37-212	130-178	46-166	2.00-2.80	1-3	1-24
S.E.M. ^x	9.0	2.3	1.6	-	10.6	0.5	9.2	10	55	18	38	0.25	-	6.6
% of total	51.0	41.2	7.8	-	100									
6. Primary and secondary sclerosing cholangitis (n=6)														
Mean	36.7	22.5	0.3	-	59.5	1.9	106.1	103	255	87	111	3.34	2.1	61.2
Range	2.5-80.0	2.5-46.8	0.0-1.0	tr.	5.5-120.4	1.0-4.7	15.5-211.5	43-207	40-998	53-159	52-170	1.93-6.30	0-3	18-120
S.E.M. ^x	11.1	7.3	0.2	-	17.7	0.6	34.0	12	154	15	32	0.68	-	17.5
% of total	60.3	37.9	1.8	-	100									

^{xx} Cholic acid/chenodeoxycholic acid ratio

^x Standard error of the mean

2.1.2. B-gal

Bij 17 personen uit deze groep, 9 mannen en 8 vrouwen, werden galzuurbepalingen gedaan in B-galmonsters. De gemiddelde leeftijd in deze groep was 32 jaar met een spreiding van 21 tot 61 jaar. De resultaten worden vermeld in kolom 1 van Tabel IV.2. Tussen de chol/chen-ratio in serum en gal bestond geen significant verschil ($P_{tek.} = 100\%$). Hoewel uit de opgegeven getallen zou kunnen blijken, dat cholzuur relatief minder en desoxycholzuur wat meer aanwezig is in serum dan in gal, is het niet goed mogelijk beide percentages met elkaar te vergelijken door de vrij grote bepalingfout in serum binnen het normale gebied.

TABLE IV.2. Results of biliary bile acid analyses (B-bile) in patients with cirrhosis of the liver or P.B.C. and in normal controls.

Group	Cholic acid mg/ml	Chenodeoxy cholic acid mg/ml	Deoxycholic acid mg/ml	Lithocholic acid mg/ml	Total Bile acids mg/ml	CA/CDCA ^{xx} ratio
1. Normal controls (n=17)						
Mean	12.91	13.31	2.92	0.60	29.76	0.98
Range	5.32-33.30	5.00-29.90	0.82-6.87	0.21-1.01	11.77-58.01	0.47-1.90
S.E.M.	1.67	1.38	0.50	0.06	2.85	0.09
% of total	42.0	44.5	11.4	2.0	100	
2. Liver cirrhosis (n=12)						
Mean	2.46	2.54	0.56	0.13	5.69	0.84
Range	0.30-12.99	0.50-8.10	0-3.62	0-0.20	1.27-24.71	0.30-1.60
S.E.M.	0.98	0.57	0.30	0.05	1.86	0.10
% of total	43.0	44.6	9.8	2.4	100	
3. Primary biliary cirrhosis (n=13)						
Mean	8.76	3.30	0.31	0.08	12.45	2.39
Range	0.75-36.20	0.63-13.30	0-2.12	0-0.69	1.58-42.65	0.90-10.50
S.E.M.	2.79	0.99	0.16	0.05	3.47	0.50
% of total	64.8	32.4	2.3	0.06	100	

^x Cholic acid/chenodeoxycholic acid ratio.

Bij drie normale personen werden tevens galzuurbepalingen gedaan in B-galmonsters, waarbij een solvolysestap aan de eigenlijke isolatieprocedure voorafging. Het resultaat was hetzelfde als zonder solvolyse (Tabel IV.3.).

TABLE IV.3. Results of biliary bile acid analyses, with special reference to the sulphated fraction.

	Cholic acid mg/ml	%S ^x	Chenodeoxy cholic acid mg/ml	%S	Deoxycholic acid mg/ml	%S	Lithocholic acid mg/ml	%S	Total bile acids mg/ml	%S
I. Normal controls.										
1	11.25	0	13.50	0	1.32	0	0.62	0	26.69	0
2	13.50	0	17.93	0	1.76	0	0.80	0	33.99	0
3	13.82	0	17.22	0	2.54	0	0.84	0	34.42	0
II. Liver cirrhosis.										
Pat. 4	0.86	0	1.32	0	0.08	0	0.03	0	2.29	0
9	1.55	0	3.02	0	0.00	0	0.11	45	4.68	1.1
11	2.66	0	3.61	0	0.47	0	0.13	0	6.87	0
17	1.60	0	3.20	0	0.68	0	0.19	0	5.67	0
III. Primary biliary cirrhosis										
Pat. 2	5.40	6	3.30	12	0.11	3	0.63	100	9.44	14
8	9.30	0	3.02	0	0.00	0	0.26	58	13.76	1.1
10	13.60	0	4.20	3	0.00	0	0.06	0 ^{xx}	17.86	0.5
11	11.76	0	16.30	0	2.56	0	1.06	19	31.68	0.6
13	0.92	0	1.02	0	0.03	0	0.01	0 ^{xx}	1.98	0
15	7.42	0	2.58	0	0.22	0	0.23	42	10.45	1.0
19	14.96	3	1.79	3	0.25	4	0.12	100	17.20	2.0

^x The percentage of individual bile acids in the sulphated form, as concluded from the fact that a solvolysis step was necessary for their detection.

^{xx} Too small amounts to detect a significant increase after solvolysis.

2.1.3. Urine

De urine werd met én zonder solvolysestap bewerkt voor gas-chromatografische bepaling. In de urine van drie normale personen waren geen galzuren aantoonbaar. In de urine van drie andere normale personen werden kleine piekjes aangetroffen, die wezen op de aanwezigheid van sporen cholzuur en chenodesoxycholzuur. Fig.IV.1. is een voorbeeld van het normale urine-chromatogram, waar de interne standaard 7-ketodesoxycholzuur aan toegevoegd is. Niet alleen bekende galzuurpieken waren afwezig, maar ook onbekende pieken, die op de aanwezigheid van neutrale steroïden zouden kunnen wijzen, welke normaliter in grote hoeveelheden in de 24-uurs urine worden uitgescheiden, ontbraken als gevolg van de gebruikte isolatieprocedure.

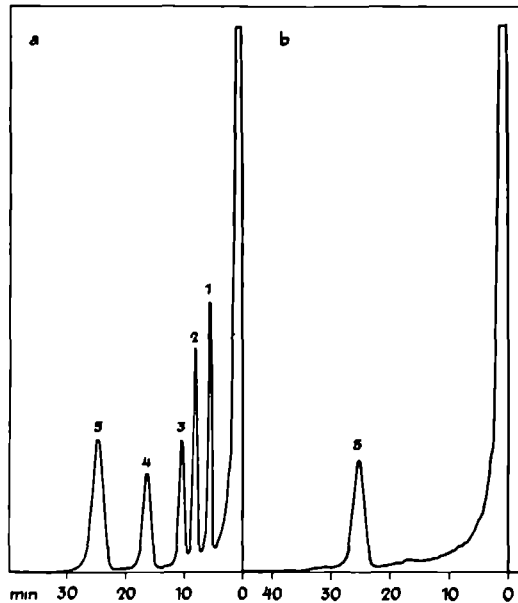


Fig IV 1 a Chromatogram of urine of a normal control subject after adding reference bile acids lithocholic acid(1), deoxycholic acid(2), chenodeoxycholic acid(3), cholic acid(4) and 7 ketodeoxycholic(5) acid as Internal Standard.
b Urine chromatogram of the same person without reference bile acids The Internal Standard is added(5)

IV.2.2. Patiënten met levercirrhose

In kolom 2 van Tabel IV.1. worden de resultaten van galzuurbepalingen bij 18 patiënten samengevat. De gemiddelde leeftijd was 49,5 jaar (S.D. 18,3). De totale galzuurconcentratie lag met gemiddeld 13,5 $\mu\text{g/ml}$ ruim boven de bovengrens van normaal, hetgeen voornamelijk het gevolg was van een sterke toename van het chenodesoxycholzuur. Dit bleek uit de chol/chen-ratio, die gemiddeld slechts 0,4 (S.D. 0,2) was. Deze was significant lager dan normaal ($P_w = 0,01$).

Van de secundaire galzuren was het lithocholzuur meestal niet of slechts in sporen aantoonbaar. De concentratie desoxycholzuur bedroeg gemiddeld 0,4 $\mu\text{g/ml}$ (S.D. 0,5). Bij slechts twee personen (Tabel III.12., patiënt 3 en 6) waren de galzuurconcentraties normaal. Patiënt 3 had een haemochromatose en patiënt 6 een cryptogene cirrhose zonder activiteit. Beide patiënten hadden alleen licht gestoorde transaminasewaarden.

Er waren slechts vier personen met jeuk (+) in deze groep. De galzuurconcentraties waren steeds groter dan 10 $\mu\text{g/ml}$ bij deze patiënten.

6 Patiënten (Tabel III.12., patiënt 2, 4, 8, 11, 14 en 18) hadden tekenen van een hepato-cerebrale intoxicatie op het elektroencefalogram. Het serum galzuurgehalte varieerde bij deze zes patiënten van 11,7 tot 49,9 $\mu\text{g/ml}$ en was gemiddeld 27,4.

Behalve bij de bovengenoemde 18 patiënten uit de gehele groep werd ook het serum galzuurgehalte bepaald bij een patiënt met een cryptogene cirrhose bij wie een goed functionerende porto-cavale shunt aanwezig was. Dit was 74,1 $\mu\text{g/ml}$ met een chol/chen-ratio van 0,4. Behalve een verhoogd bilirubinegehalte van 20,3 mg/l had deze patiënt geen leverfunctiestoornis en ook geen jeukklachten.

2.2.2. B-gal

Bij 12 patiënten uit deze groep werden tegelijk met het afnemen van serum ook B-galmonsters verzameld (Tabel III.12, patiënt 1, 4 en 5, 7 t/m 9, 11 t/m 13, 15, 17 en 18). De resultaten hiervan worden weergegeven in Tabel IV.2. De totale galzuurconcentratie was zeer significant lager dan in de controlegroep ($P_w < 0,01$). De verhouding tussen de verschillende galzuren was ongeveer gelijk aan

die bij de controlegroep. Bij vier patiënten in deze groep (4, 9, 11 en 17) werd tevens een duplo-bepaling verricht waarbij aan de isolatieprocedure een solvolysestap voorafging. Bij slechts één van deze personen werd hierbij een duidelijke stijging van lithocholzuur gevonden (Tabel IV.3). Wanneer men het galzuurpatroon in serum en gal bij de hele groep personen vergelijkt mag, dan valt een relatieve vermindering van het cholzuur en een vermeerdering van het chenodesoxycholzuur in serum op. De chol/chen-ratio was bij alle patiënten in gal hoger dan in serum ($P_{\text{tek.}} = 0,0005$; zie Fig. IV.2^a en 2^b).

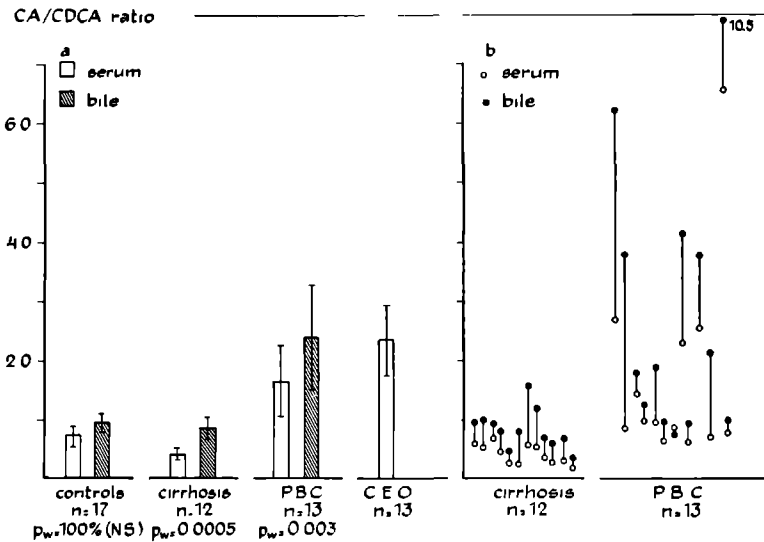


Fig IV 2 a Comparison of the cholic/chenodeoxycholic acid(CA/CDCA) ratio in serum and in bile of normal controls and of patients with cirrhosis of the liver or primary biliary cirrhosis (P B C) The CA/CDCA ratio in serum of patients with complete extrahepatic obstruction (C E O) is presented, too The lines represent mean values \pm 2 S E M

b Comparison of the CA/CDCA ratio in serum and in bile of the individual patients with cirrhosis or P B C The difference is more pronounced in the patients with P B C

2.2.3. Urine

Bij twee patiënten (2 en 14) werd op dezelfde dag als serum werd afgenomen de 24-uurs urine verzameld voor galzuurbepalingen. Beide patiënten hadden ernstige symptomen van een hepato-cerebrale intoxicatie en tevens een fors verhoogde serum bilirubineconcentratie. De resultaten van deze bepalingen met het percentage sulfaatveresterde galzuren worden vermeld in Tabel IV.4.

Fig. IV.3. laat het aanzienlijke verschil zien tussen de bepalingen met en zonder solvolysestap. Het chenodesoxycholzuur, voor het grootste deel aan sulfaat veresterd, is dominant aanwezig. Ook lithocholzuur was, voornamelijk na solvolyse, aantoonbaar.

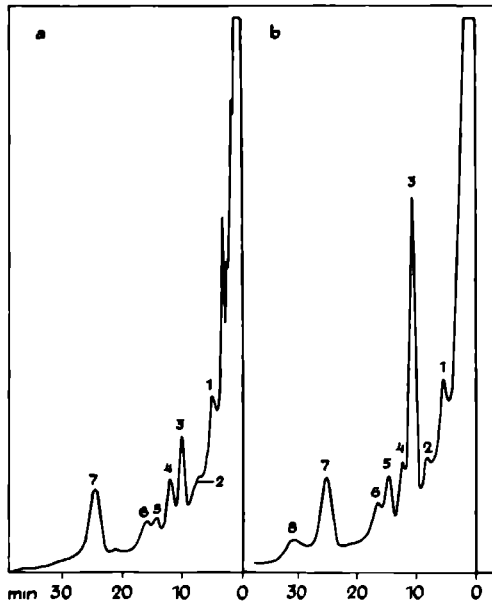


Fig IV 3 Urine chromatogram of a patient with liver cirrhosis(number 14)

a without solvolysis b after solvolysis

Lithocholic acid(1), deoxycholic acid(2), chenodeoxycholic acid(3),
ursodeoxycholic acid(4), hyocholic acid(5), cholic acid(6), 7 keto-
deoxycholic acid(7) as Internal Standard and a 3 keto-dihydroxy
cholanoic acid ? (8)

TABLE IV. 4. Results of urinary bile acid analyses in 24 patients with cholestasis.

Investigated persons	Cholic acid μg/ml	% ^x	Chenodeoxy- cholic acid μg/ml	%	Deoxycholic acid μg/ml	%	Lithocholic acid μg/ml	%	Total bile acids μg/ml	%	Total bile acids mg/24 hr	of total	CA/CDCA-ratio of sulphated fraction	of non sul- phated fraction
I. Liver cirrhosis														
Pat. 2	2.68	0	8.44	62	0.0	0	0.90	80	12.02	60	20.82	0.32	0.00	1.19
Pat. 14	6.00	28	48.50	75	1.77	100	1.74	60	58.11	67	20.21	0.12	0.05	0.36
II. Primary biliary cirrhosis.														
Pat. 1	3.44	52	2.70	83	1.13	70	0.65	100	7.92	69	13.88	1.27	0.80	3.57
Pat. 2	5.79	80	14.78	86	0.43	39	0.41	50	21.41	82	18.91	0.39	0.36	0.54
Pat. 2	2.50	32	3.25	69	0.43	52	0.50	65	6.68	50	9.40	0.77	0.36	1.69
Pat. 4	2.28	24	2.68	76	0.14	7	0.00	0	5.10	51	11.48	0.85	0.25	2.72
Pat. 10	5.57	56	10.89	75	0.29	17	0.53	100	17.28	63	21.42	0.51	0.41	0.69
Pat. 10	5.63	68	14.60	87	0.55	50	0.58	100	21.36	86	34.52	0.39	0.30	0.94
Pat. 11	0.61	10	0.34	35	0.00	0	0.00	0	0.95	18	1.33	1.79	0.50	2.27
Pat. 19	47.52	60	29.50	72	5.58	75	2.00	50	84.60	65	36.46	1.60	1.33	2.33
III. Complete extrahepatic obstruction.														
Pat. 1	35.20	60	55.25	79	0.61	53	0.60	60	91.66	64	45.12	0.64	0.48	1.18
Pat. 8	53.19	58	27.82	58	1.00	46	1.03	80	83.04	59	41.20	1.91	1.73	2.22
Pat. 11	12.50	36	13.84	82	0.35	0	0.42	80	27.11	59	57.00	0.93	0.46	3.16
Pat. 13	25.00	0	24.60	72	0.49	0	0.82	60	50.91	36	32.76	1.01	0.00	3.62
IV. Primary and secondary sclerosing cholangitis.														
Pat. 1	4.46	17	2.45	69	0.34	56	0.00	0	7.25	35	22.61	1.82	0.45	4.94
Pat. 1	8.35	42	5.74	91	0.41	60	0.00	0	14.50	62	26.10	1.45	0.66	9.70
Pat. 1	20.30	28	27.41	61	0.19	0	0.40	100	48.30	46	57.90	0.74	0.34	1.41
Pat. 2	27.10	51	24.22	75	0.87	59	0.65	70	52.84	72	79.80	1.12	0.78	2.10
Pat. 4	3.22	72	6.53	85	0.25	0	0.93	75	12.93	78	17.60	0.37	0.32	0.70
V. Benign recurrent intrahepatic cholestasis.														
Pat. 4	30.0	54	22.40	78	1.13	73	1.63	60	55.17	64	69.00	1.34	0.92	2.82
Pat. 4	2.81	25	0.46	100	1.30	45	0.00	0	4.57	29	4.04	6.10	1.50	>10.0
Pat. 5	30.20	60	26.16	78	2.40	73	1.77	90	60.55	71	60.60	1.15	0.84	2.62
VI. Intrahepatic cholestasis of unknown origin.														
Pat. 1	4.06	45	4.51	81	0.87	72	0.91	75	10.35	73	22.38	0.90	0.50	2.63
Pat. 3	18.21	28	31.50	92	0.96	28	1.26	55	51.93	67	53.00	0.58	0.18	5.43

^x %S: Percentage of sulphated bile acids.

IV.2.3. Patiënten met Primaire Biliaire Cirrhose

2.3.1. Serum

De resultaten van de galzuurbepalingen in serum bij 19 patiënten met een P.B.C. vindt men in kolom 3 van Tabel IV.1. De totale galzuurconcentratie was met een gemiddelde van 24,5 $\mu\text{g/ml}$ (S.D. 25,8) zeer significant hoger dan normaal. De stijging van de serum galzuren was relatief het sterkst voor het cholzuur en de chol/chen-ratio was met een gemiddelde van 1,6 (S.D. 1,5) significant hoger dan bij de normale personen ($P_w = 0,025$). Van de secundaire galzuren was het lithocholzuur niet of slechts in sporen aantoonbaar. Het desoxycholzuur was relatief ook sterk verlaagd.

Wanneer patiënten met een stadium I of II van de P.B.C. met patiënten met stadium III of IV vergeleken worden, dan blijken voor de verschillende galzuren en leverfunctieproeven eigenlijk geen significante verschillen tussen de beide groepen te bestaan. Alleen het serum cholesterolgehalte was meestal in stadium I of II hoger dan in stadium III of IV ($P_w = 0,053$). In dit verband is het ook interessant om de chol/chen-ratio tussen de beide groepen te vergelijken. Drie van de negen patiënten met stadium I of II hadden een chol/chen-ratio die kleiner was dan 1,0. Deze drie patiënten bevonden zich allen in stadium I. Anderzijds hadden drie van de tien patiënten met een stadium III of IV een chol/chen-ratio die groter was dan 1,0 (Fig. IV.4.). Het verschil tussen de beide groepen was echter niet significant ($0,05 < P_w < 0,10$).

In Tabel IV.5. zijn de rangcorrelatiecoëfficiënten vermeld van de verschillende parameters in deze groep. Er was een zeer duidelijke en significante correlatie tussen de totale serum galzuurconcentratie en de serum cholzuurconcentratie enerzijds en het bilirubinegehalte anderzijds. Ook bestond er een redelijke significantie correlatie tussen de totale serum galzuurconcentratie en de alkalische fosfatase-activiteit en de sgot. Het serum cholzuur had in deze groep nog de beste correlaties. Opvallend was de uitstekende correlatie tussen het bilirubinegehalte en de sgot. Er bestond een matige correlatie tussen de galzuren en de 5'-nucleotidase-activiteit. De correlatie tussen de serum galzuurconcentraties, het bilirubinegehalte, de alkalische fosfatase en 5'-nucleotidase-ac-

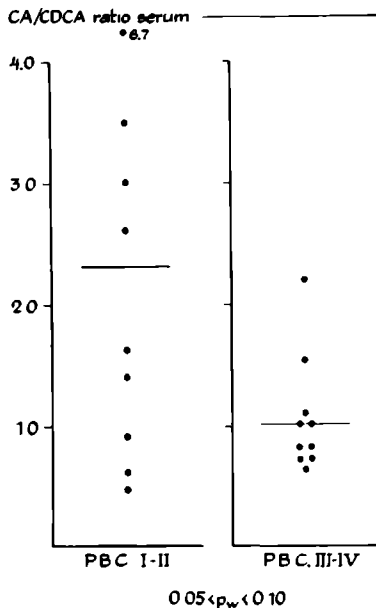


Fig IV 4 Comparison of the cholic / chenodeoxycholic acid(CA/CDCA) ratio in serum of patients with primary biliary cirrhosis(P B C), stage I-II and of those with P B C ,stage III-IV The lines represent mean values

tiviteit enerzijds en de jeukscore anderzijds waren ongeveer gelijk en significant, terwijl de sgot nog iets beter dan de galzuren met de jeuk correleerde.

In het algemeen kan gesteld worden, dat de patiënten zonder jeuk altijd een serum galzuurconcentratie hadden beneden 15 $\mu\text{g/ml}$. De patiënten met jeuk hadden altijd een serum concentratie boven de 7,5 $\mu\text{g/ml}$. Verder bestond er een duidelijke tendens tot meer jeuk bij patiënten met hogere galzuurconcentraties.

Er was geen duidelijke correlatie tussen de ziekteduur en het galzuurpatroon in serum.

2.3.2. B-gal

Bij 13 patiënten in deze groep werden galmonsters verzameld tegelijk met het afnemen van het serummonster. Het betrof de pa-

TABLE IV.5. Rank correlation coefficients (r_s) of the different parameters in 19 patients with P.B.C.

	Serum cholic acid	Serum chenodeoxycholic acid	Total bile acid conc.	CA/CDCA ratio	Bilir.	Alk.Phosph.	S'-Nucl.	Sgot	Cholesterol	Pruritus score	Duration of illness
Serum cholic acid	-	0.91 ^x	0.98 ^x	0.61 ^x	0.82 ^x	0.63 ^x	0.43	0.72 ^x	0.48	0.70 ^x	0.36
Serum chenodeoxycholic acid	0.91 ^x	-	0.95 ^x	0.30	0.72 ^x	0.55	0.39	0.62 ^x	0.36	0.63 ^x	0.26
Total bile acid conc.	0.98 ^x	0.95 ^x	-	0.51	0.81 ^x	0.61 ^x	0.40	0.68 ^x	0.46	0.66 ^x	0.34
CA/CDCA ratio	0.61 ^x	0.30	0.51	-	0.49	0.38	0.29	0.46	0.41	0.52	0.31
Bilir.	0.82 ^x	0.72 ^x	0.81 ^x	0.49	-	0.59	0.35	0.90 ^x	0.38	0.69 ^x	0.16
Alk.phosph.	0.63 ^x	0.55	0.61 ^x	0.38	0.59	-	0.74 ^x	0.59	0.39	0.74 ^x	0.04
S'-Nucl.	0.43	0.39	0.40	0.29	0.35	0.74 ^x	-	0.56	0.38	0.73 ^x	0.30
Sgot	0.72 ^x	0.62 ^x	0.68 ^x	0.46	0.90 ^x	0.59	0.56	-	0.32	0.75 ^x	0.32
Cholesterol	0.48	0.36	0.46	0.41	0.38	0.39	0.38	0.32	-	0.58	0.16
Pruritus score	0.70 ^x	0.63 ^x	0.66 ^x	0.52	0.69 ^x	0.74 ^x	0.73 ^x	0.75 ^x	0.58	-	0.25
Duration of illness	0.36	0.26	0.34	0.31	0.16	0.04	0.30	0.32	0.16	0.25	-

^x) These figures represent $P_s \leq 0.01$.

tiënten 2 t/m 4, 6, 8 t/m 13, 15, 16 en 19 (Tabel III.10). Bij 9 patiënten werd B-gal verkregen. Eén patiënt had galstenen en een niet functionerende galblaas (patiënt 6), drie patiënten (3, 13 en 15) hadden een cholecystectomie ondergaan, zodat het onmogelijk was bij deze vier patiënten geconcentreerde B-gal te verzamelen. De resultaten zijn samengevat in kolom 3 van Tabel IV.2. De totale galzuurconcentratie was duidelijk lager dan in de controlegroep. Voor elk van de galzuren behalve het cholzuur was het verschil met de controlegroep zeer significant ($P_w < 0,0001$). Voor het cholzuur was het verschil juist niet significant ($P_w = 0,052$). Ook was er een tendens tot lagere galzuurconcentraties bij patiënten die in stadium III of IV verkeerden. De chol/chen-ratio was in de gehele groep significant hoger dan in de controlegroep ($P_w = 0,008$). De chol/chen-ratio in deze groep was bij iedere individuele patiënt, op één uitzondering na, hoger in gal dan in serum ($P_{tek.} = 0,003$; Fig. IV.2^a en 2^b).

De concentratie secundaire galzuren was significant lager dan in de controlegroep ($P_w < 0,01$). Bij zeven patiënten (patiënt 2, 8, 10, 11, 13, 15 en 19) werd de bepaling in gal overgedaan nadat eerst een solvolysestap was ingelast. Hierbij werden voornamelijk voor lithocholzuur hogere waarden gevonden dan tevoren (Tabel IV.3.).

2.3.3. Urine

Bij zes patiënten werd in totaal 8 keer de 24-uurs urine verzameld voor galzuurbepalingen (Tabel IV.4, kolom 2). Naarmate de serum concentratie aan galzuren hoger was, werden er meer galzuren in de urine uitgescheiden ($r_s = 0,90$; $P_s < 0,01$). In Tabel IV.4. is tevens het percentage sulfaatveresterde galzuren opgegeven. Dit was op één geval na, 50% of meer en maximaal 85% van de totale concentratie. Vooral chenodesoxycholzuur werd in de hoogste concentratie in sulfaatveresterde vorm in de urine uitgescheiden.

De chol/chen-ratio was bij alle patiënten duidelijk minder dan in serum. Wanneer men de totale chol/chen-ratio vergelijkt met die van aan sulfaatveresterde galzuren, dan blijkt de laatste in alle gevallen duidelijk kleiner te zijn. Slechts in één geval (pat. 19) was deze groter dan 1,0. De totale chol/chen-ratio was slechts 3

keer groter dan 1,0. Bij al deze patiënten was de chol/chen-ratio echter in serum groter dan 1,2.

Fig. IV.5. laat een voorbeeld zien van het urinechromatogram van patiënt 19. Bij de meeste patiënten was ook lithocholzuur duidelijk aantoonbaar. Patiënt 11 had ten tijde van het verzamelen van de 24-uurs urine een serum concentratie aan galzuren, die hoog normaal was (2,6 $\mu\text{g/ml}$). Desondanks werd 0,95 mg/1 (1,33 mg/24 uur) in de urine uitgescheiden. Dit wijst erop, dat deze serum concentratie dicht bij de drempelwaarde ligt, waarboven galzuren na filtratie in de glomeruli niet meer volledig teruggeresorbeerd worden in de tubuli. Voordat men hier conclusies aan zou willen verbinden, dient men echter gegevens te hebben omtrent de grootte van de aan sulfaatveresterde fractie galzuren, aangezien deze immers een duidelijk betere renale klaring ondergaat dan de niet gesulfateerde fractie. Ook dient men gegevens te hebben over de variaties in de serum galzuurconcentratie gedurende de hele 24-uurs periode, aangezien deze wel eens aanzienlijk zou kunnen zijn.

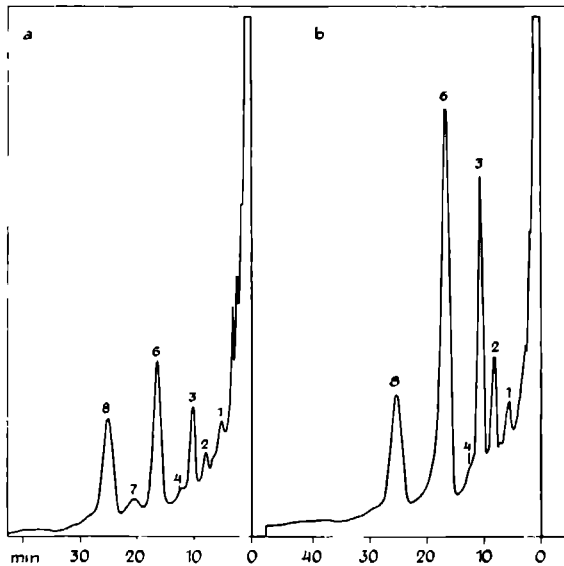


Fig IV 5 Urine chromatogram of a patient with primary biliary cirrhosis (number 19) a without solvolysis b after solvolysis
Lithocholic acid(1), deoxycholic acid(2), chenodeoxycholic acid(3), ursodeoxycholic acid(4), cholic acid(6), unknown peak(7) and 7-ketodeoxycholic acid(8) as Internal Standard

IV.2.4. Patiënten met een complete extrahepatische obstructie

2.4.1. Serum

Dij 13 patiënten werden galzuurbepalingen in serum gedaan op een moment, dat de patiënten blijkens de uitscheiding van urobilino-geen in de urine en feces 1 tot 3 weken een volledige obstructie van de galafvoer naar de darm hadden. De totale galzuurconcentratie was met 82,3 µg/ml (S.D. 21,2) zeer hoog (Tabel IV.1, kolom 4). Deze stijging was voor cholzuur relatief het grootst.

Van de secundaire galzuren was het lithocholzuur bij 10 van de 13 patiënten niet aantoonbaar, terwijl het desoxycholzuur bij 4 patiënten in sporen werd teruggevonden. Er was een zeer duidelijke correlatie tussen de aan- of afwezigheid van lithocholzuur en desoxycholzuur bij deze patiënten ($r_s = 0,89$, $P_s < 0,01$). De chol/chen-ratio was, op één patiënt na, altijd groter dan 1,2 en gemiddeld 2,3 (S.D. 1,2). De patiënt met een lagere ratio (pat. 2) had waarschijnlijk een secundaire biliaire cirrhose.

Het serum bilirubinegehalte was in deze groep met een gemiddelde van 206,3 mg/l ($\pm 86,0$) zeer hoog. Er viel echter geen significante correlatie te ontdekken tussen het totale serum galzuur-gehalte en het serum bilirubinegehalte. Het was zelfs zo, dat bij de hogere bilirubinespiegels de tendens bestond tot lagere galzuurconcentraties dan gemiddeld bij deze groep patiënten werd gevonden ($r_s = -0,24$; Fig. IV.6). In Tabel IV.6. worden de verschillende rangcorrelatie-coëfficiënten uit deze groep vermeld. Er was slechts een aanwijzing voor een correlatie tussen de totale serum galzuurconcentratie en de ziekteduur. Een redelijke correlatie bestond er tussen de alkalische fosfatase-, de 5'-nucleotidase-activiteit, de sgot en het cholesterolgehalte. Opvallend was de goede correlatie tussen de sgot en de 5'-nucleotidase-activiteit, terwijl ook een duidelijke correlatie tussen de ziekteduur en de 5'-nucleotidase-activiteit aanwezig was in deze groep.

Voor wat de jeuk betreft kan gesteld worden, dat er geen correlatie bestond tussen de serum galzuren of één der andere parameters en de jeukscore in deze groep. Anderzijds kan gesteld worden dat alle patiënten in deze groep lichte tot ernstige jeuk hadden (+ tot +++). Alle patiënten hadden een serum galzuurspiegel boven

TABLE IV.6. Rank correlation coefficients of the different parameters in 13 patients with complete extrahepatic obstruction

	Serum cholic acid	Serum chenodeoxycholic acid	Total bile acid conc.	CA/CDCA ratio	Bilir.	Alk.Phosph.	5'-Nucl.	Sgot	Cholesterol	Pruritus score	Duration of illness
Serum cholic acid	-	-0.11	0.85 ^x	0.63	-0.39	0.11	0.29	0.04	0.26	0.10	0.19
Serum chenodeoxycholic acid	-0.11	-	0.30	-0.75 ^x	-0.06	0.28	0.25	0.15	-0.06	0.09	0.19
Total bile acid conc.	0.85 ^x	0.30	-	0.23	-0.24	0.34	0.50	0.20	0.28	0.12	0.49
CA/CDCA-ratio	0.63	-0.75 ^x	0.23	-	-0.17	-0.19	-0.02	-0.07	-0.03	0.06	-0.04
Bilir.	-0.39	-0.06	-0.24	-0.17	-	-0.28	0.06	0.14	-0.37	0.35	0.13
Alk.phosph.	0.11	0.28	0.34	-0.19	-0.28	-	0.77 ^x	0.62	0.60	0.06	0.51
5'-Nucl.	0.29	0.25	0.50	-0.02	0.06	0.77 ^x	-	0.85 ^x	0.51	0.27	0.58
Sgot	0.04	0.15	0.20	-0.07	0.14	0.62	0.85 ^x	-	0.44	0.14	0.31
Cholesterol	0.26	-0.06	0.28	-0.03	-0.37	0.60	0.51	0.44	-	0.07	0.39
Pruritus score	0.10	0.09	0.12	0.06	0.35	0.06	0.27	0.14	0.33	-	0.16
Duration of illness	0.19	0.19	0.49	-0.04	0.13	0.51	0.58	0.31	0.39	0.16	-

x) These figures represent $p \leq 0.01$

de 58,0 $\mu\text{g/ml}$. De mate van jeuk was echter niet afhankelijk van de hoogte van de galzuurspiegel, zodat een significante correlatie tussen de jeukscore en het serum galzuurpatroon ook niet gevonden werd.

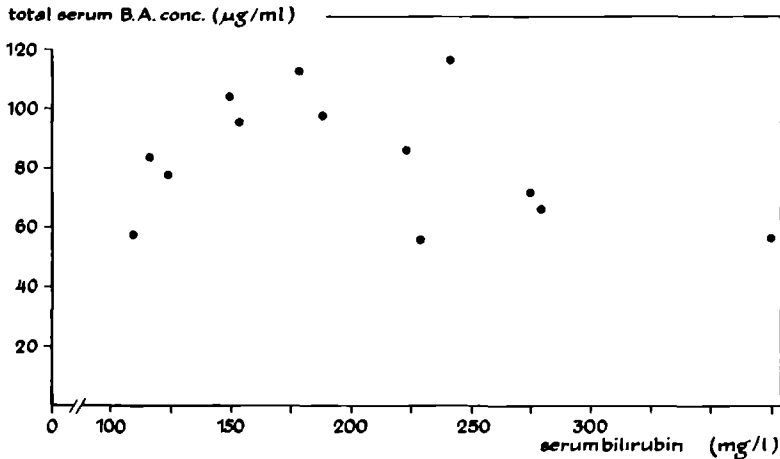


Fig IV.6. In the group with complete extrahepatic obstruction no correlation is present between the total serum bile acid(B.A.) concentration and the serum bilirubin level($n=13$; $r_s = -0.24$)

2.4.2. Urine

4 Patiënten in deze groep werden onderzocht (Tabel IV.4, kolom 3). In deze groep werden de grootste hoeveelheden galzuren in de urine teruggevonden. Deze varieerden van 31,41 tot 57,00 mg/24 uur. Fig. IV.7. laat een voorbeeld zien van het urinechromatogram van patiënt 1.

36 - 64% van de totale galzuurconcentratie werd als sulfaat-ester uitgescheiden. Ook hier werd weer een overmaat chenodesoxy-cholzuur, voornamelijk als sulfaat-ester teruggevonden (gemiddeld 74%). De chol/chen-ratio van de sulfaat-ester-frac-tie was steeds kleiner dan de totale ratio. De chol/chen-ratio in de urine was ook kleiner dan de chol/chen-ratio in serum voor elke patiënt van deze kleine groep.

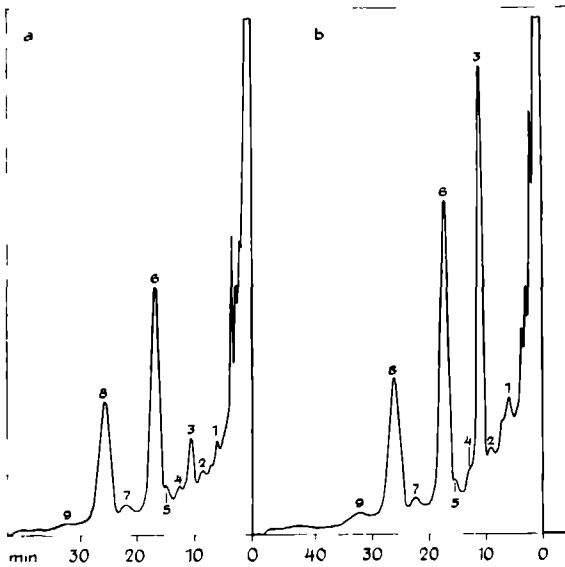


Fig IV 7 Urine chromatogram of a patient with complete extrahepatic obstruction (number 7) a without solvolysis b after solvolysis
 Lithocholic acid(1), deoxycholic acid(2), chenodeoxycholic acid(3), ursodeoxycholic acid(4), hyocholic acid(5) cholic acid(6), unknown peak(7), 7 ketodeoxycholic acid(8) as Internal Standard and a 3 keto-dihydroxy-cholanoic acid ? (9)

Lithocholzuur was bijna steeds aantoonbaar en varieerde van 0,7 tot 7,4% van het totaal. Opvallend was, dat ook het secundaire galzuur desoxycholzuur in de urine aantoonbaar was. De hoeveelheid was echter steeds minder dan 1,6% van het totaal.

IV.2.5. Patiënten met een incomplete extrahepatische obstructie

2.5.1. Serum

Deze groep bestond uit slechts drie personen. De resultaten zijn vermeld in kolom 5 van Tabel IV.1. Er was een duidelijke verhoging van de totale serum galzuurconcentratie. Opvallend was, dat het secundaire galzuur desoxycholzuur gemiddeld 7,8% van het totaal uitmaakte. Het was bij alle drie patiënten aantoonbaar. Allen had-

den min of meer ernstige jeuk. De totale galzuurconcentratie lag steeds boven de 13,5 $\mu\text{g/ml}$.

IV.2.6. Patiënten met een primaire en een secundaire scleroserende colangitis

2.6.1. Serum

Vier patiënten met een primaire scleroserende cholangitis en twee met secundaire scleroserende cholangitis werden onderzocht. De totale galzuurconcentratie was hier met uitzondering van patiënt 4 (5,5 $\mu\text{g/ml}$) steeds sterk verhoogd (kolom 6 van Tabel IV.1.). De patiënten 4 en 5 hadden een secundaire scleroserende cholangitis (Tabel III.15). In alle gevallen, behalve bij patiënt 4, was de chol/chen-ratio groter dan 1,2. Behalve patiënt 4 hadden alle patiënten ernstige jeuk (++ tot +++).

Secundaire galzuren waren niet aantoonbaar bij de patiënten 2, 5 en 6 en slechts in sporen aanwezig bij de patiënten 1 en 3, terwijl het desoxycholzuur bij patiënt 4 ongeveer 8% van het totaal bedroeg.

De patiënten 1, 2, 5 en 6 hadden een sterk verhoogd serum cholesterolgehalte. Bij de patiënten 3 en 4, die een normaal cholesterolgehalte hadden, bestond reeds een secundaire biliaire cirrhose. De patiënten 2 en 6 hadden ten tijde van het onderzoek een complete obstructie van de galafvloed naar de darm (Tabel III.15.). De ziekteduur van deze groep varieerde van 1 tot 10 jaar.

2.6.2. Urine

Van drie patiënten werd in totaal 5 keer de urine verzameld voor galzuurbepalingen (Tabel IV.4., kolom 4). Patiënte 2 had ten tijde van het onderzoek een complete obstructie en zij had dan ook de hoogste excretie van galzuren in de urine (79,80 mg/24 uur).

Ook hier bestond weer een duidelijke voorkeur om chenodesoxycholzuur in sulfaatveresterde vorm uit te scheiden (gemiddeld 76% van de totale hoeveelheid chenodesoxycholzuur). De totale chol/chen-ratio was steeds hoger dan de chol/chen-ratio van de sulfaatveresterde fractie. Deze laatste was altijd minder dan 0,80. Lithocholzuur werd drie keer in verhoogde concentratie teruggevonden. Desoxycholzuur was drie maal meer dan 1,6% van het totaal. Bij patiënte 2 was deze echter minder dan 1,6% van het totaal. Deze patiënte had

ook een complete extrahepatische obstructie.

2.6.3. Ziektegeschiedenis van patiënt 1 met gegevens over opeenvolgende bepalingen van galzuren

Deze man, geboren in 1929, had sedert 1962 klachten over in aanvallen optredende pijnen in de rechter bovenbuik. In februari 1971 had patiënt een koliekpijn gehad, waarbij hij ook licht icterisch geweest was. De diagnose cholelithiasis werd vermoed. In augustus 1971 werd elders een cholecystectomie verricht. Postoperatief werd patiënt in 4 tot 6 weken tijd icterisch en tevens was er sprake van ernstige jeuk. In oktober 1971 werd hij overgeplaatst naar het Gemeente Ziekenhuis te Arnhem. Patiënt was toen duidelijk icterisch, er waren geen spider naevi of erythema palmare. De ontlasting had een normale kleur. Er was geen temperatuursverhoging. De rechter leverrand was met een glad oppervlak even palpabel, de milt was niet palpabel. Het bilirubinegehalte bedroeg 86,4 mg/l, waarvan 64,8 mg/l geconjugeerd was. De sgot was 53 E, de sgpt 71E, de alkalische fosfatase- 27 E en de 5'-nucleotidase-activiteit 39 E. Het cholesterolgehalte was 3,11 g/l. De feces werden gedurende 3 dagen verzameld ter bepaling van de urobilinogeen uitscheiding. Deze bedroeg 44 mg/dag. In de urine was zowel urobiline als bilirubine aanwezig. Bij opname werd een behandeling met 20 g cholestyramine per dag begonnen. Op 22 november 1971 vond een relaparotomie plaats, omdat een proces aan de extrahepatische galwegen niet kon worden uitgesloten. Er werd een fibrotische ductus choledochus vastgesteld en bij choledochotomie werd een langgerekte stenose gevonden. Na oprekken werd een T-drain in de ductus choledochus geplaatst met één "been" in de rechter ductus hepaticus. Er bleek geen ruimte te zijn om een drain in de linker ductus hepaticus te plaatsen. Nadat patiënt postoperatief eerst een cholangitis had doorgemaakt, verdween daarna de jeuk en nam de icterus duidelijk af. De histologische beoordeling van de wigexcisie uit de rechter leverkwab luidde: "Ernstige cholestase, waarschijnlijk van extrahepatische oorsprong. Er zijn nog geen tekenen van een secundaire biliare cirrhose." Op grond van de kliniek en de bevindingen bij de operatie werd de diagnose hier gesteld op primaire scleroserende cholangitis. Gedurende de prae- en postoperatieve fase

werden opeenvolgende galzuurbepalingen gedaan in serum, in draingal en in urine van de patiënt. De resultaten hiervan zijn samengevat in Fig. IV.8. Duidelijk is het effect van cholestyramine op de serum galzuurconcentratie te zien, terwijl in tweede instantie door de T-buis-drainage de serum galzuurconcentratie verder daalt. Dit gaat gepaard met een vermindering en later een verdwijning van de jeuk. Aan de uitscheiding van urobilinogeen in de feces is te zien, dat er een flinke hoeveelheid gal bij deze patiënt in de darm moet zijn terecht gekomen tijdens de T-buis-drainage. Vóór de operatie werd er duidelijk minder urobilinogeen in de ontlasting uitgescheiden. Verder is te zien dat direct postoperatief nogal geconcentreerde gal wordt geproduceerd en dat na ongeveer 6 dagen een "steady state" wordt bereikt, waarbij de hoeveelheid galzuur per ml draingal constant blijft. Dat er bij deze patiënt galafvloed naar de darm plaatsvond, wordt ook gestaafd door het feit, dat secundaire galzuren in de draingal verschijnen. Na toediening van cholestyramine en tijdens de T-buis-drainge is de uitscheiding van galzuren via de urine duidelijk verminderd. De sulfaatveresterde fractie galzuren in de urine maakt 30-50% van het totaal uit. Na het afsluiten van de galdrain ziet men de serum galzuurconcentratie, het bilirubinegehalte en de alkalische fosfatase-activiteit weer duidelijk toenemen, terwijl ook de uitscheiding van urobilinogeen in de feces daalt. Dit laatste kan verklaard worden uit een verminderde galafvloed naar de darm door de vernauwing in de ductus choledochus.

IV.2.7. Patiënten met een benigne intermitterende intrahepatische cholestase

2.7.1. Serum

De resultaten van galzuurbepalingen bij drie van de vijf patiënten zijn vermeld in Tabel IV.7. De patiënten 4 en 5 worden in een aparte paragraaf (§ IV.2.7.3.) besproken, omdat bij deze twee patiënten opeenvolgende bepalingen gedurende langere tijd mogelijk waren. Bij patiënt 1 werd drie maal een bepaling in serum gedaan, éénmaal (2-3-73) tijdens een normale periode en twee maal op het eind van een periode met cholestase waarbij de serum galzuurconcent-

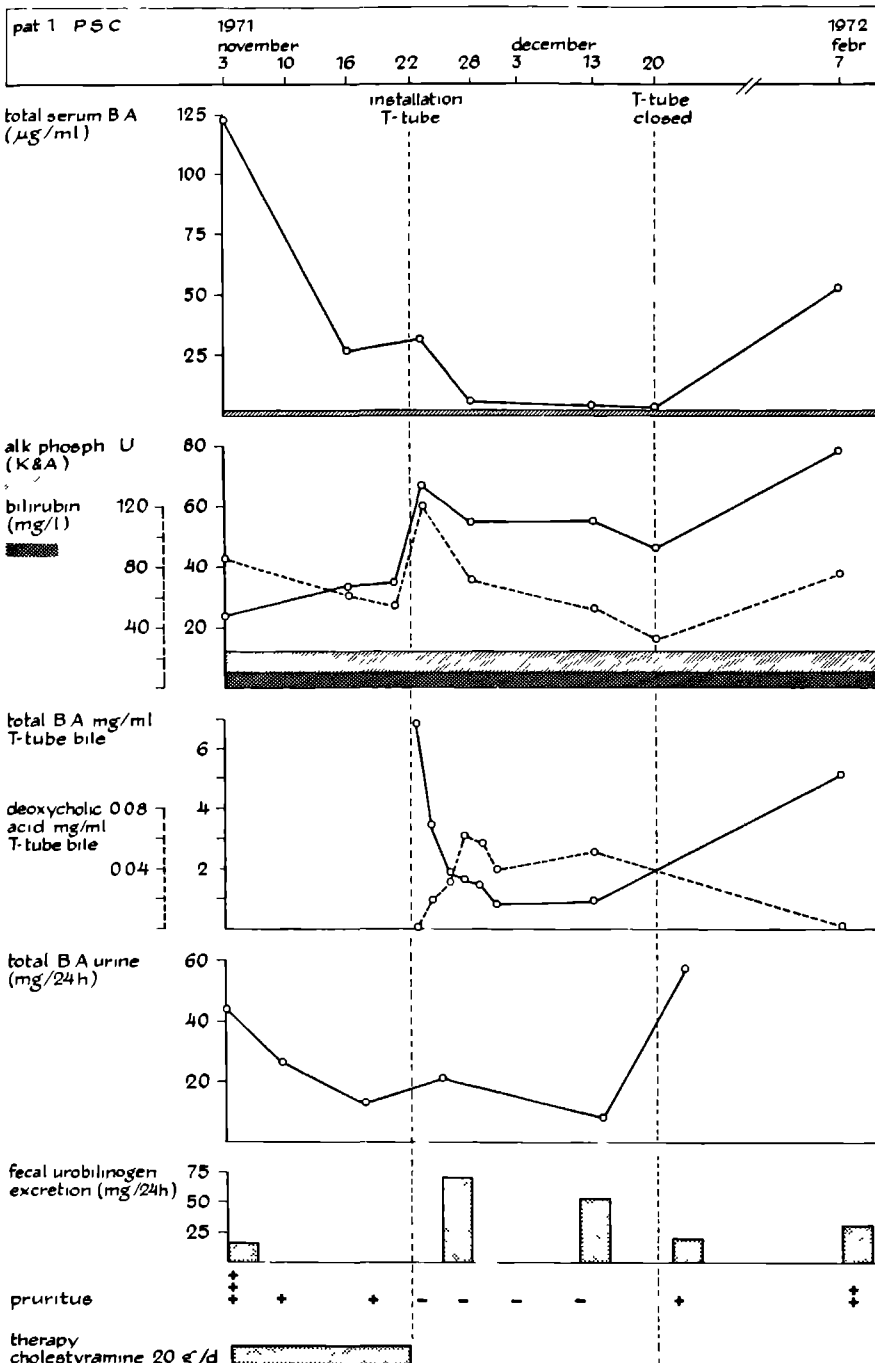


Fig IV B Follow up analyses of bile acids(B A) in serum, T-drain bile and urine of patient I with primary sclerosing cholangitis

Treatment with both cholestyramine and biliary drainage have a favourable effect on the symptoms of cholestasis. After closing the bile drain cholestasis increases clearly.

TABLE IV.7. Results of bile acid analyses in serum and bile of 3 patients with benign recurrent intrahepatic cholestasis before and during cholestasis

Patient number	Cholic acid	Chenodeoxy cholic acid	Deoxy cholic acid	Litho- cholic acid	Total bile acids	CA/DDCA ratio	Bilir. mg/l	Alk.Phosph. U	5 ¹ -Nucl. U	Sgot U/100 ml	Sgpt U/100 ml	Cholest. g/l	Pruritus score	Duration of illness months
A. Serum bile acids ($\mu\text{g/ml}$)														
1. 30-10-70	6.3	3.2	0.0	0.0	9.5	2.0	33.0	38	-	60	61	5.32	2	16
2-12-72	1.9	2.2	2.5	0.0	6.6	0.9	17.6	20	39	40	42	2.03	1	12
2- 3-73	1.0	0.9	0.4	0.0	2.3	1.1	8.9	12	-	-	-	-	0	0
2. 2-12-72	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	-	9.3	8	5	18	23	1.93	0	0
3. 30-10-70	0.0	0.3	0.0	0.0	0.3	-	3.9	13	-	14	13	-	0	0
9-12-72	0.4	0.7	0.0	0.0	1.1	0.6	4.2	9	5	19	26	-	0	0
B. Biliary bile acids (mg/ml)														
1. 30-10-70 ^x	0.12	0.03	0.00	0.00	0.15	3.60								
2-12-72	4.22	1.93	1.76	0.00	7.91	2.20								
2. 2-12-72	32.00	15.45	2.10	0.25	49.80	2.14								
3. 30-10-70 ^x	5.88	3.78	0.76	0.09	10.51	1.59								
2-12-72	16.19	10.97	1.26	0.14	28.56	1.48								

^x Stimulation with olive-oil instead of cholecystokinin.

tratie nog duidelijk verhoogd was en ook nachtelijk jeuk aanwezig was. Op 2-12-72 was het desoxycholzuur met 2,5 $\mu\text{g/ml}$ weer duidelijk aanwezig in het serum, hetgeen op een vermindering van de cholestase wees. Patiënt 2 werd éénmaal en patiënte 3 tweemaal in een normale periode gecontroleerd. De serum galzuurspiegels waren hierbij normaal.

2.7.2. B-gal

De resultaten van deze bepaling worden ook vermeld in Tabel IV.7. De totale galzuurconcentratie in gal was bij patiënte 1, die bovendien een cholecystectomie had ondergaan, laag. De chol/chen-ratio lag bij beide bepalingen duidelijk hoger in gal dan in serum. In de B-gal van patiënt 2 was de galzuurconcentratie met 49,80 mg/ml normaal. Evenals bij patiënte 1 werd ook bij patiënte 3 tweemaal een galzuurbepaling in gal gedaan, beide keren bij afwezigheid van cholestase. Hierbij kwamen geen verrassende bevindingen naar voren. Wel is het uit de tabel duidelijk dat de concentratie aan galzuren in de gal na stimulatie met olie veel geringer is dan na stimulatie met cholecystokinine.

2.7.3. Opeenvolgende bepalingen bij patiënte 4 en patiënt 5

Patiënte 4 (geboren in 1966): Vanaf oktober 1970 tot en met maart 1974 werden een groot aantal galzuurbepalingen in serum bij patiënte 4 gedaan. De resultaten hiervan zijn samengevat in Tabel IV.8. Gedurende deze periode werden ook enige bepalingen gedaan tijdens een normale fase. Toen werden geen afwijkingen vastgesteld in het galzuurpatroon. De verhoging van de alkalische fosfatase-activiteit tijdens een normale fase is het gevolg van het feit dat patiënte nog in de groeifase verkeert. Tevens werden een aantal bepalingen gedaan gedurende 3 kortdurende perioden van cholestase. Deze werden altijd ingeluid met nachtelijke jeuk en krabben. Een cholestase-periode duurde niet langer dan 6 weken. Verrassend was dat in de eerste dagen van een dergelijke periode steeds extreem hoge serum galzuurconcentraties werden gevonden, waarbij het cholzuur duidelijk dominant aanwezig was. Dit was des te meer opvallend, omdat in deze fase het serum bilirubinegehalte nog normaal was en alleen de serum alkalische fosfatase-activiteit verhoogd aanwezig was. Wanneer men de gevonden concentraties omrekent en de totale

TABLE IV. 8. Results of follow up bile acid analyses in bile and urine of patient 4 with benign recurrent intrahepatic cholestasis.

Date	1970	1972	1973		1974											
	30-10	2-12	2-3	2-4	18-6	23-8	1-1	8-2	15-2	19-2	26-2	1-3	7-3	13-3	16-3	22-3
A. Serum bile acids ($\mu\text{g/ml}$)																
Cholic acid	1.7	0.4	207.9	4.5	1.0	186.0	1.5	150.0	64.9	44.5	74.3	112.0	24.6	0.6	0.6	0.6
Chenodeoxycholic acid	0.9	0.5	69.4	2.6	1.5	72.2	2.0	47.5	30.4	24.0	26.0	26.8	13.5	0.9	0.0	0.7
Deoxycholic acid	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0	0.0	0.7	0.4	0.4	1.7	2.5	2.2	3.0	2.1	0.8	0.3
Lithocholic acid	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	0.3	1.3	0.9	1.3	1.9	1.7	0.7	0.7	0.0	0.5
Total bile acids	2.6	0.9	277.3	9.0	2.5	261.0	4.5	199.2	96.6	71.5	104.7	142.7	41.8	4.3	1.4	2.1
CA/CDCA-ratio	1.9	0.7	3.0	1.8	0.7	2.6	0.8	3.2	2.1	1.9	2.9	4.2	1.8	1.5	-	0.9
Bilirubin mg/l	8.0	3.1	7.0	4.3	8.0	8.2	7.3	11.3	-	-	6.0	-	N	N	N	N
Alk.Phosph. U	19	18	67	31	17	83	24	66	-	60	75	-	73	32	24	18
Pruritus score	0	0	3	0	0	3	1	3	2	2	3	3	2	0	0	0
Duration of illness(days) ^{xx}	N	N	3	3	N	3	?	2	10	14	21	25	31	37	N	N
B. Urinary bile acids(mg/24 hrs)																
Cholic acid			37.6	2.3			29.2	13.4	10.9	32.3	26.3	11.5	2.3	1.9	0.5	
% S ^x			54	25			16	10	50	67	28	36	0	0	0	
Chenodeoxycholic acid			28.0	0.3			18.7	8.0	7.3	14.7	17.5	6.0	0.0	0.0	0.4	
% S ^x			78	100			63	58	81	92	65	56	0	0	0	
Deoxycholic acid			1.8	0.9			0.9	0.5	2.6	4.6	6.5	2.7	1.2	0.8	0.0	
% S ^x			73	45			45	100	47	63	74	47	32	100	0	
Lithocholic acid			1.6	0.5			1.6	0.8	0.4	1.6	1.3	0.8	0.3	0.3	0.0	
% S ^x			52	0			82	100	100	82	64	100	100	100	0	
Total bile acids			69.0	4.0			50.4	22.7	21.2	53.2	51.6	21.0	3.8	3.0	0.9	
CA/CDCA-ratio			1.4	-			1.6	1.7	1.4	2.2	1.4	1.8	-	-	1.3	

^x%S = Calculated as in Table IV.3.

^{xx}N = Normal value or normal period.

galzuurpool bij deze 8-jarige op 0,5 - 1,0 g schat, dan betekent dit dat zich ongeveer 50% van de pool aan galzuren in de algemene circulatie heeft bevonden, aangenomen dat de totale poolgrootte onveranderd is gebleven. Tevens is te zien, dat de uitscheiding van galzuren in de urine goed correleert met de hoogte van de serum galzuurconcentratie. De bevindingen bij deze patiënte werden uitvoeriger elders beschreven (van Berge Henegouwen e.a., 1974^d).

Patiënt 5 (Fig. IV.9.): Deze patiënt, een student van 20 jaar, werd door ons geobserveerd tijdens het herstel van een cholestatische fase. Hij had reeds tweemaal eerder zulk een periode doorgemaakt. De diagnose werd bij hem per exclusionum gesteld. Leverbiopten in een normale periode en tijdens cholestase brachten geen leverbeschadiging aan het licht, behoudens tekenen van cholestase. Gezien de ernstige jeuk werden verschillende medicamenten beproefd. Leverfunctieproeven en serum galzuurspiegels werden hierbij vervolgd (Fig. IV.9.). Gestart werd met dehydrocholzuur. Dit is een triketogalzuur, dat sterk choleretisch werkt. Waarschijnlijk wordt het geheel in de lever omgezet tot cholzuur en mono- en diketogalzuren, welke op hun beurt de galsecretie kunnen stimuleren (Soloway e.a., 1971^a). Uit de figuur blijkt, dat het dehydrocholzuur bij deze patiënt geen gunstig effect had op de cholestase. De jeuk en de icterus namen toe, terwijl ook de serum galzuurconcentratie aanvankelijk steeg. Een deel van de stijging van het cholzuur zou kunnen worden toegeschreven aan omzetting van dehydrocholzuur in cholzuur. Verder waren op dag 7, 10 en 13 pieken van een onbekende stof, waarschijnlijk een β -keto-dihydroxygalzuur op het serum chromatogram zichtbaar. De retentietijd hiervan was 30 min en 30 sec. Dat de cholestase tijdens deze periode toenam, zou kunnen blijken uit de verminderde uitscheiding van urobilinogeen in de feces. Ten gunste van de dehydrocholzuur kan gezegd worden, dat de behandelingsduur misschien tekort is geweest, aangezien de serum galzuurconcentratie op het laatst toch weer een duidelijke daling vertoonde. Na toediening van fenobarbital trad een snelle daling van de serum concentratie aan galzuren op. Tevens werd nu evenals in voorafgaande controleperiode, relatief meer desoxycholzuur in het serum aantoonbaar. Dit laatste kan samen met de toegenomen uitscheiding van urobilinogeen in de feces wijzen op een vermeerderde afvloed van gal naar de darm.

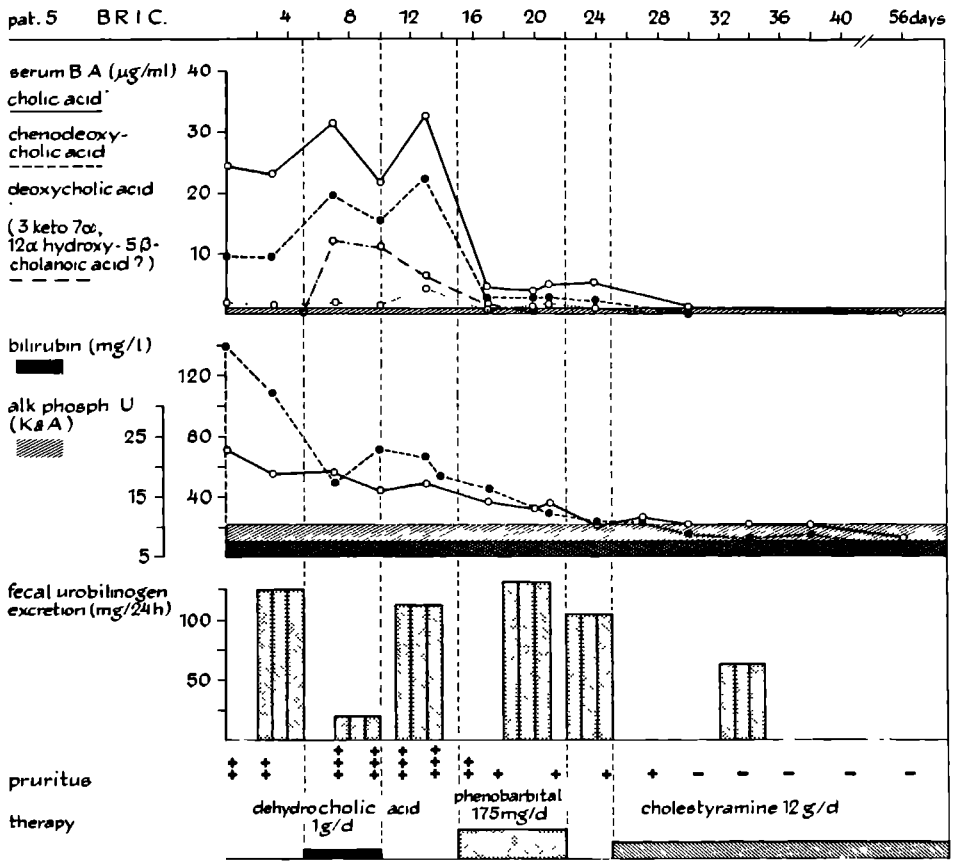


Fig. IV.9. Follow up analyses of bile acids(B.A.) and liver function tests in serum of patient 5 with benign recurrent intrahepatic cholestasis. Treatment with successively dehydrocholic acid, phenobarbital and cholestyramine was tested. Before treatment with these drugs the patient already was recovering from a cholestatic episode.

Aangezien toch nog enige jeuk bleef bestaan en het sederende effect van de hoge dosis fenobarbital aanzienlijk was, werd na het inlassen van een derde controleperiode, overgegaan tot het toedienen van cholestyramine. Hiermee verdween de jeuk geheel, terwijl de serum galzuurconcentratie tot een normale waarde daalde. Aangezien de patiënt zich reeds in de herstelfase bevond, was het effect van cholestyramine moeilijk te evalueren. Men kan evenwel stellen, dat dehydrocholzuur een minder gunstig effect had en het fenobarbital een gunstig effect had op de serum galzuurconcentratie, de jeuk en de afvloed van gal naar de darm.

IV.2.8. Patiënten met een intrahepatische cholestase e causa ignota

2.8.1. Serum

De resultaten van deze groep van vier patiënten zijn vermeld in Tabel IV.9. De chol/chen-ratio was steeds groter dan 1,2. Lithocholzuur was niet aantoonbaar. Behalve patiënt 4 hadden alle patiënten last van jeuk. Patiënt 2 had een duidelijk verhoogde galzuurconcentratie bij een normaal serum bilirubinegehalte.

2.8.2. Urine

Bij de patiënten 1 en 3 werden galzuurbepalingen in de urine gedaan (Tabel IV.4, kolom 6). Ook hier werd weer hetzelfde patroon aangetroffen als bij de vorige groepen. Patiënte 1 had een serum galzuurconcentratie van 31,8 µg/ml en scheidde 22,38 mg/24 uur in de urine uit. Bij patiënte 3 was dit resp. 100,9 µg en 53,00 mg. Chenodesoxycholzuur was weer in overmaat aanwezig en voor 81 en 92% in sulfaatverresterde vorm. De chol/chen-ratio was in beide gevallen kleiner dan of gelijk aan 0,90. In serum was deze bij beide patiënten groter dan 1,2.

Ook hier was lithocholzuur in de urine aantoonbaar evenals desoxycholzuur, zij het in geringere concentraties.

IV.3. Vergelijking van de resultaten van galzuurbepalingen bij patiënten met levercirrhose, P.B.C. en een complete extrahepatische obstructie

TABLE IV.9. Results of serum bile acid analyses of patients with intrahepatic cholestasis of unknown origin.

Patient number	Cholic acid μg/ml	Chenodeoxycholic acid μg/ml	Deoxycholic acid μg/ml	Lithocholic acid μg/ml	Total bile acids μg/ml	CA/CDCA ratio	Bilir. mg/l	Alk.Phosph. U	5'-Nucl. U	Sgot U/100 ml	Sgpt U/100 ml	Cholest. g/l	Pruritus score	Duration of illness yrs
1	37.3	24.1	0.0	0.0	61.4	1.6	53.0	61	28	24	16	2.74	2	0.5
2	4.6	2.9	0.2	0.0	7.7	1.6	7.1	27	29	33	72	3.25	1	2
3	54.6	46.3	0.0	0.0	100.9	1.2	87.2	71	71	75	57	1.52	2	12
4	2.3	1.4	0.3	0.0	4.0	1.7	19.4	24	43	36	97	2.19	0	4

IV.3.1. Serum

3.1.1. Vergelijking van levercirrhose met P.B.C. (Fig. IV.10.)

De totale galzuurconcentratie in de P.B.C.-groep lag gemiddeld hoger dan in de cirrhose-groep, maar dit verschil was niet significant. De chol/chen-ratio was in de cirrhose-groep zeer significant lager dan in de P.B.C.-groep ($P_w < 0,0001$). De cholzuurconcentratie in de P.B.C.-groep was significant hoger dan in de cirrhose-groep ($P_w = 0,05$). De serum alkalische fosfatase- en 5'-nucleotidase-activiteit waren zeer significant hoger in de P.B.C.-groep ($P_w = 0,0001$). Voor het serum cholesterolgehalte was er slechts een aanwijzing voor een significant verschil. Dit was hoger in de P.B.C.-groep ($P_w = 0,06$).

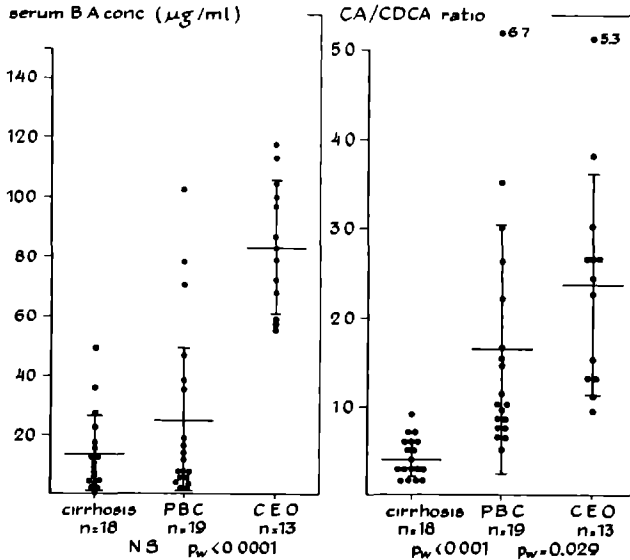


Fig IV 10 Comparisons of the total serum bile acid(BA) concentration and the serum cholic/chenodeoxycholic acid(CA/CDCA) ratio of patients with liver cirrhosis, with primary biliary cirrhosis(PBC) or with complete extrahepatic obstruction(CEO). The lines represent mean values \pm 1 SD

3.1.2. Vergelijking van P.B.C. met complete extrahepatische obstructie (Fig. IV.10.)

De totale galzuur-, de cholzuur- en chenodesoxycholzuurconcentraties waren in de groep met een complete extrahepatische obstructie zeer significant hoger dan in de P.B.C.-groep ($P_w = 0,0001$). De chol/chen-ratio was in deze groep ook significant hoger dan in de P.D.C.-groep ($P_w = 0,03$), evenals het serum bilirubinegehalte ($P_w < 0,0001$) en de sgpt ($P_w = 0,001$). Ook ten aanzien van de jeukscore bestond er een significant verschil tussen beide groepen. Deze lag duidelijk hoger in de groep met een complete extrahepatische obstructie ($P_w = 0,0004$).

IV.3.2. Gal

3.2.1. Vergelijking van levercirrhose met P.B.C. en met normale personen (Fig. IV.11)

De totale galzuurconcentratie in B-galmonsters was in de P.B.C.-groep significant lager dan bij de normale groep ($P_w < 0,01$). Dit verschil was er in nog sterkere mate tussen de normale groep en de patiënten met een cirrhose ($P_w < 0,001$). Alleen het cholzuurgehalte ($P_w = 0,022$) en de chol/chen-ratio ($P_w < 0,006$) waren significant hoger in de P.B.C.-groep dan in de cirrhose-groep. Het lithocholzuurgehalte was in de P.B.C.-groep significant lager dan bij de cirrhosegroep ($P_w = 0,016$). Zoals reeds vermeld is, was er geen duidelijk verschil in de chol/chen-ratio tussen patiënten met een cirrhose en normale personen.

IV.4. Vergelijking van de resultaten van galzuurbepalingen in serum en in urine

Zoals verwacht werd, bleek er een goede correlatie te bestaan tussen de totale galzuurconcentratie in serum en de totale galzuurexcretie per 24 uur in de urine (Tabel IV.4. en Fig. IV.12). De chol/chen-ratio in serum was zeer significant hoger dan die in urine ($P_w = 0,0001$). In het algemeen was de chol/chen-ratio in het serum bij patiënten met cholestase groter dan 1,0 en in de urine kleiner dan 1,0. De chenodesoxycholzuurexcretie was dus relatief

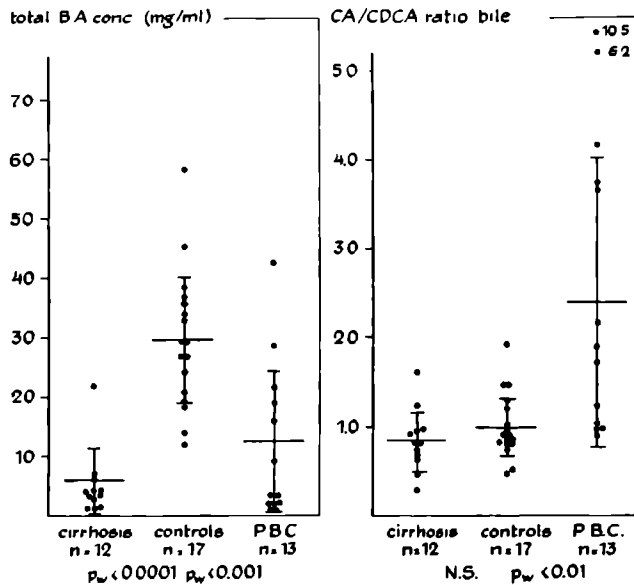


Fig.IV.11. Comparisons of the total biliary bile acid(B.A.) concentration and the biliary cholic /chenodeoxycholic acid(CA/CDCA) ratio of normal controls, of patients with cirrhosis or with primary biliary cirrhosis (P B C.) The lines represent mean values \pm 1 S.D.

veel groter dan de cholzuurexcretie (Fig. IV.13). Tevens bleek er een significante correlatie te bestaan tussen de chol/chen-ratio in serum en in urine ($r_s = 0,66$, $P_s = 0,01$). Naarmate de ratio in serum hoger was, was deze in het algemeen ook hoger in urine. Dat de ratio in urine altijd lager is dan in serum houdt ten nauwste verband met de mate, waarin deze galzuren in gesulfateerde vorm in de urine worden uitgescheiden. Het percentage cholzuur dat in sulfaatveresterde vorm in de urine werd uitgescheiden bedroeg gemiddeld 40,8% (S.D. 24,6), terwijl dit voor chenodesoxycholzuur met 76,5% (S.D. 12,8) bijna tweemaal zoveel was. Door het hogere percentage van de sulfaatveresterde fractie van het chenodesoxycholzuur heeft dit galzuur een effectievere klaring door de nier dan cholzuur. Op grond van deze waarneming komt de vraag naar voren waarom in de lever (?) deze sulfaatverestering van chenodesoxycholzuur, ogenschijnlijk bedoeld als detoxificatiemechanisme, effectie-

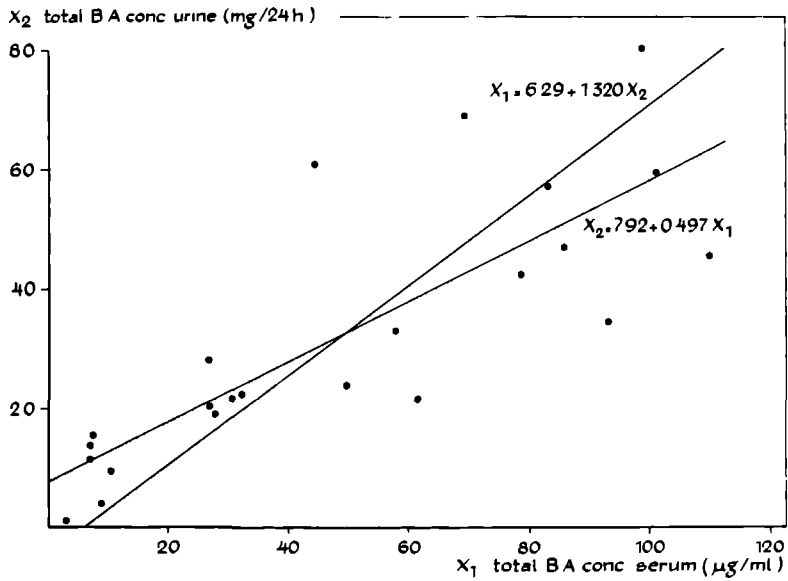


Fig IV 12 The correlation between the total serum bile acid(B A) concentration and the total B A excretion/24 h The lines represent calculated regression lines($n=23$, $r_s=0.85$)

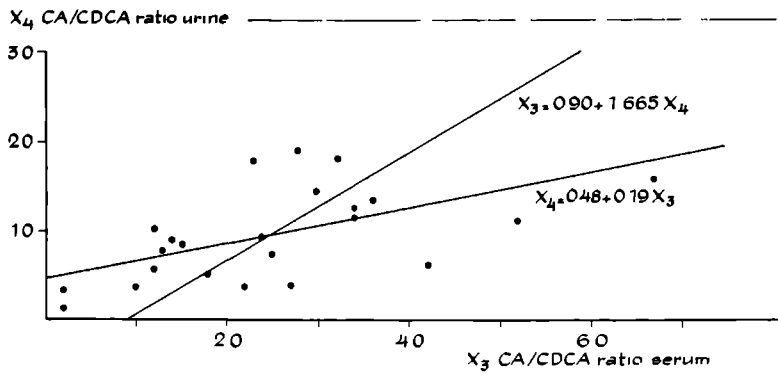


Fig IV 13 The correlation between the serum cholic /chenodeoxycholic acid (CA/CDCA) ratio and the CA/CDCA ratio in 24 h urine collections The lines represent the calculated regression lines($n=23$, $r_s=0.66$)

ver plaatsvindt dan voor cholzuur. Bovendien kan deze waarneming ten dele een verklaring geven voor het feit dat bij cholestase de chol/chen-ratio in serum bijna altijd hoger is dan 1,0. De chol/chen-ratio in de urine van de niet gesulfateerde fracties was bijna steeds groter dan 1,0 en aanzienlijk hoger dan de chol/chen-ratio van de totale concentraties cholzuur en chenodesoxycholzuur (Tabel IV.4.).

IV.5. Uitgebreid gaschromatografisch onderzoek naar de identiteit van onbekende en bekende pieken op het urine chromatogram

Aangezien in de urine regelmatig op plaatsen waarvan de retentietijden niet met die van bekende galzuren overeenkwamen, piekjes werden gevonden, was het van belang de identiteit van deze pieken te achterhalen. Omdat maar een beperkt aantal referentiegalzuren onderzocht kon worden, was de vraagstelling beperkt tot onderzoek naar de aanwezigheid van lithocholzuur, isolithocholzuur, 3β -hydroxy- Δ 5-choleenzuur als monohydroxygalzuren. Verder werd onderzocht of ursodesoxycholzuur aanwezig kon zijn. Tevens werd de identiteit van de overige bekende galzuren desoxycholzuur, chenodesoxycholzuur en cholzuur gecontroleerd. Door telkens verschillende derivaten van galzuren te bereiden en deze op een aantal verschillende stationaire fasen te bepalen, kan men een aan zekerheid grenzende waarschijnlijkheid verkrijgen over de identiteit van een bepaalde piek. Wanneer de kwantiteit van een dergelijke piek voldoende is en de piek goed oploopt van de basislijn, dan kan men in een opstelling, waarin gaschromatograaf en massaspectrometer aan elkaar gekoppeld zijn de identiteit van een bepaalde piek achterhalen.

In het Rega Instituut van de Katholieke Universiteit te Leuven werden in totaal 7 urinemonsters onderzocht. Het betrof urine van patiënt 5 met een benigne intermitterende intrahepatische cholestase, van patiënt 2 en 14 met een cirrhose, van patiënt 19 met P.B.C., en patiënt 3, 11 en 16 met een complete extrahepatische obstructie. Methylesterderivaten en acetaatmethylesterderivaten van galzuren werden hiervoor bereid. Als referentie galzuren werden gebruikt: lithocholzuur, isolithocholzuur, 3β -monohydroxy- Δ 5-choleenzuur, ursodesoxycholzuur, hyocholzuur, 5β -cholestaan, cholesterol en de overige bekende galzuren. De verschillende deri-

vaten werden getest op 3% OV-1, 3% OV-17 en 3% QF-1 als stationaire fasen. De aan- of afwezigheid van desoxycholzuur, chenodesoxycholzuur en cholzuur werd bij dit uitgebreide onderzoek bevestigd. Wat betreft de monohydroxygalzuren kan gesteld worden dat bij alle patiënten sporen lithocholzuur aanwezig waren, terwijl bij twee patiënten waarschijnlijk ook een spoortje 3β -hydroxy- Δ 5-choleenzuur aanwezig was.

Bij drie patiënten was een spoortje ursodesoxycholzuur aanwezig. Bovendien kon met dit onderzoek hyocholzuur en een 3-keto-dihydroxygalzuur aangetoond worden in de urine van deze patiënten. De kwantiteit van de gevonden piekjes van lithocholzuur en ursodesoxycholzuur was onvoldoende om hier massaspectrometrie op te doen. De conclusie van dit aanvullende onderzoek was, dat steun werd verkregen voor de aanwezigheid van lithocholzuur, 3β -hydroxy- Δ 5-choleenzuur en ursodesoxycholzuur in de urine van patiënten met cholestase.

IV.6. Relatie tussen de jeukscore enerzijds en de galzuren en de leverfunctieproeven anderzijds

Bij 65 patiënten met een levercirrhose (18), een P.B.C. (19), een complete of incomplete extrahepatische obstructie (16), een primaire- of secundaire scleroserende cholangitis (6), een intrahepatische cholestase e.c.i. (4) of een benigne intermitterende intrahepatische cholestase in de actieve fase (2) werd nagegaan of er tussen het galzuurpatroon in het serum en de jeukscore een significante correlatie bestond. Bij alle patiënten ging het om één waarneming.

Wanneer de groep met jeuk (jeukscore +, ++ en +++) vergeleken werd met de groep zonder jeuk, dan was de totale galzuurconcentratie in de eerste groep zeer significant hoger dan in de tweede groep ($P_w < 0,001$). Wanneer de groep met jeuk onderverdeeld werd in drie categorieën (+, ++ en +++) dan was er een duidelijke tendens tot meer jeuk bij de patiënten met de hoogste galzuurspiegels.

In Tabel IV.10 zijn de rangcorrelatie-coëfficiënten van de jeukscore met de biochemische parameters vermeld. De beste correlatie bestond tussen de jeukscore en het serum cholzuur (Fig. IV.

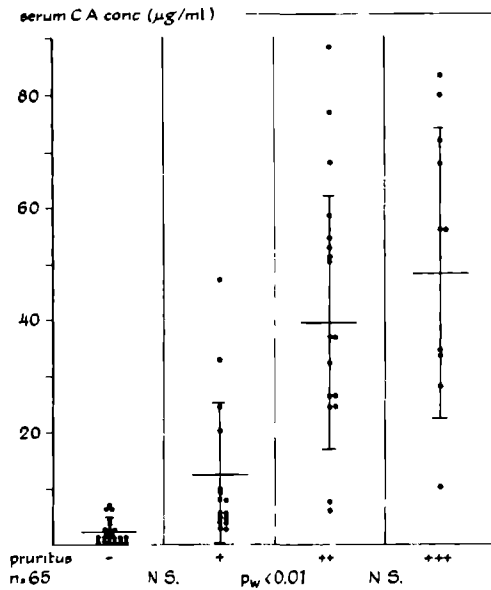


Fig. IV.14. The correlation between the serum cholic acid(C.A.) concentration and the pruritus score(-, +, ++,+++). The lines represent mean values ± 1 S.D. (n=65, $r_s = 0.81$)

14) en de totale serum galzuurconcentratie. Alle patiënten zonder jeuk hadden een serum cholzuurgehalte kleiner dan $7,5 \mu\text{g/ml}$ en alle patiënten met jeuk hadden een cholzuurconcentratie groter dan $2,5 \mu\text{g/ml}$. Er was eveneens een duidelijke positieve correlatie met de chol/chen-ratio. Alle patiënten zonder jeuk hadden een ratio, die kleiner was dan 1,0. Ook met het bilirubinegehalte en de alkalische fosfatase-activiteit bestond er een redelijke correlatie. Deze was echter duidelijk minder dan met de serum cholzuurconcentratie. Er bestond een aanwijzing voor een negatieve correlatie tussen de jeukscore en de lithocholzuurconcentratie in gal ($r_s = -0,52$, $P_s = 0,05$). Dit ging ook op, maar in mindere mate, voor de desoxycholzuurconcentratie in gal ($r_s = -0,39$, $P_s > 0,05$).

IV.7. Relatie tussen de galzuren, de leverfunctieproeven en de ziekteduur

Bij de bovengenoemde 65 patiënten werd tevens gezocht naar

correlaties tussen de galzuren en de overige onderzochte parameters. De rangcorrelatiecoëfficiënten van de belangrijkste parameters worden in Tabel IV.10. samengevat.

7.1. Serum bilirubinegehalte

Er bestond een goede correlatie tussen het bilirubinegehalte en de galzuurspiegel. Deze was duidelijk minder tussen het bilirubinegehalte én de chol/chen-ratio, de alkalische fosfatase- en de 5'-nucleotidase-activiteit en de sgot.

In tegenstelling tot de groep met een complete extrahepatische obstructie (Fig. IV.6) werd bij de overige 52 patiënten wel een zeer significante correlatie tussen de totale galzuurconcentratie en de bilirubinespiegel gevonden (Fig. IV.15).

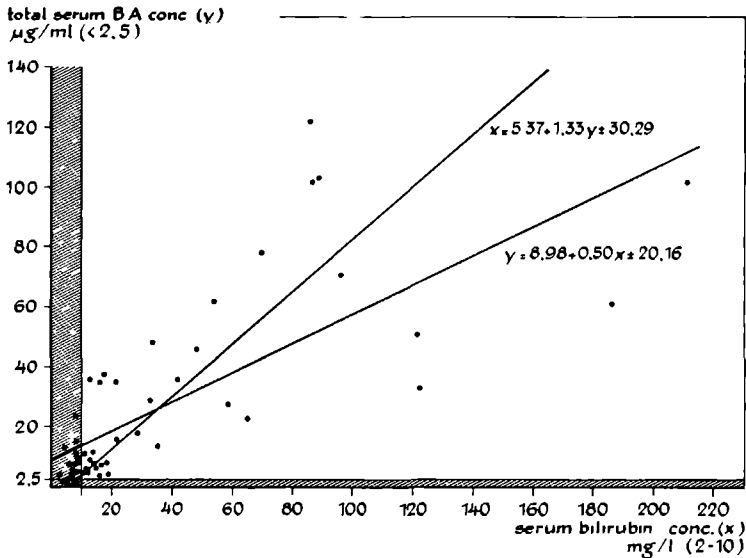


Fig IV 15 The correlation between the total bile acid (B A) concentration (y) and the serum bilirubin concentration (x) in the entire group of patients with cirrhosis or cholestasis except the patients with complete extrahepatic obstruction (n=52, $r_s=0.82$). The lines represent the calculated regression lines.

TABLE IV. 10. Rank correlation coefficients of the different parameters in a group of 65 patients with cirrhosis, P.B.C., complete or incomplete extrahepatic obstruction, primary or secondary sclerosing cholangitis, benign recurrent intrahepatic cholestasis and intrahepatic cholestasis of unknown origin.

	Serum cholic acid	Serum chenodeoxycholic acid	Total bile acid conc	CA/CDCA ratio	Bilir	Alk.Phosph.	5'-Nucl.	Sgot	Cholesterol	Pruritus score	Duration of illness ^{xx}
Serum cholic acid	-	0.82 ^x	0.97 ^x	0.70 ^x	0.83 ^x	0.61 ^x	0.45 ^x	0.46 ^x	0.37 ^x	0.81 ^x	0.22
Serum chenodeoxycholic acid	0.84 ^x	-	0.93 ^x	0.26	0.76 ^x	0.41 ^x	0.29	0.46 ^x	0.21	0.69 ^x	-0.03
Total bile acid conc.	0.97 ^x	0.93 ^x	-	0.54 ^x	0.83 ^x	0.54 ^x	0.37 ^x	0.44 ^x	0.35 ^x	0.78 ^x	0.11
CA/CDCA-ratio	0.70 ^x	0.26	0.54 ^x	-	0.56 ^x	0.58 ^x	0.45 ^x	0.21	0.38 ^x	0.60 ^x	0.47 ^x
Bilir.	0.83 ^x	0.76 ^x	0.83 ^x	0.56 ^x	-	0.49 ^x	0.32	0.50 ^x	0.23	0.72 ^x	0.04
Alk.phosph.	0.61 ^x	0.41 ^x	0.54 ^x	0.56 ^x	0.49 ^x	-	0.88 ^x	0.51 ^x	0.43 ^x	0.52 ^x	0.57 ^x
5'-Nucl.	0.45 ^x	0.29	0.37 ^x	0.45 ^x	0.32	0.88 ^x	-	0.53 ^x	0.38 ^x	0.44 ^x	0.66 ^x
Sgot	0.46 ^x	0.46 ^x	0.44 ^x	0.21	0.50 ^x	0.51 ^x	0.53 ^x	-	0.11	0.45 ^x	0.12
Cholesterol	0.37 ^x	0.21	0.34 ^x	0.38 ^x	0.23	0.43 ^x	0.38 ^x	0.11	-	0.30	0.21
Pruritus score	0.81 ^x	0.69 ^x	0.78 ^x	0.60 ^x	0.72 ^x	0.52 ^x	0.44 ^x	0.45 ^x	0.30	-	0.17
Duration of illness ^{xx}	0.22	-0.03	0.11	0.47 ^x	0.04	0.57 ^x	0.66 ^x	0.12	0.21	0.17	-

x) These figures represent $P_s \leq 0.01$

xx) The patients with cirrhosis of the liver are not included in this calculation.

7.2. Alkalische fosfatase- en 5'-nucleotidase-activiteit

Er was een matige correlatie tussen de alkalische fosfatase-activiteit enerzijds en de totale serum galzuurconcentratie, de serum choolzuur- en chenodesoxychoolzuurconcentratie anderzijds. De zeer goede correlatie tussen alkalische fosfatase- én de 5'-nucleotidase-activiteit kon verwacht worden. De correlatie tussen 5'-nucleotidase en de overige parameters was over de gehele linie vergelijkbaar met, maar iets minder, dan de correlatie tussen de alkalische fosfatase-activiteit en de overige parameters.

Er bestond een negatief verband tussen de lithochoolzuurconcentratie in de gal en de alkalische fosfatase-activiteit in het serum ($r_s = - 0,50$, $P_s = 0,05$).

7.3. Serum transaminasen

Er bestond een redelijk verband tussen de sgot en sgpt ($r_s = 0,78$, $P_s < 0,01$). De correlatie met de overige parameters was slechts zeer matig.

7.4. Serum cholesterol

Er was een zeer matige correlatie tussen het cholesterolgehalte en het serum galzuurpatroon. Dit gold eveneens voor de correlatie tussen de cholesterolspiegel en alkalische fosfatase- en de 5'-nucleotidase-activiteit.

7.5. Ziekte duur

Opvallend was de goede correlatie tussen ziekte duur en alkalische fosfatase- en 5'-nucleotidase-activiteit. De patiënten met een cirrhose werden bij de berekening buiten beschouwing gelaten, omdat de ziekte duur bij deze groep te onzeker was.

IV.8. De invloed van verschillende behandelingsmethoden op het galzuurpatroon in serum en gal en op de jeuk

IV.8.1. Cholestyramine

9 Patiënten werden onderzocht vóór en tijdens cholestyramine-toediening. Het betrof zes patiënten met P.B.C. (Tabel III, 10,

pat. 2, 4, 8, 10, 13 en 15), één patiënt met een primaire sclerose-rende cholangitis (pat. 1) en twee patiënten met een intrahepatische cholestase e.c.i. (pat. 1 en 3). De serum galzuurbepaling werd voor de tweede keer gedaan nadat de patiënten gemiddeld 5 weken behandeld waren met 8 à 12 g cholestyramine per dag. Het effect van dit middel werd hierbij getest door de patiënt als zijn eigen controle te gebruiken. Alle patiënten hadden vóór behandeling met cholestyramine een jeukscore van ++, met uitzondering van twee patiënten, die slechts een jeukscore + hadden. Tijdens cholestyraminegebruik verdween bij alle patiënten de jeuk. Daarnaast was ook het effect op de serum galzuurconcentratie zeer duidelijk (Fig. IV. 16). Er trad een zeer significante daling op van de totale serum galzuurconcentratie, en van de serum cholzuur- en chenodesoxycholzuurconcentratie ($P_{tek.} < 0,001$).

Van de secundaire galzuren was tevoren het desoxycholzuur bij vijf patiënten aantoonbaar en het lithocholzuur bij drie patiënten. Tijdens behandeling met cholestyramine werd het desoxycholzuur nog slechts in sporen bij twee patiënten aangetoond, het lithocholzuur bij geen der patiënten. De chol/chen-ratio veranderde tijdens behandeling met cholestyramine niet significant ($P_{tek.} > 0,10$). De serum bilirubineconcentratie werd duidelijk lager tijdens behandeling ($P_{tek.} < 0,001$). De alkalische fosfatase-activiteit veranderde niet significant tijdens behandeling ($P_{tek.} > 0,10$), terwijl de sgot tijdens behandeling significant iets gedaald was ($P_{tek.} < 0,05$), evenals de sgpt ($P_{tek.} < 0,05$).

De serum cholesterolconcentratie veranderde bij deze kortduurende behandeling niet significant. Een deel van deze resultaten werd elders gepubliceerd (van Berge Henegouwen en Brandt, 1974^c).

IV.8.2. Galwegdrainage

Zes patiënten werden vóór en tijdens drainage van de galwegen onderzocht, nadat een operatie was verricht waarbij een T-drain in de ductus choledochus of een ductus hepaticus was geplaatst. Het betrof vier patiënten met een complete extrahepatische obstructie (pat. 2, 7, 11 en 12), één patiënt met P.B.C. (pat. 2) en één patiënt met een primaire sclerose-rende cholangitis (pat. 1). Voor

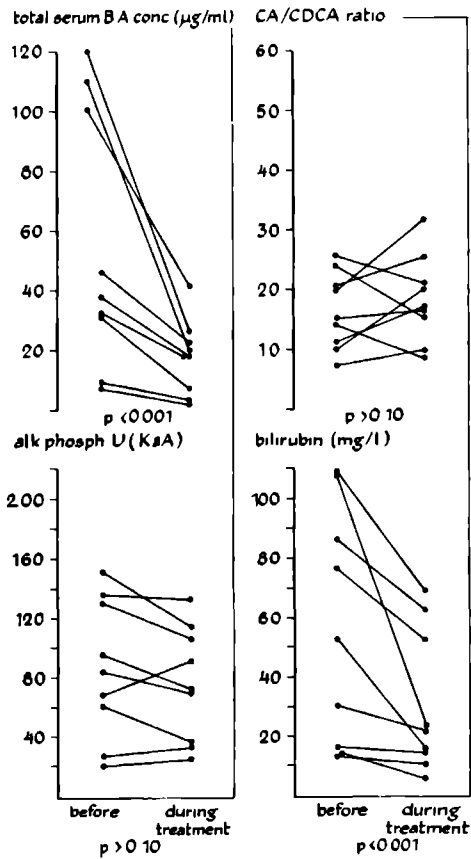


Fig IV 16 The total serum bile acid (B A) concentration, the cholic/cheno deoxycholic acid(CA/CDCA) ratio the bilirubin level and the alkaline phosphatase activity before and during treatment(five weeks) with B 12 g cholestyramine/day(6 patients with P B C , one patient with primary sclerosing cholangitis and two patients with intra hepatic cholestasis of unknown origin) Statistical differences between control and treatment levels in each patient were investigated using the Sign test

en gemiddeld 4 dagen na de operatie werd serum voor de galzuurbe-
 paling afgenomen. Twee patiënten hadden voor de operatie een jeuk-
 score van +++, 3 hadden ++ en één patiënt had +. Bij alle patiënten
 was de jeuk direct na de drainage-operatie verdwenen. De totale
 galzuurconcentratie, het serum cholesterolgehalte, de bilirubine-
 spiegel en de alkalische fosfatase-activiteit waren duidelijk lager
 na de operatie (Fig. IV.17). De chol/chen-ratio was na de operatie
 bij vijf van de zes patiënten duidelijk gedaald en bij één patiënt ge-
 stegen.

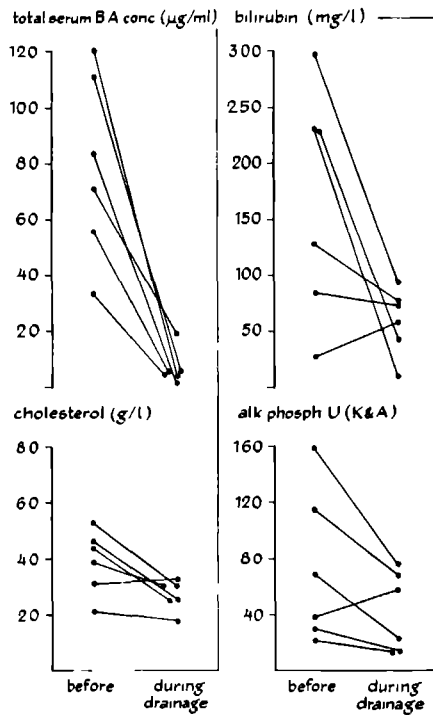


Fig IV 17 The total serum bile acid(B A) concentration, the bilirubin level, the cholesterol concentration and the alkaline phosphatase activity before and during(3 5 days) biliary drainage with T-tubes in six patients with cholestasis(4 patients with complete extrahepatic obstruction, one with P B C and one with primary sclerosing cholangitis)

8.2.1. Achtereenvolgende galzuurbepalingen tijdens en na galwegdrainage

Bepalingen van galzuren in serum en gal (en urine) werden gedaan bij een patiënt met een primaire scleroserende cholangitis (pat. 1; Fig. IV.8), bij een patiënt met P.B.C. (pat. 2; Fig. IV.18) en bij een patiënt met een complete extrahepatische obstructie (pat. 2; Fig. IV.19). Bij deze patiënten werd na inspectie van de extrahepatische galwegen een drain in de ductus choledochus geïnstalleerd of in één ductus hepaticus (pat. 2 met complete extrahepatische obstructie). Na aanleg van de drain is duidelijk te zien dat na 4 à 7 dagen een evenwichtssituatie ontstaat, waarbij de uitscheiding van galzuren in de gal constant blijft. Bij de patiënte van Fig. IV.19. blijkt een goede galafvoer te bestaan naar de darm na het afsluiten van de galdrain. Dit wordt aangetoond door het verder dalen van de serum bilirubineconcentratie, het constant blijven van de serum galzuurconcentratie en de toename van de concentratie secundaire galzuren in de gal. Bij de overige twee patiënten is de galafvoer naar de darm minder goed na het afsluiten van de galdrain. Dit wordt geïllustreerd aan de stijging van de serum bilirubine- en galzuurconcentraties.

Opvallend is de abrupte verdwijning van de jeuk na aanleg van de galdrain. Bij één patiënt was dit zelfs het geval terwijl de serum galzuurconcentratie nog boven de $25 \mu\text{g/ml}$ lag (Fig. IV.8). Tevens werd bij één patiënte (Fig. IV.18) het effect van cholestyramine op de serum galzuurconcentratie, de bilirubinespiegel, de alkalische fosfatase-activiteit en de jeuk bestudeerd. Dit liet een bevestiging zien van een vroegere waarneming, dat onder invloed van cholestyramine de chemische en klinische verschijnselen van de cholestase kunnen verminderen.

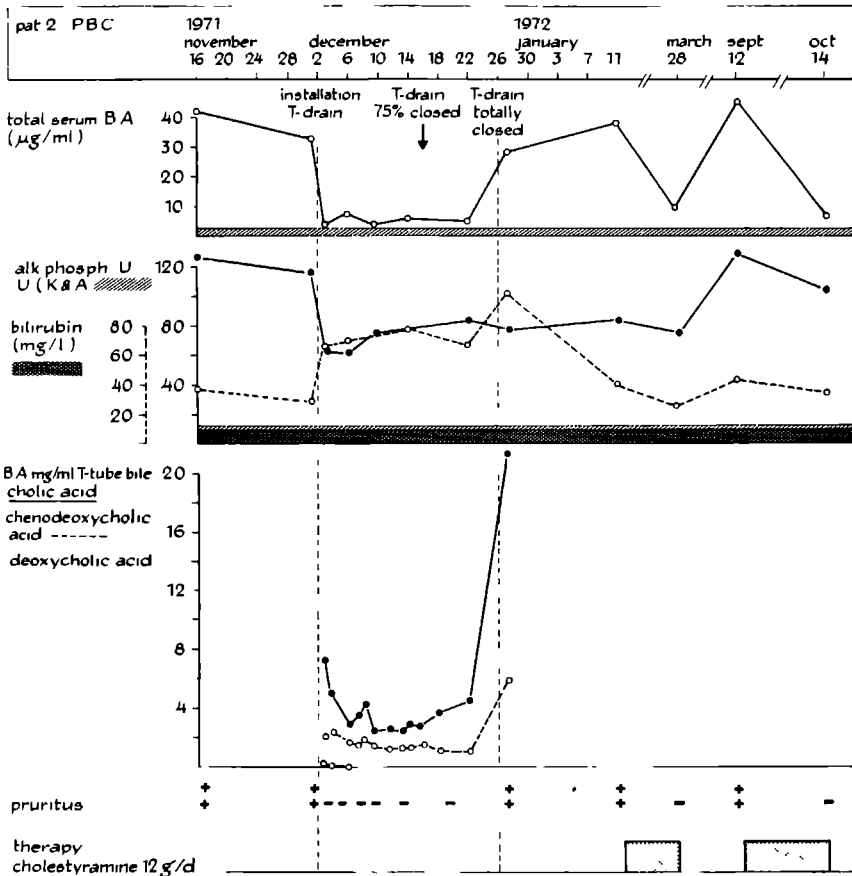


Fig. IV.18. Follow up analyses of bile acid(B.A.) in serum and drain bile of patient 2 with P.B.C.

After installation of the T-tube in the common bile duct the symptoms of cholestasis diminished, but after closing the drain cholestasis became more serious. The biliary B A excretion reached a steady state after \pm 6 days. By treatment with cholestyramine an improvement was achieved.

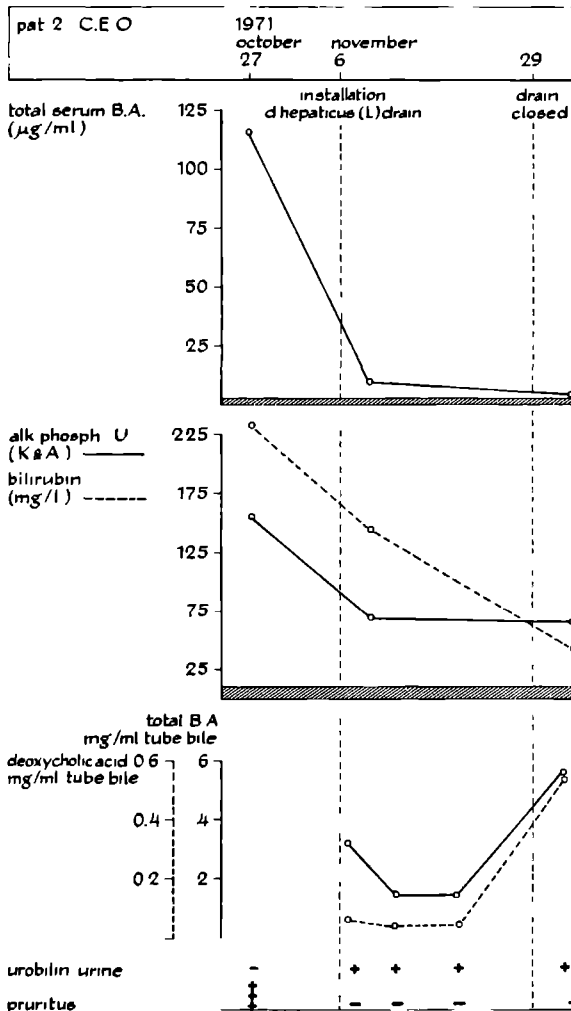


Fig. IV.19. Follow up analyses of bile acids(B.A.) in serum and drain bile of patient 2 with complete extrahepatic obstruction due to a carcinoma of the left hepatic duct. The symptoms of cholestasis diminished distinctly during and after biliary drainage. The biliary B.A. excretion reached a steady state after \pm 5 days.

Beschouwingen

V.1. Inleiding

In dit hoofdstuk zullen de resultaten van de galzuurbepalingen in serum, gal en urine besproken worden.

Op grond van gegevens uit de literatuur werd een aantal van de verkregen resultaten verwacht. Een deel van de resultaten leverde nieuwe gegevens op, omdat gelijktijdige bepalingen in serum, gal en urine tot nu toe nog niet beschreven zijn. Enerzijds geven deze resultaten informatie over kwantitatieve veranderingen in het galzuurmetabolisme bij cholestase en cirrhose, anderzijds kunnen ook kwalitatieve veranderingen, in de zin van verschillen in het metabolisme van de primaire galzuren, aannemelijk gemaakt worden. Hierbij dient de beperking te worden aangebracht, dat uit deze gegevens geen totaal beeld van het galzuurmetabolisme bij cholestase of cirrhose verkregen kan worden. Galzuurkinetiek-studies werden immers niet verricht.

Betreffende de belangrijkste vraagstelling van het onderzoek, of de gaschromatografische bepaling van individuele galzuren waarde kan hebben voor de diagnostiek van leveraandoeningen, kan gesteld worden, dat met deze bepaling wel een zeer gevoelige parameter voor de leverfunctie wordt gemeten, maar dat met behulp van de meer gangbare chemische parameters bijna steeds voldoende informatie voor de diagnostiek wordt verkregen. Het lijkt daarom niet zinvol om een dergelijke bepalingmethode in ieder klinisch-chemisch laboratorium, dat over een gaschromatograaf beschikt, op te zetten. Wel kan men stellen, dat het merendeel der gegevens van waarde is om het inzicht in een aantal leverziekten te verdiepen.

In het algemeen werden, naarmate de cholestase ernstiger was, dezelfde galzuurpatronen bij patiënten met intra- en extrahepatische cholestase gevonden. Vandaar dat deze bepaling - misschien met uitzondering van de aan- of afwezigheid van het secundaire galzuur desoxycholzuur in de urine - geen nadere informatie biedt over de lokalisatie van de galafvloedstoornis. Afgezien daarvan wordt de verandering van het galzuurpatroon bij cholestase eerder

als een gevolg dan als oorzaak van de cholestase beschouwd. Een uitzondering hierop vormt de benigne intermitterende intrahepatische cholestase, waarbij eerder het omgekeerde het geval lijkt te zijn. Men dient te bedenken, dat retentie van galzuren in de lever op zich ook een leverparenchymbeschadiging kan veroorzaken en mogelijk de cholestase kan doen toenemen (Popper, 1972). In dit verband was het van belang om na te gaan of middelen, die direct met het galzuurmetabolisme interfereren, behalve een gunstige invloed op het gestoorde galzuurmetabolisme ook een gunstige invloed op de overige chemische parameters van de cholestase hebben.

V.2. Galzuurbepalingen in serum (Tabel V.1.)

V.2.1. De totale galzuurconcentratie, de individuele galzuren en en chol/chen-ratio

Door een groot aantal bepalingen in het serum van gezonde personen te verrichten, werden betrouwbare normaalwaarden vastgesteld die goed overeenkomen met die van andere onderzoekers (Tabel III.5.).

In overeenstemming met onderzoeken van Rudman en Kendall (1957^a), Osborn e.a., (1959), Carey (1969), Paumgartner en Grabner (1970) werd bij de patiënten een goede correlatie tussen de totale galzuurconcentratie en de bilirubinespiegel gevonden ($r_s = 0,82$). In het algemeen was, afhankelijk van de ernst van de cholestase, de serum galzuurconcentratie relatief sterker toegenomen (Tabel IV.1. en Tabel V.1.). Bij drie patiënten met P.B.C. en bij bijna alle patiënten met een complete extrahepatische obstructie werd wat de totale galzuurconcentratie betreft regelmatig ruim het honderdvoudige van de gemiddelde normaalwaarde gemeten. In het algemeen bestond er wat de totale serum galzuurconcentratie betreft een significant verschil tussen patiënten met P.B.C. en die met een complete extrahepatische obstructie, terwijl tussen de patiënten met P.B.C. en die met een "gewone" cirrhose alleen een aanwijzing voor een significant verschil bestond voor wat betreft het serum cholzuur (Fig. IV.10). Bij de cirrhose werden de minst verhoogde waarden voor de totale serum galzuurconcentratie gemeten.

De chol/chen-ratio was in het algemeen groter dan 1,0 bij

TABLE V.1. Review of the mean serum bile acid concentrations in patients with cirrhosis of the liver or with cholestasis (ranges and mean values in Table IV.1.)

SERUM	Cholic ^x acid	Chenode- ^x oxy cholic acid	Deoxy- ^x cholic acid	Litho- ^x cholic acid	Total bile ^x acids	CA/CDCA ^{xx} ratio
1 Normal controls	N	N	N	N	N	N
2 Liver cirrhosis	↑	↑↑	N/↑	N	↑	↓
3 Primary biliary cirrhosis	↑↑↑	↑↑	N/↑	N	↑↑	↑
4 Complete extrahepatic obstruction	↑↑↑↑	↑↑↑	N	N	↑↑↑↑	↑↑
5 Incomplete extrahepatic obstruction	↑↑↑	↑↑	↑	N	↑↑	↑
6 Primary and secondary sclerosing cholangitis	↑↑↑↑	↑↑↑	N	N	↑↑↑	↑
7 Benign recurrent intrahepatic cholestasis	↑↑↑↑	↑↑↑↑			↑↑↑↑	↑↑
a. In the early phase	↑↑↑↑	↑↑↑↑	N/↑	N	↑↑↑↑	↑↑
b. In the later phase	↑↑↑	↑↑	N/↑	N	↑↑	↑

^x Bile acids: N = values within the normal range.

↑ = 1-20 x the mean normal value
 ↑↑ = 20-40 x " " " "
 ↑↑↑ = 40-100x " " " "
 ↑↑↑↑ = > 100x " " " "

^{xx} CA/CDCA: N = values within the normal range.

↑ = 1-3 x the mean normal value
 ↑↑ = 3-6 x " " " "
 ↓ = significantly less than normal.

syndromen met cholestase, behalve bij de P.B.C. in het eindstadium (Fig. IV.4.). Bij de cirrhose was deze ratio gelijk aan 0,7 of lager, bij de complete extrahepatische obstructie en de primaire en secundaire scleroserende cholangitis was deze steeds gelijk aan 0,8 of hoger en bij de P.B.C. lag de ondergrens bij 0,6 (Fig. IV.10). Dit patroon werd eveneens gevonden door Rudman en Kendall (1957^a), Osborn e.a. (1959) en Carey (1969). Voor het onderscheid tussen de cirrhose en de syndromen met cholestase lijkt de chol/chen-ratio van diagnostische betekenis te zijn.

Er bestond een matige correlatie tussen de totale galzuurconcentratie en de chol/chen-ratio ($r_s = 0,54$) en tussen de bilirubinespiegel en de chol/chen-ratio ($r_s = 0,56$), hetgeen wel een indicatie is dat bij toenemende cholestase er wat meer kans bestaat op een hogere chol/chen-ratio. Carey (1969) beschouwde een lage chol/chen-ratio als prognostisch infaust, waarbij hij de grens bij 1,0 trok. Een overheersen van het chenodesoxycholzuur zou wijzen op een slechte leverparenchymfunctie. Uit dit onderzoek blijkt inderdaad dat bij de patiënten met de meest uitgesproken parenchymbeschadiging de laagste ratio's gevonden werden. De grens lag echter bij $\pm 0,7$ (Fig. IV.10 en Tabel IV.1.).

Het secundaire galzuur desoxycholzuur was bij de complete extrahepatische obstructie bijna steeds niet aantoonbaar in serum en indien wel aantoonbaar, was de hoeveelheid kleiner dan 0,5% van de totale galzuurconcentratie. Bij P.B.C. was dit gemiddeld 2,9% van het totaal, maar bij sommige patiënten met P.B.C. en een uitgesproken cholestase was het desoxycholzuur in het serum niet aantoonbaar. Op grond van de serum desoxycholzuurconcentratie was een onderscheid mogelijk tussen de patiënten met een complete obstructie en de kleine groep met een incomplete extrahepatische obstructie. Bij de primaire scleroserende cholangitis was het galzuurpatroon meestal gelijk aan dat van de complete extrahepatische obstructie, terwijl bij de kleine groep met een intrahepatische cholestase e.c. i. geen opmerkelijke verschillen met patiënten met P.B.C. gevonden werden (Tabel IV.1. en Tabel IV.9.).

Verrassend was de bevinding van de extreem hoge serum galzuurconcentratie (277,3 $\mu\text{g/ml}$) zonder desoxycholzuur en met een normale bilirubinespiegel in het prille begin van de cholestase bij de benigne intermitterende intrahepatische cholestase (Tabel IV.8).

Hoewel het hier maar om één patiënt gaat, was deze bevinding tot drie keer toe reproduceerbaar. Zelfs bij patiënten met een complete extrahepatische obstructie werden deze extreem hoge waarden niet gevonden en bedroeg de hoogste concentratie 116,2 µg/ml. Wanneer men het plasmavolume van deze patiënte van 8 jaar met een gewicht van 27 kg op ± 1,3 l zou schatten en de aanwezige pool aan galzuren op 0,5 à 1 g, dan betekent dit, wanneer de pool niet zou veranderen, dat zich meer dan 50% van de pool in de perifere circulatie bevindt. Dit alles wijst sterk op een abrupte onderbreking van de enterohepatische kringloop van de galzuren nog voordat er van bilirubineretentie sprake is. Deze onderbreking zou op een defect van een enzym kunnen berusten, dat betrokken is bij het actieve transport van galzuren vanuit de sinusoiden naar de levercel, bij het transport door de levercel of bij het transport van de levercel naar de canaliculi. Er zijn aanwijzingen dat voor het transport uit het bloed naar de levercel een actief transportsysteem bestaat (Glasinovic e.a., 1973). Voor galzuren lijkt een dergelijk systeem onmisbaar, aangezien dagelijks 20-30 g galzuren de lever moet passeren (Hofmann en Small, 1967). Gezien de zeer hoge galzuurwaarden en de normale bilirubinespiegel lijkt het er het meest op, dat in dit transportsysteem een defect bestaat. Zou de stop zich op het niveau van de canaliculi bevinden of nog meer distaal in de galwegen zitten, dan zou men eerder een beeld als bij de complete extrahepatische obstructie verwachten (van Berge Henegouwen e.a., 1974^d).

Omdat bekend is dat bij cholestase de sulfaatveresterde fractie van galzuren in serum in de regel niet meer dan 5% van het totaal bedraagt, werd van bepaling van deze fractie in dit onderzoek afgezien (Admirand e.a., 1972; Makino e.a., 1972; Stiehl, 1972 en 1974).

V.2.2. Monohydroxygalzuren in serum

De waarneming, dat lithocholzuur cholestase en zelfs een cirrhose kan veroorzaken in het dierexperiment, heeft geleid tot speculaties omtrent de betekenis van dit galzuur bij cholestase en cirrhose. Carey e.a. (1966 en 1966^a) vonden bij een gering aantal patiënten met cirrhose, bij wie in het serum het chenodesoxycholzuur (als voorloper van lithocholzuur) dominant aanwezig was ten

opzichte van het cholzuur, dat de lithocholzuurconcentratie hoger was dan bij patiënten, bij wie het cholzuur dominant aanwezig was in het serum. Dit leidde tot de hypothese dat een domineren van cheno-desoxycholzuur t.o.v. cholzuur bij cirrhose de leverbeschadiging kan onderhouden, omdat in dat geval een meer dan normale hoeveelheid van zijn metaboliet, het lithocholzuur, wordt gevormd in de darm.

Deze hypothese kon in dit onderzoek niet bevestigd worden bij patiënten met een cirrhose.

Door Murphy e.a. (1972) werden in het serum van patiënten met P.B.C. verhoogde concentraties van een onbekend onverzadigd monohydroxy-C₂₄-steroid aangetroffen. De bepaling geschiedde met een gecombineerde dunne laag chromatografische/fluorimetrische methode (Murphy e.a., 1970), welke sterk afwijkt van de gangbare gaschromatografische methoden. In tegenstelling tot de uitkomsten met de bij dit onderzoek gebruikte techniek werd geen goede correlatie gevonden tussen de uitkomsten van de gevoelige radio-immunologische bepalingsmethode van Simmonds e.a. (1973) en de uitkomsten van serum cholzuurbepalingen, verkregen met de methode van Murphy e.a. (1970) (A.F. Hofmann, 1974, persoonlijke mededeling). In dit onderzoek werden slechts sporen monohydroxygalzuren aangetoond bij P.B.C. en andere syndromen met cholestase. De uitkomsten varieerden van 0,0 tot 0,4 µg/ml, waarbij opgemerkt moet worden dat 0,2 µg/ml de uiterste grens van de gevoeligheid van de bepalingsmethode weergeeft. Dit waren ook te lage concentraties om de identiteit met behulp van massaspectrometrie te achterhalen. Neale e.a. (1971) en Kaplowitz e.a. (1973) vonden ook slechts sporen monohydroxygalzuren in serum bij P.B.C., terwijl Greim e.a. (1972^a) met dezelfde gaschromatografische techniek ook slechts sporen monohydroxygalzuren in leverweefsel van patiënten met een extrahepatische obstructie konden aantonen.

Door Makino e.a. (1971) en Back (1973) werden bij patiënten met intra- en extrahepatische cholestase geringe hoeveelheden monohydroxygalzuren in urine gevonden, grotendeels in de sulfaatveresterde vorm. Met behulp van massaspectrometrie kon aannemelijk gemaakt worden, dat 3 α-OH-5 β-cholaanzuur (lithocholzuur), 3 α-OH-5 α-cholaanzuur (allolithocholzuur) en 3 β-OH-Δ⁵-choleenzuur aanwezig waren. Bij het merendeel van deze patiënten bestond een com-

plete obstructie. Deze bevinding in de urine impliceert dat deze galzuren ook in serum aanwezig moeten zijn geweest, zij het in minieme concentraties. Zeer gevoelige en specifieke bepalingsmethoden zullen nodig zijn om deze geringe concentraties in serum te ontdekken. Er zijn aanwijzingen dat deze monohydroxygalzuren bij cholestase in de lever gesynthetiseerd kunnen worden via een alternatieve syntheseweg, waarbij eerst de zijketen van het cholesterolmolecuul wordt geoxydeerd (§ II.6, Fig. II.2; Javitt, 1969; Back 1973^a). Door middel van sulfaatverestering op de plaats van de 3 β - of de 3 α -hydroxylgroep kan de lever zich waarschijnlijk van deze potentieel toxische galzuren ontdoen. Slechts in een zeer zeldzaam geval, zoals het door Williams e.a. (1972) beschreven syndroom van een snel fataal verlopende cirrhose met cholestase bij neonaten, kan men zich voorstellen dat een abnormale galzuursynthese met vorming van grote hoeveelheden lithocholzuur een etiologische betekenis voor de cholestase kan hebben. Bij de etiologie van de P.B.C. en de overige onderzochte syndromen met cholestase lijkt een abnormaal galzuurmetabolisme met vorming van grote hoeveelheden monohydroxygalzuren geen rol van betekenis te spelen.

V.3. Galzuurbepalingen in B-gal (Tabel V.2.)

Bij het vergelijken van de totale concentratie galzuren in B-galmonsters blijkt de hoogste concentratie galzuren voor te komen bij de groep normale personen (Tabel IV.2.). Bij de P.B.C. was vooral het chenodesoxycholzuur duidelijk lager dan normaal. De cirrhosegroep had een zeer significant lagere totale concentratie aan galzuren dan de normale groep. Turnberg en Grahame (1970) en Bode e.a. (1971) vonden ook een sterk verminderde respons op cholecystokinine bij patiënten met levercirrhose. Door hen werd gesuggereerd dat dit zou kunnen berusten op een onvoldoende contractie van de galblaas. De galzuurconcentratie bij de cirrhose-patiënten in deze studie lag met 5,69 mg/ml (\pm 11 mmol/l) ruim boven de kritische micellaire concentratie die nodig is om in de dunne darm bij aanwezigheid van bij de lipolyse vrijkomende producten gemengde micellen te vormen. Hierbij dient echter opgemerkt te worden, dat de gal rechtstreeks in het duodenum werd opgevangen bij de nuchtere patiënt, en bijmenging met maagsap werd vermeden. Om conclusies aangaande het

lipidentransport in de dunne darm bij cirrhose te kunnen trekken, dient men dan ook jejunuminhoud tijdens een proefmaaltijd te onderzoeken (Hofmann, 1968). Vaak wordt bij cirrhose een verminderde galzuursynthese en galzuurexcretie gevonden, hetgeen gepaard kan gaan met een te lage micellaire galzuurconcentratie in het duodenum. Het gevolg hiervan kan een verminderde absorptie van vetten zijn. (Badley e.a., 1970; Miettinen en Siurala, 1971; Miettinen, 1972).

TABLE V.2. Review of the mean bile acid concentrations in bile rich duodenal fluid in patients with cirrhosis of the liver or with primary biliary cirrhosis (ranges and mean values in TableIV.2)

B-Bile	Cholic ^x acid	Chenode- ^x oxycholic acid	Deoxy- ^x cholic acid	Litho- ^x cholic acid	Total bile ^x acids	CA/CDCA ^{xx} ratio
1 Normal controls	N	N	N	N	N	N
2 Liver cirrhosis	↓↓↓	↓↓↓	↓↓	↓↓	↓↓↓	N
3 Primary biliary cirrhosis	↓	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓	↑

^x Bile acids: N = values within the normal range.
 ↓ = 50-100 % of the mean normal value
 ↓↓ = 25- 50 % " " " " "
 ↓↓↓ = < 25 % " " " " "

^{xx} CA/CDCA: N = values within the normal range.
 ↑ = significantly higher than normal

Bij normale personen werd de volgende verhouding van cholzuur : chenodesoxycholzuur : desoxycholzuur : lithocholzuur gevonden: 1,0 : 1,0 : 0,2 : 0,04. Sjövall (1960) vond 1,1 : 1,0 : 0,6 (zonder lithocholzuur) bij drie normale personen. Vlahcevic e.a. (1970^b) vonden: 1,0 : 0,8 : 0,3 : 0,07 en Malagelada e.a. (1973) vonden: 0,8 : 1,0 : 0,4 (zonder lithocholzuur). Desoxycholzuur werd in deze studie dus in geringere concentratie aangetroffen dan de overi-

ge onderzoekers vonden bij normale personen. Dit zou het gevolg kunnen zijn van een verschil in leeftijd tussen de verschillende groepen. Uit dit onderzoek werd de indruk verkregen, dat bij oudere normale personen meer desoxycholzuur in gal aanwezig was. Dit hangt mogelijk samen met een tragere darmassage op oudere leeftijd, waardoor darmbacteriën meer tijd krijgen om primaire galzuren om te zetten. Het lijkt van belang om een eventueel verband tussen het desoxycholzuurgehalte in gal en de darm passagesnelheid na te gaan, vooral daar er aanwijzingen zijn, die een verband suggereren tussen het secundaire galzuur desoxycholzuur en het ontstaan van coloncarcinomen (Pomare en Heaton, 1973). Ook zou het verschil in desoxycholzuur concentraties kunnen berusten op geografische verschillen in dieetgewoonten. Het laatste lijkt van belang te zijn, aangezien Pomare en Heaton (1973) konden aantonen, dat de hoeveelheid desoxycholzuur aanzienlijk verminderd kan worden door toevoegen van onverteerbare vezels ("zemelen") aan het dieet van proefpersonen, waarschijnlijk doordat de passage-snelheid daardoor versneld wordt.

Bij de cirrhose-patiënten in deze studie werd een verhouding gevonden van 1,0 : 1,0 : 0,2 : 0,05. Vlahcevic e.a. (1970^b) vonden bij een groep van 8 personen met een alcoholcirrhose 1,0 : 0,9 : 0,04 : 0,01. Bij drie patiënten met een bewezen alcoholcirrhose in deze studie werd geen desoxycholzuur in de gal teruggevonden in duidelijke tegenstelling tot de overige cirrhose-lyders. Dat desoxycholzuur bij de alcoholcirrhose duidelijk minder in gal voorkomt dan normaal, lijkt hiermee wel vast te staan. Bij deze patiënten waren het serum bilirubinegehalte en de alkalische-fosfatase-activiteit ongeveer gelijk aan de gemiddelde waarden in deze groep, zodat een sterkere cholestase bij deze patiënten hiervan waarschijnlijk niet de oorzaak is. Ook een effect van alcohol op de darmbacterieflora lijkt minder waarschijnlijk, daar alcohol snel in het proximale deel van de tractus digestivus wordt geresorbeerd.

Bij P.B.C. was de verhouding als volgt: 1,0 : 0,4 : 0,03 : 0,00. Hier is wel sprake van een significante daling van desoxycholzuur en chenodesoxycholzuur vergeleken met de normale groep. Hoewel de voorloper van desoxycholzuur, het cholzuur, in een relatief meer dan normale hoeveelheid aanwezig was, was het desoxycholzuur du-

delijk verlaagd. Dit kan het gevolg zijn van de cholestase bij deze patiënten. De vrij typische chol/chen-ratio in serum bij de P.B.C. en de cirrhose werd ook in gal gevonden, hoewel de ratio's bij beide groepen significant hoger waren in gal dan in serum. Dit is tegengesleld aan wat tot nu toe algemeen werd aangenomen, dat de galzuurratio's in serum en gal niet essentieel verschillend zouden zijn (Carey, 1969; Miettinen, 1973).

De solvolyse in B-galmonsters leverde als verrassende bevinding op, dat een groot deel der monohydroxygalzuren bij P.B.C.-patiënten, maar niet bij cirrhose patiënten of bij normale personen, in de sulfaatveresterde vorm aanwezig was (Tabel IV.3.). Dit wijst er in ieder geval op, dat de lever zich ook via deze excretie-route van potentieel toxische galzuren tracht te ontdoen. De toevoeging van een tweede negatieve lading (in de vorm van een sulfaatgroep) aan het lithocholzuurmolecuul verandert de fysisch-chemische eigenschappen aanzienlijk. Terwijl lithocholyl-aurine en -glycine in aanzienlijke mate geabsorbeerd werden in het jejunum van de cavia, werden de sulfaatesters hiervan nauwelijks geabsorbeerd (Low-Beer e.a., 1969).

V.4. Galzuurbepalingen in urine

Omdat verwacht werd op grond van studies van Stiehl (1972, 1973 en 1974) en Makino e.a. (1973), dat galzuurbepalingen in urine van patiënten met cholestase belangrijke informatie zouden kunnen opleveren omtrent het galzuurmetabolisme, werd bij een beperkte groep patiënten deze bepaling gedaan tegelijk met de bepaling in serum. Het bepalen van galzuren in urine leverde geen problemen op, deels omdat een groot deel van de voor serummonsters gebruikte isolatie- en gaschromatografische procedure ook voor urine kon worden toegepast, deels door toepassen van een makkelijk uitvoerbare extractiemethode m.b.v. Amberlite-XAD₂ (Makino en Sjövall, 1972). Het inlassen van een solvolyse-stap leverde als verrassende bevinding op, dat een groot deel (\pm 60%) van de in de urine aanwezige galzuren in sulfaatveresterde vorm was uitgescheiden (Tabel IV.4; Fig. IV.3, 5 en 7). In de urine van normale personen waren geen of zeer geringe concentraties galzuren aantoonbaar (Fig. IV. 1). Deze lagen benden de ondergrens van de gevoeligheid van de

bepalingsmethode ($< 0,2$ mg/l).

De chol/chen-ratio was in de urine bijna steeds veel lager dan in serum. Dit was het gevolg van een relatief sterke toename van de chenodesoxycholzuurexcretie in de urine bij cholestase-patiënten. Chenodesoxycholzuur was procentueel bijna tweemaal meer aan sulfaat veresterd dan cholzuur. In tegenstelling tot wat in het algemeen werd aangenomen, is het galzuurpatroon in de urine dus geen getrouwe copie van dat in serum (Miettinen, 1973). De relatieve toename van de chenodesoxycholzuur-uitscheiding kan erop wijzen dat de lever bij cholestase door een selectieve sulfaatverestering de ophoping van chenodesoxycholzuur, dat veel sterker detergerend en mogelijk daardoor ook toxischer is voor de lever dan cholzuur, tracht te voorkomen. Hutterer e.a. (1972) hadden op grond van in vitro studies al gewezen op dit toxische effect van chenodesoxycholzuur. Als gevolg hiervan kan men verwachten, dat bij cholestase de turnover van chenodesoxycholzuur sneller is dan die van cholzuur en daarmee omgekeerd aan wat normaal het geval is. Dit verklaart ook ten dele waarom bij cholestase in serum de chol/chen-ratio bijna steeds groter dan 1,0 is (Fig. IV.13).

Back (1973) vond een uitstekende correlatie ($r = 0,91$) tussen de serum bilirubinespiegel en de galzuurexcretie in de 24-uurs urine. In deze studie werd ook een uitstekende correlatie gevonden tussen de totale galzuurexcretie in de urine en de serum galzuurconcentratie ($r_s = 0,85$; Fig. IV.12). De conclusie is dan ook, dat hoe meer uitgesproken de cholestase is, des te meer galzuren in de urine uitgescheiden zullen worden. Niettemin valt de totale hoeveelheid per 24 uur tegen (max. 79 mg/24 uur bij de complete extrahepatische obstructie), als men aanneemt, dat dit bij een complete obstructie, misschien samen met de huid, de enige excretie-route van betekenis is.

Tussen patiënten met intra- en extrahepatische cholestase werden voor de chol/chen-ratio in urine geen verschillen van betekenis gevonden. Door Takao e.a. (1972) is gesuggereerd dat verschillen in de chol/chen-ratio van diagnostische betekenis zouden kunnen zijn bij de cholestase. Deze onderzoekers verrichtten echter geen solvolyse van de urine, waardoor hun gegevens veel aan betekenis verliezen. Het vrijwel ontbreken van desoxycholzuur in de urine kan van betekenis zijn voor de diagnostiek van een complete gal-

wegobstructie. Bij de complete extrahepatische obstructie was de hoeveelheid desoxycholzuur steeds minder dan 1,6% van de totale hoeveelheid galzuren in de urine. Bij de overige patiënten was dit steeds 1,6% of meer. Er waren echter twee uitzonderingen op deze regel. Bij deze twee patiënten (Tabel IV.4.), zonder complete afsluiting was geen desoxycholzuur aantoonbaar in de urine. Op de gehele groep onderzochte personen is dit ongeveer 10%. Dit vermindert de diagnostische betekenis van het ontbreken van desoxycholzuur in de urine voor de beoordeling van het al of niet aanwezig zijn van een complete obstructie.

Op de plaats van het lithocholzuur op het urine-chromatogram werd bij de meeste onderzochte patiënten met cholestase een piek aangetroffen, bijna steeds na solvolyse. Uitgebreid onderzoek (§ IV.5.) met verschillende stationaire fasen naar de identiteit hiervan toonde aan dat zich hierin zeer waarschijnlijk sporen lithocholzuur en 3β -hydroxy- Δ 5-choleenzuur bevonden. Tevens kon aannemelijk gemaakt worden, dat bij enkele patiënten ook sporen ursodesoxycholzuur in de urine aanwezig waren. Door Makino e.a. (1971) werden bij kinderen met een extrahepatische galgangatresie ook een aantal monohydroxygalzuren in geringe concentratie aangetoond in de urine. Back (1973) kon dit bevestigen zowel bij patiënten met intra- als extrahepatische cholestase. Ook werd door Back (1973) ursodesoxycholzuur in de urine in geringe concentraties gevonden. Makino e.a. (1971) en Back (1973) gebruikten trimethylsilyletherderivaten van galzuren, welke op een HiEff8Dp stationaire fase gaschromatografisch bepaald werden. Bij deze procedure komen de galzuren in omgekeerde volgorde te voorschijn d.w.z. degene met het hoogste molecuulgewicht eerst en die met het laagste molecuulgewicht zoals de monohydroxygalzuren het laatst. Deze analyse-methode zal voor de monohydroxygalzuren gevoeliger zijn dan de in dit onderzoek gebruikte methode, terwijl de gevoeligheid voor tri- en dihydroxygalzuren lager zal liggen (zie § IV.1.). Dit is waarschijnlijk ook de reden dat de in deze studie gevonden galzuren, hyocholzuur en een 3-ketodihydroxygalzuur, niet door de genoemde onderzoekers zijn gevonden. De aanwezigheid van deze beide galzuren wijst op nog andere onbekende syntheseswegen, die bij cholestase gebruikt worden. De aanwezigheid van hyocholzuur in aanzienlijke con-

concentraties is van groot belang, daar dit galzuur door vele onderzoekers als interne standaard wordt gebruikt, daar algemeen wordt aangenomen, dat het bij de mens niet gesynthetiseerd wordt. Het gebruik van hyocholzuur als interne standaard kan dus foutieve uitkomsten van de galzuurbepalingen tot gevolg hebben.

V.5. Serum galzuren en jeuk

Het symptoom jeuk bij cholestase wordt vrijwel zeker veroorzaakt door een ophoping van galzuren in de huid. Galzuren zijn de enige producten, die regelmatig verhoogd worden gevonden in het bloed en op de huid van patiënten met het type jeuk, dat bij cholestase voorkomt. Schoenfield e.a. (1967 en 1969) toonden significant hogere galzuurconcentraties op de huid aan bij leverpatiënten met jeuk dan bij patiënten zonder jeuk. Omdat jeuk voornamelijk subjectief wordt beleefd, is de kwantitatieve interpretatie ervan moeilijk. Het beoordelen van de jeuk vond in dit onderzoek bij de betrokken patiënten dagelijks plaats. Hierbij werd de ernst van de jeuk beoordeeld met behulp van een jeukscore (-, +, ++, +++; zie Tabel III.10.). Het verschil in serum galzuurconcentratie tussen de groep met jeuk en de groep zonder jeuk was significant ($P_w < 0,001$). Opeenvolgende bepalingen vóór en tijdens de behandeling met cholestyramine bij individuele patiënten lieten ook een zeer constante correlatie zien tussen de serum galzuurconcentratie en de jeuk. Dit was ook wel het geval voor de bilirubinespiegel en de alkalische fosfatase-activiteit, maar minder uitgesproken.

Een uitzondering hierop vormde de patiënte (pat. 4) met een benigne intermitterende intrahepatische cholestase, die in de vroege fase van een cholestaseperiode bij een nog normaal bilirubinegehalte en een extreem hoge serum galzuurconcentratie zeer ernstige jeuk had. Dit was steeds het symptoom dat het begin van een nieuwe cholestaseperiode aankondigde.

In de groep patiënten met een complete extrahepatische obstructie varieerde het symptoom jeuk nogal ondanks sterk verhoogde galzuurspiegels. In deze groep bestond geen duidelijk verband tussen de mate van jeuk en de totale serum galzuurconcentratie. In de P.B.C.-groep was de correlatie tussen de totale galzuurconcentratie en nog iets sterker van de cholzuurconcentratie en de jeuk ge-

lijk aan de correlatie tussen de bilirubinespiegel en de jeuk, terwijl die tussen de alkalische fosfatase-activiteit en de jeuk nog iets hoger lag. In de literatuur bestaat op een enkele uitzondering na (Datta en Sherlock, 1966) een redelijke eenstemmigheid over de goede correlatie tussen de serum galzuurconcentratie en de jeuk. Na het normaliseren van de serum galzuurconcentratie verdwijnt de jeuk (Carey en Williams, 1961; van Itallie e.a., 1961; Neale e.a., 1971; Murphy e.a. 1972). Osborn e.a. (1959) vonden wel hogere galzuurconcentraties bij patiënten met jeuk, maar ook bestond er een aanzienlijke overlap tussen de patiënten met en die zonder jeuk. De goede correlatie tussen het serum cholzuur en de jeukscore ($r_s = 0,81$) was in deze studie weliswaar geen verrassende, doch wel een nieuwe bevinding. Er bestond een duidelijke overlap tussen patiënten met jeuk en zonder jeuk bij een serum cholzuurconcentratie van 2,5 - 7,5 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. IV.14). 8 Patiënten met een lichte jeuk (score +) hadden cholzuurconcentraties van 2,5 - 7,5 $\mu\text{g/ml}$ (normaal $<1,0$), terwijl alle patiënten zonder jeuk serum concentraties hadden lager dan 7,5 $\mu\text{g/ml}$. Deze discrepantie kan waarschijnlijk verklaard worden door de subjectieve beoordeling van jeuk in de groep met lichte jeuk (+). Krabeffecten waren immers niet aanwezig in deze groep. Verder zou de mate van binding van galzuren aan plasma eiwitten ook een rol kunnen spelen. Deze factor kan van belang zijn bij het transport van galzuren naar de huid, waar uiteindelijk de jeukprikkel ontstaat.

V.6. Het verband tussen verschillende chemische parameters van cholestase onderling en de ziekteduur

De chemische gevolgen van cholestase vindt men weerspiegeld in de aanwezigheid in plasma van (bijna) alle producten, die normaal via de gal uitgescheiden worden. Hoewel de secretie in de gal van deze producten via een aantal verschillende mechanismen loopt, kan men de ernst van de cholestase goed beoordelen aan de hand van serum bepalingen van geconjugeerd bilirubine, de alkalische fosfatase- en 5'-nucleotidase-activiteit en ook van de galzuurconcentratie. Daarom leek het van belang de correlatie tussen deze parameters in het serum van patiënten met cholestase en van patiënten met cirrhose te onderzoeken. Dit heeft te meer zin omdat bekend is,

dat sommige parameters zoals de alkalische fosfatase-activiteit bij ernstige extrahepatische obstructies soms maar matig verhoogd zijn (Stern e.a., 1973). Bij de patiënten zonder complete extrahepatische obstructie bestond een goede correlatie tussen het serum bilirubinegehalte en de totale galzuurconcentratie ($r_s = 0,82$; Fig. IV.15). Osborn e.a. (1959) vonden bij patiënten met leverziekten een correlatiecoëfficiënt van 0,71 en Neale e.a. (1971) van 0,76.

In de gehele groep van 65 patiënten correleerde het serum cholzuur beter dan de andere galzuren met de overige parameters (Tabel IV.10.). Dit suggereert, dat het serum cholzuur een gevoelige parameter is voor cholestase. Interessant is ook de goede correlatie tussen de ziekteduur en de 5'-nucleotidase- en alkalische fosfatase-activiteit, wanneer de cirrhose-groep buiten beschouwing wordt gelaten. Ook bij de patiënten met P.B.C. springt het cholzuur er als beste parameter uit (Tabel IV.5.). Opvallend is hier de uitstekende correlatie tussen de serum galzuren enerzijds en de bilirubine en de sgot anderzijds. Dit laatste suggereert, dat er bij deze groep patiënten met langdurige cholestase enig verband bestaat tussen de retentie van galzuren en de leverparenchymbeschadiging. Retentie van galzuren zou de oorzaak van de leverparenchymbeschadiging kunnen zijn, doch het omgekeerde is ook mogelijk. Opvallend in de kleine groep met een complete extrahepatische obstructie is het ontbreken van enige correlatie tussen de serum bilirubinespiegel en de alkalische fosfatase-activiteit (Tabel IV.6.). Dit is het gevolg van de grote spreiding van de alkalische fosfatase-activiteit en de relatief geringe spreiding van de bilirubinespiegel. Er is al gewezen op het ontbreken van enig verband tussen de serum galzuurconcentratie en de bilirubinespiegel in deze groep (Fig. IV.6). Een discrepantie tussen de serum galzuurconcentratie en de bilirubinespiegel zou kunnen ontstaan, wanneer bij een complete cholestase het bilirubine- en het galzuurmetabolisme verschillend zijn. Wat het dagelijks aanbod van bilirubine aan de lever betreft mag verwacht worden, dat het normaal is of zelfs groter dan normaal (Werre, 1972), terwijl de excretie van geconjugeerd bilirubine via de nier beperkt is. Hoewel ook de excretie van galzuren via de nier beperkt is, kan toch door de stopzetting of sterke vermindering van de synthese van galzuren in de lever (Dowling e.a., 1971) geleidelijk weer een daling van de serum galzuurconcent-

tratie ontstaan. Een eenmalig onderzoek zoals hier is geschied by een kleine groep patiënten met een complete obstructie, heeft waarschijnlijk weinig zin voor het onderzoeken van bepaalde correlaties. Dit zou beter kunnen geschieden aan de hand van opeenvolgende bepalingen by patiënten, waarbij het er om gaat te onderzoeken hoe by het voortduren van de cholestase de bilirubine- en galzuurwaarden zich ten opzichte van elkaar gaan verhouden.

V.7. Het effect van cholestyramine, fenobarbital en galwegdrainage op de serum galzuurconcentratie, de jeuk en de leverfunctieproeven by cholestase

V.7.1. Cholestyramine

Het basische, niet absorbeerbare, anionen uitwisselende resine, cholestyramine, is effectief gebleken by het bestrijden van jeuk by cholestase door een incomplete obstructie. Dit werd in het huidige onderzoek bevestigd. Dit ging gepaard met een zeer significante daling van de serum galzuurconcentratie.

Wanneer een retentie van galzuren in de lever de cholestase en de leverbeschadiging zou kunnen versterken, dan lijkt het zinvol dit tegen te gaan (§ II.6 en 8). Er werd daarom een poging gedaan om tijdens een kortdurend experiment het effect van cholestyramine op de chemische parameters van de cholestase te bepalen (Fig. IV. 16). Het bilirubinegehalte daalde zeer significant, de alkalische fosfatase-activiteit daalde niet significant, terwijl de serum transaminasen ook significant daalden. De chol/chen-ratio vertoonde een geringe neiging tot hogere waarden tijdens cholestyramine behandeling. Al met al ziet men over de hele lyn een verbetering van de chemische parameters van de cholestase optreden, hetgeen suggereert, dat de galafvloed naar de darm beter functioneert onder invloed van cholestyramine. Het gebruik van dit middel is by cholestase door een incomplete obstructie dus zeker aanbevelenswaardig. Hierby dient men er rekening mee te houden, dat het middel zeer lang moet worden gebruikt. Dit kan aanleiding geven tot anorexie, obstipatie en malabsorptie van vet en vetoplosbare vitaminen. Waarschijnlijk ontstaat door de verminderde aanvoer van galzuren naar de lever door het gebruik van cholestyramine, een sti-

mulatie van de hydroxylerings-enzymen in de levercelmicrosomen- o.a. van het cholesterol- 7 α -hydroxylase- en daarmee een verhoogde synthese van galzuren. Bij gezonde personen gaat dan de productie van trihydroxygalzuren (cholylglycine) overheersen (Garbutt en Kenney, 1972). Wanneer dit ook het geval is bij patiënten met cholestase, zou dit kunnen betekenen, dat door de betere oplosbaarheid van deze galzuren in de vorm van micellen ook de afvoer van potentieel toxische monohydroxygalzuren effectiever zou kunnen plaats vinden. Door Sharp e.a. (1967) werden indrukwekkende verbeteringen gemeld bij kinderen met een partiële atresie van de intrahepatische galwegen onder invloed van 8 - 16 g cholestyramine per dag. Dit zou kunnen betekenen, dat het schadelijke effect van gerefineerde galzuren bij cholestase op de levercel kan worden teruggedrongen. Het lijkt niet uitgesloten, dat bij P.B.C. het primaire proces op deze wijze kan worden afgeremd. Op grond hiervan bestaat er grote behoefte aan een longitudinaal prospectief onderzoek om het effect van dit middel op de cholestase te onderzoeken. Regelmatige histologische controle is hierbij van belang.

V.7.2. Fenobarbital

Fenobarbital veroorzaakt bij patiënten met een incomplete cholestase een daling van het serum bilirubinegehalte (Crigler en Gold, 1966). Dit fenomeen wordt toegeschreven aan stimulatie van de glucuronidering van de bilirubine door enzyminductie.

Onlangs hebben een aantal onderzoeken ook een positief effect van fenobarbital op de galsecretie aangetoond bij de mens (Sharp en Mirkin, 1972; Stiehl en Admirand, 1972; Redinger en Small, 1973). Dit effect zou berusten op een stimulatie van zowel de niet van galzuren afhankelijke, als van de van galzuren wel afhankelijke galsecretie. In dit onderzoek werd de invloed van fenobarbital slechts bij één patiënt met een benigne intermitterende intrahepatische cholestase kortdurend nagegaan (Fig. IV.9). Hierbij kon worden aangetoond, dat fenobarbital een sterke daling van de serum galzuurconcentratie en de bilirubinespiegel veroorzaakte, terwijl de uitscheiding van urobilinogeen in de feces toenam. Ook het secundaire galzuur desoxycholzuur nam relatief in het serum toe. Dit alles wijst op een toename van de galafvloed naar de darm.

Door het middel in een dosering van driemaal daags 25 mg overdag en 's avonds voor het slapen 100 mg toe te dienen, werd het sederende effect overdag enigszins beperkt. Deze ene waarneming toont wel aan, dat fenobarbital, mits hoog genoeg gedoseerd (2,5 - 5 mg/kg), een gunstig effect heeft bij deze vorm van cholestase.

V.7.3. Galwegdrainage

Door het aanleggen van een galdrain werd getracht bij patiënten met cholestase de galafvloed te verbeteren. Het gevolg hiervan was, dat de jeuk direct na de operatie verdween. De serum galzuren die na 3 à 5 dagen bepaald werden, waren ook sterk gedaald (Fig. IV.17). Op grond van deze waarneming moet men aannemen, dat de galzuren na deze ingreep snel uit de huiddepôts verdwijnen. In principe werd met galwegdrainage hetzelfde effect, maar dan veel sneller en meer uitgesproken, als met cholestyramine verkregen op de klinische en chemische verschijnselen van cholestase. De enterohepatische kringloop van galzuren, zo die nog enigszins functioneerde, werd met een uitwendige galwegdrainage volledig onderbroken. Hierdoor wordt de synthese van galzuren in de lever maximaal en kunnen waarden van 1,5-2,0 g/24 uur bereikt worden, terwijl de synthese normaal 0,2-0,5 g/24 uur bedraagt (Hofmann, 1968; Dowling e.a., 1970). Ook het serum cholesterolgehalte daalde duidelijk als uiting van deze verhoogde galzuursynthese. Dit was bij de cholestyraminegroep niet het geval, waarschijnlijk omdat zich bij de gebruikte dosis cholestyramine (8-12 g/dag) snel een nieuw evenwicht instelt tussen afbraak en synthese van cholesterol. Bij galwegdrainage is het verlies en de synthese van galzuren maximaal. Dan zal ook niet snel een evenwicht tussen synthese en afbraak van cholesterol ontstaan, maar wel een aanzienlijk verlies van cholesterol.

Bij drie patiënten, bij wie een aantal opeenvolgende bepalingen in serum en gal tijdens drainage verricht werden, ontstond na 4 à 7 dagen een evenwichtssituatie, waarbij de uitscheiding van galzuren per ml gal constant bleef (Fig. IV.8, 18 en 19). De synthese van galzuren had dan zijn maximum bereikt. Thureborn (1962) en Nilsson (1970) onderzochten normale personen, bij wie na een cholecystectomie een galdrain was aangelegd. Zij stelden vast, dat na 1 à 2 dagen reeds een plateau in de uitscheiding van galzuren werd bereikt. Dowling e.a. (1970) vonden bij rhesusapen reeds na

± 12 uur een constante galproductie, waarbij ook de uitscheiding van galzuren constant bleef. Dat zich bij onze patiënten pas enige dagen later een evenwicht instelde, kan verklaard worden uit het feit, dat het hier ging om patiënten met een ernstige cholestase door een (bijna) complete obstructie van de galwegen. Hierbij mag men een sterk toegenomen verspreiding van de galzuren over de diverse lichaamscompartimenten verwachten. Ook zal de galproductie door de retentie van galzuren in de lever en de verhoogde druk die lange tijd in het galwegsysteem geheerst heeft, slechts geleidelijk weer op gang komen. Onze gegevens komen overeen met resultaten van experimenten van Strasberg e.a. (1971), die na het opheffen van een langdurig verhoogde druk in het galwegsysteem bij apen, lieten zien, dat het 4 à 6 dagen duurde voor zich weer een evenwicht in de excretie van galzuren had ingesteld.

V.8 De betekenis van veranderingen in het galzuurmetabolisme, die optreden bij cholestase en cirrhose

V.8.1. Kwantitatieve veranderingen in het galzuurmetabolisme

8.1.1. Cholestase

Bij cholestase bestaat er een gehele of gedeeltelijke onderbreking van de enterohepatische kringloop van galzuren. Afhankelijk van de ernst van de cholestase zullen geringe hoeveelheden galzuren via de vena portae, waarin de druk onder deze omstandigheden ook vaak verhoogd is (Small e.a., 1972), de lever bereiken. De pool is verdeeld over de gehele extracellulaire ruimte. Een deel van de galzuren bereikt dan de lever via de arteria hepatica. Verder zal waarschijnlijk een aanzienlijk deel van de pool in de lever gereteneerd blijven (Small e.a., 1972). Het gevolg hiervan is, dat ondanks de beperkte aanvoer van galzuren via de vena portae de synthese van primaire galzuren sterk wordt onderdrukt. Dowling e.a. (1971) toonden dit in experimenten met apen aan. Een complete obstructie van de galwegen bij deze dieren leidde tot een totale stopzetting van de synthese van galzuren in de lever. Dit gaat waarschijnlijk via een alles of niets principe (§ II.6.), waarbij de kritisch remmende concentratie van galzuren in de levercel de bepalende factor is. Bij kortdurende experimenten (24 uur) konden

Dowling e.a. (1971) slechts een verlies van minder dan 7% van de totale pool aantonen in de urine van deze proefdieren. Ook bij een langdurige obstructie is de synthese aanzienlijk verminderd of stopgezet (Norman en Standvik, 1971). Bij het beoordelen van het galzuurmetabolisme bij cholestase is het van belang na te gaan in hoeverre de galsecretie nog functioneert. Ook dient men de poolgrootte en de verdeling van de pool over de verschillende lichaamscompartimenten te bepalen. Tenslotte is de synthesesnelheid van de galzuren van belang om een meer volledige indruk te krijgen van de galzuurstofwisseling. Gegevens hieromtrent kunnen worden verkregen door het inspuiten van radio-actief gemerkte galzuren. Voor een overzicht hiervan wordt verwezen naar Heaton (1972). Een moeilijk punt bij de interpretatie van de resultaten, die met deze techniek bij patiënten met cholestase verkregen kunnen worden, is het feit, dat men vaak niet van een evenwichtssituatie kan spreken bij cholestase.

Wanneer er sprake is van een complete obstructie van de galwegen, worden weinig of geen galzuren in de feces uitgescheiden. De vetabsorptie is gewoonlijk licht gestoord en de vitaminen A, D, E en K worden slecht geabsorbeerd. De galzuren verdelen zich over de gehele extracellulaire ruimte en de nier - mogelijk samen met de huid - wordt de voornaamste excretie-route. De totale excretie per 24 uur is echter beperkt, zoals werd aangetoond (Tabel IV.4.). Bij de complete extrahepatische obstructie varieerde de excretie van 31 - 80 mg/24 uur. Voor de totale hoeveelheid galzuren, die normaal 2 à 4 g bedraagt, is dit een gering verlies. De renale excretie van galzuren is complex. Deze is afhankelijk van de eiwitbinding van galzuren in het plasma (Rudman en Kendall, 1957; Burke e.a., 1971), en van de mate van tubulaire terugresorptie (Weiner e.a., 1964). Ook de mate van sulfaatverestering speelt een belangrijke rol. Uit dit onderzoek is gebleken, dat er een uitstekende correlatie bestaat tussen de serum galzuurconcentratie en de renale excretie van galzuren (Fig. IV.12).

Bij een partiële galwegobstructie gebeurt hetzelfde, alleen is hier de galzuurconcentratie in de vena portae hoger, daar er nog enige uitscheiding naar de darm bestaat.

8.1.2. Cirrhose

Bij de cirrhose zullen de kwantitatieve veranderingen in het galzuurmetabolisme van een groter aantal factoren afhankelijk zijn dan bij de cholestase. Op de eerste plaats zijn er aanwijzingen dat bij de cirrhose de synthese van galzuren door de individuele levercel lager is dan normaal. Miettinen (1971) kon aantonen dat door toediening van cholestyramine aan cirrhose-patiënten de hoeveelheid galzuren in de feces maar nauwelijks toenam. Dit zou mogelijk ook samen kunnen hangen met het feit, dat de galzurexcretie door de lever bij patiënten met levercirrhose niet adequaat reageert op prikkels uit de darm, zoals o.a. cholecystokinine (§ V.3.). Verder is de verdeling van de galzuren over het lichaam van belang. Zo kan b.v. ascitesvocht een mogelijk niet onbelangrijk deel van de pool bevatten. Bovendien kan de aanwezigheid van shunts tussen de portale en de grote circulatie aanzienlijke variaties vertonen. Indien de serum galzuurconcentratie slechts matig verhoogd is en de totale bloedstroom naar de lever is verminderd, dan kan het gebeuren, dat de totale hoeveelheid galzuren, die de lever binnenstroomt, tekort schiet om de galzuursynthese te remmen. Het gevolg is een verhoogde synthesesnelheid van galzuren (Blum en Spritz, 1966). Indien een cirrhose-patiënt ascites heeft, dan zou de pool aanzienlijk toe kunnen nemen, terwijl door de relatief mindere leverfunctie de serum galzuurconcentratie zodanig kan stijgen, dat de synthese in de lever daalt (Vlahcevic e.a., 1971^a). De galzuursynthese kan dus aanzienlijke schommelingen vertonen.

Bij de cirrhose-patiënten uit dit onderzoek werden de hoogste galzuurconcentraties in het serum gemeten bij de patiënten met een hepato-cerebrale intoxicatie en bij de patiënt met een goed functionerende portocavale shunt, die leed aan een ernstige hepato-cerebrale intoxicatie. Het lijkt de moeite waard om de relatie tussen serum galzuren en de mate van hepato-cerebrale intoxicatie bij patiënten met een cirrhose te onderzoeken.

V.8.2. Kwalitatieve veranderingen in het galzuurmetabolisme

De chol/chen-ratio in serum weerspiegelt niet alleen verschillen in synthese, maar ook verschillen in renale excretie, in poolgrootte, in het aantal enterohepatische circulaties per tijds-

eenheid en in klaring door de lever van primaire galzuren. In dit onderzoek werd een poging gedaan door het tegelijk bepalen van galzuren in serum, gal en urine van patiënten met cholestase en cirrhose om kwalitatieve veranderingen in het galzuurmetabolisme op te sporen.

8.2.1. Cholestase

Op grond van de overwegingen, genoemd in §V.8.1. mag men aannemen, dat afhankelijk van de ernst van de cholestase, de synthese van primaire galzuren verminderd is. Bij normale personen is de synthese van cholzuur met gemiddeld 333 mg/dag bijna tweemaal zo groot als die van chenodesoxycholzuur, terwijl de cholzuurpool met gemiddeld 1,04 g iets groter is dan die van chenodesoxycholzuur (0,81 g; Vlahcevic e.a., 1971). De turnover van cholzuur is onder normale omstandigheden dus veel hoger dan die van chenodesoxycholzuur. De zeer geringe concentratie in serum, gal en urine van het secundaire galzuur desoxycholzuur is het gevolg van de verminderde hepato-enterale circulatie van de galzuren. De aanzienlijke verschillen tussen de chol/chen-ratio's in serum, gal en urine wijzen op een verschillend metabolisme van cholzuur en chenodesoxycholzuur. Bij cholestase was de chol/chen-ratio in serum bijna steeds groter dan normaal (meestal $> 1,5$). In de gal van P.B.C.-patiënten bleek deze ratio significant hoger te zijn dan in serum (Fig. IV.2). In de urine lag deze ratio bijna steeds duidelijk beneden de ratio in serum en vaak zelfs onder de 1,0. Dit geeft aanleiding tot de volgende overwegingen betreffende de onderlinge verschillen in het metabolisme van de primaire galzuren als gevolg van cholestase:

1. De hogere chol/chen-ratio in serum dan in urine wijst op een selectief verhoogde renale excretie van chenodesoxycholzuur. De oorzaak hiervan is waarschijnlijk het feit, dat bijna tweemaal zoveel chenodesoxycholzuur als cholzuur in sulfaatveresterde vorm aanwezig is in de urine. Deze sulfaatesters kunnen in de lever worden gevormd onder pathologische omstandigheden (Palmer, 1971) en zij worden zeer snel in de urine uitgescheiden. Dit is ook de reden, dat men deze niet of nauwelijks in serum terugvindt (Admirand e.a., 1972; Makino e.a., 1972; Stiehl, 1974). Makino e.a. (1972) vonden minder dan 5% van de totale hoeveelheid galzuren

in de sulfaatveresterde vorm in serum van patiënten met icterus. De sulfaatveresterde fractie in serum bestond bijna steeds alleen uit chenodesoxycholzuur.

2. De hogere chol/chen-ratio in gal vergeleken met die in serum bij patiënten met P.D.C. kan niet worden toegeschreven aan een foutieve bepaling van het chenodesoxycholzuur, daar bij een deel der patiënten ook de sulfaatveresterde fractie van dit galzuur in gal werd bepaald (Tabel IV.3.). Wel zou het kunnen wijzen op een selectief verhoogde canaliculaire secretie van cholzuur ten opzichte van chenodesoxycholzuur.

Een tweede mogelijkheid is, dat chenodesoxycholzuur in de lever wordt omgezet in cholzuur. Deze laatste syntheseseweg is onlangs door Samuels en Palmer (1973) aangetoond bij patiënten met cholestase en een afgesloten galdrain. Het is echter nog onbekend welke kwantitatieve betekenis aan deze syntheseseweg moet worden toegekend.

3. Wanneer men aanneemt dat bij de minder ernstige cholestase nog enige synthese van primaire galzuren in de lever plaatsvindt, dan kan het verschil in chol/chen-ratio tussen serum en gal ook nog wijzen op een hogere synthese van cholzuur dan van chenodesoxycholzuur. In dit onderzoek werd bij nuchtere patiënten galblaasgal 's ochtends geheveld voor onderzoek.

Het feit, dat door sommige onderzoekers en ook in deze studie monohydroxygalzuren in de urine van patiënten met een incomplete of een complete cholestase konden worden aangetoond (§ IV.5.), wijst erop, dat deze galzuren als gevolg van de cholestase in de lever gesynthetiseerd kunnen worden via een abnormale syntheseseweg (Fig. II.2.).

Het vinden van ursodesoxycholzuur in de urine van patiënten met cholestase kan wijzen op een omzetting van chenodesoxycholzuur in ursodesoxycholzuur in de lever of op een primaire synthese van ursodesoxycholzuur. Het ursodesoxycholzuur is veel minder detergentend en relatief inert vergeleken met het chenodesoxycholzuur en andere α -dihydroxygalzuren. Een mogelijk door darmbacteriën geïnduceerde omzetting van chenodesoxycholzuur in ursodesoxycholzuur kan in aanzienlijke hoeveelheden plaatsvinden, wanneer patiënten met cholesterolgalstenen belast worden met chenodesoxycholzuur (Salen e.a., 1974). Bij ratten is aangetoond

dat na galwegonderbinding aanzienlijke hoeveelheden ursodesoxycholzuur in de lever kunnen worden gevormd (Greim e.a., 1972).

Als conclusie kan men stellen, dat tijdens cholestase via een aantal alternatieve syntheseswegen in de lever een retentie van te grote concentraties chenodesoxycholzuur, dat veel sterker detrigerend en toxisch is dan cholzuur, wordt tegengewerkt. Relatief inerte metaboliëten worden gesynthetiseerd in de vorm van sulfaatesters, trihydroxygalzuren (cholzuur) en van β -hydroxygalzuren (ursodesoxycholzuur). Het gevolg hiervan is een relatief grotere cholzuurpool. Het kan zijn, dat de tol, die men hiervoor betaalt, meer jeuk is. De goede correlatie tussen jeuk en serum cholzuurconcentratie lijkt hiermee in overeenstemming. De synthese van monohydroxygalzuren, die overigens wel groten-deels aan sulfaat worden gekoppeld, lijkt minder aantrekkelijk. Kwantitatief spelen zij echter een ondergeschikte rol.

8.2.2. Cirrhose

Bij cirrhose, veroorzaakt door chronisch alcoholmisbruik, was de synthese van cholzuur gemiddeld 84 mg/dag en minder dan die van chenodesoxycholzuur (114 mg/dag). De totale cholzuurpool was met een gemiddelde van 0,48 g ook ten opzichte van de chenodesoxycholzuurpool (0,62 g) significant verminderd (Vlahcevic e.a., 1972). De gegevens suggereren dat eerder een sterke vermindering van de cholzuursynthese dan van de chenodesoxycholzuursynthese verantwoordelijk is voor de kleinere galzuurpool dan normaal bij de cirrhose. Het onderzoek van Vlahcevic e.a. (1972) liet verder zien dat de turnover van cholzuur aanzienlijk trager verliep dan die van chenodesoxycholzuur. Dit is geheel tegengesteld aan de bevindingen bij gezonde personen. De chol/chen-ratio in serum bij cirrhose-patiënten in deze studie was steeds gelijk aan 0,7 of kleiner, terwijl die in gal bij alle patiënten duidelijk hoger was en niet essentieel verschillend van die in gal van normale personen (Fig. IV.10). Bij slechts twee patiënten in deze groep werd de urine onderzocht (Tabel IV.4.). De chol/chen-ratio in de urine was éénmaal ongeveer gelijk aan die in serum en éénmaal veel kleiner dan die in serum. De mate van sulfaatverestering in urine was verder geheel vergelijkbaar met die van cholestase-patiënten. Wanneer men aanneemt dat

ook in de groep cirrhose-patiënten in deze studie de synthese van primaire galzuren verminderd is, dan zou de bevinding van de hogere chol/chen-ratio in gal dan in serum enigszins in tegenspraak zijn met de bevindingen van Vlahcevic e.a. (1972). Onze gegevens zouden op een hogere synthese van cholzuur dan van chenodesoxycholzuur kunnen wijzen. Dit lijkt echter niet waarschijnlijk. Het zal eerder zo zijn, dat een selectief verhoogde canaliculaire uitscheiding van cholzuur door de lever en een relatief hoge sulfaatverestering van chenodesoxycholzuur in dit verband een belangrijke rol spelen.

Door Carey (1969) is gesuggereerd, dat de primaire synthese van cholzuur gestoord zou kunnen zijn bij cirrhose-patiënten door het ontbreken of door remming van het cholesterol-12 α -hydroxylase. Hoewel het misschien niet terecht is om gegevens van patiënten met een alcoholcirrhose met die van andere cirrhoseliëders te vergelijken, wijzen de studies van de groep van Vlahcevic (1972) sterk op een verminderde cholzuursynthese bij de cirrhose. Het zou zelfs zo zijn, dat de mate van cholzuursynthese bij de (alcohol)cirrhose een zeer gevoelige parameter is voor de leverparenchymfunctie en voor de prognose (McCormick e.a., 1973). Op grond van de huidige studie kan hetzelfde gezegd worden van de chol/chen-ratio in serum.

Samenvatting

Galzuren en cholestase

Galzuurbepalingen in serum, gal en urine met behulp van de gaschromatograaf bij patiënten met cholestase.

VI.1. Inleiding

Galzuurbepalingen in serum, gal en urine van patiënten met naar klinische, biochemische, serologische en histologische criteria te onderscheiden cholestatistische syndromen werden op hun diagnostische waarde getoetst. De gaschromatografische bepalingsmethode werd gekozen wegens haar gevoeligheid en betrouwbaarheid, terwijl ook een aanzienlijke mate van nauwkeurigheid bereikt kon worden.

In dit onderzoek werd niet getracht onderscheid te maken tussen geconjugeerde en vrije galzuren, evenmin tussen aan glycine of aan taurine geconjugeerde galzuren.

Stoornissen in het galzuurmetabolisme bij cholestase kunnen onderzocht worden met galzuurkinetiek-studies en met chemische bepalingen van galzuren in de verschillende lichaamsvloeistoffen. Kinetiek-studies werden in dit onderzoek niet verricht. Door het gelijktijdig bepalen van galzuren in serum, gal en urine wordt slechts een momentopname verkregen. Niettemin kunnen op deze wijze zowel kwalitatieve als kwantitatieve aspecten van stoornissen in het galzuurmetabolisme bij cholestase bestudeerd worden. Een vergelijking van de uitkomsten van het onderzoek van serum, gal en urine zou mogelijk het inzicht in de pathogenese van de verschillende vormen van cholestase kunnen verdiepen en zo een bijdrage in de diagnostiek kunnen leveren. In hoofdstuk II wordt een overzicht gegeven over de huidige stand van zaken betreffende het galzuurmetabolisme onder normale en onder pathologische omstandigheden, met name bij de cholestase. De synthese van galzuren (Fig. II.1. en Fig. II.2) en het mechanisme van de galsecretie worden hierin ook behandeld. Met het oog op het huidige onderzoek kwamen hieruit een aantal vragen naar voren:

VI.2. Vraagstelling en doelstelling van het onderzoek

Is er bij de verschillende cholestatische syndromen een bepaald galzuurpatroon in serum, gal of urine aantoonbaar dat een aanvulling zou kunnen betekenen van de gebruikelijke diagnostische hulpmiddelen?

Zijn er correlaties aantoonbaar tussen de galzuurpatronen in serum, gal en urine? en is de chol/chen-ratio in serum, gal en urine al dan niet dezelfde?

Bestaat er verband tussen de ziekteduur en de galzuurpatronen in serum en de overige biochemische parameters?

Zijn met de toegepaste methoden ook monohydroxy-galzuren aantoonbaar?

Is er verband tussen een bepaald galzuurpatroon en de jeuk?

Verder leek het van belang de effecten van een aantal behandelingsmethoden, in casu cholestyramine, fenobarbital en galwegdrainage op de galzuurpatronen in serum, de jeuk en de biochemische parameters na te gaan.

VI.3. Onderzochte personen (Hfdst. III, Tabel III.11 t/m 16)

Bij het onderzoek waren 30 gezonde personen betrokken, 18 patiënten met een levercirrhose, 19 patiënten met een P.B.C., 13 patiënten met een complete extrahepatische obstructie, 3 patiënten met een incomplete extrahepatische obstructie, 4 patiënten met een primaire en 2 patiënten met een secundaire scleroserende cholangitis, 5 patiënten met een benigne intermitterende intrahepatische cholestase, waarvan 4 patiënten familiebanden hadden en 4 patiënten met een intrahepatische cholestase e.c.i. De gezonde personen en de patiënten met een levercirrhose waren genomen als controlepersonen om hen met de bovengenoemde cholestatische syndromen te kunnen vergelijken.

VI.4. Bepalingsmethoden (Hfdst. III)

Voor het vergelijken van de galzuurpatronen werd gebruik gemaakt van de totale galzuurconcentratie, de primaire ratio (chol/chen-ratio) en de aanwezigheid van desoxycholzuur en lithocholzuur. Bij de isolatie van galzuren uit serum werd eerst een enzy-

matische hydrolyse gedaan vóór de eiwit precipitatie. Daarna volgde een zuivering volgens Roovers e.a. (1968) en een vloeistofextractie met diethylether (Tabel III.1.). Bij de routine-bepaling in gal werden de eiwit precipitatie- en de speciale zuiveringstap weggelaten. Galmonsters van een aantal patiënten met cholestase, met cirrhose en van normale personen werden herhaald nadat een solvolyse aan de isolatieprocedure was toegevoegd. Bij de bepaling in urine werden de galzuren eerst geëxtraheerd met behulp van Amberlite-XAD₂ (Makino en Sjövall, 1972), waarna een solvolyse volgde (Palmer, 1967). Het residu werd hierna opgelost in water waarna enzymatische hydrolyse volgde en extractie met diethylether. Zowel bij de bepalingen in serum als in gal en urine werden trifluoracetaatmethylesterderivaten van galzuren bereid welke gaschromatografisch bepaald werden op een kolom met 1% OV-210, op gaschrom Q, als stationaire fase.

Met 7-ketodesoxycholzuur als interne standaard werd een goede scheiding van de individuele galzuren: cholzuur, chenodesoxycholzuur, desoxycholzuur en lithocholzuur verkregen (Tabel III.2; Fig. III.1). Er bestond een lineaire correlatie tussen de dosis en de respons op de gaschromatograaf (Fig. III.4. en Fig. III.5). Recoveryexperimenten met ongeconjugeerde en geconjugeerde galzuren, toegevoegd aan water, serum, gal en urine toonden een goede reproduceerbaarheid aan (Tabel III.3., III.4.). Controle-bepalingen van serum cholzuur met behulp van een radioimmunoassay (Simmonds e.a., 1973) werden verricht in de Mayo Clinic (Rochester, Minnesota) door Dr. A.F. Hofmann. Deze uitkomsten correleerden zeer goed met die van onze gaschromatografische methode (Fig. III.6). Het enige verlies van betekenis, voornamelijk van cholzuur en lithocholzuur, trad op tijdens de enzymatische hydrolyse. Speciale aandacht werd geschonken aan de zuivering en de diethyletherextractie om het verlies van galzuren tijdens deze fasen tot een minimum te beperken. De recovery van geconjugeerde galzuren was 80-95% voor serum, 83-100% voor gal en 75-81% voor urine. Ook duplo-bepalingen in serum (Tabel III.7), in gal (Tabel III.8) en in urine (Tabel III.9) lieten een goede reproduceerbaarheid zien.

De bepalingmethoden in serum en gal zijn uitvoerig elders gepubliceerd (van Berge Henegouwen e.a., 1974^b). In nuchter serum

van normale personen werden galzuurconcentraties aangetroffen die varieerden van 0,3-2,5 $\mu\text{g/ml}$, hetgeen geheel overeenkomt met de uitkomsten van andere onderzoekers, die met vergelijkbare technieken verkregen zijn (Tabel III.5). In gal van normale personen, die na cholecystokinine-stimulatie in het duodenum opgevangen werd met behulp van een Dreiling sonde met dubbel lumen, werd gemiddeld 27,24 mg/ml ($\pm 6,84$) voor de totale galzuurconcentratie aangetroffen (Tabel III.6). In urine van normale personen werden geen of slechts spoortjes galzuren aangetroffen, waarvan de concentratie beneden de ondergrens van de gevoeligheid van de bepalingsmethode lag ($< 0,2 \text{ mg/l}$; Fig. IV.1).

VI.5. Resultaten (Hfdst. IV)

VI.5.1. Serum

De hoogste serum galzuurconcentraties werden gevonden bij de complete extrahepatische obstructie, de laagste bij de cirrhose (Tabel IV.1). In de regel was de serum galzuurconcentratie hoger naarmate de cholestase, gemeten aan het serum bilirubinegehalte meer uitgesproken was (Fig. IV.10). Dit ging voor de groep met een complete extrahepatische obstructie niet op. Hier was geen duidelijk verband tussen de hoogte van de serum galzuurconcentratie en de bilirubinespiegel (Fig. IV.6).

In de cirrhose-groep hadden patiënten met tekenen van een hepato-cerebrale intoxicatie een totale serum galzuurconcentratie die ruim tweemaal zo hoog was als het gemiddelde in deze groep.

De chol/chen-ratio was het hoogst in de groep met een complete extrahepatische obstructie en het laagst, zelfs significant lager dan normaal, in de cirrhosegroep (Fig. IV.10). De ratio was in het algemeen lager bij patiënten met een P.B.C. in de latere stadia (III en IV), doch het verschil met de vroegere stadia (I en II) was niet significant (Fig. IV.4).

Het serum desoxycholzuur was meestal zowel bij de intrahepatische als de complete extrahepatische cholestase niet of slechts in sporen aantoonbaar (Tabel IV.1).

Bij drie patiënten met een incomplete extrahepatische obstructie was het serum desoxycholzuurgehalte gemiddeld 7,8% van het totaal

en steeds in ruime mate aanwezig. De patiënten met een primaire en secundaire scleroserende cholangitis en met een intrahepatische cholestase e.c.i. hadden in de regel hetzelfde galzuurpatroon als de patiënten met een P.B.C. en een complete extrahepatische obstructie (Tabel IV.1). Van de patiënten met een benigne intermitterende intrahepatische cholestase kon een patiënt (Tabel III.14, pat. 4) tot driemaal toe tijdens een periode met cholestase geobserveerd worden. Steeds werden in het prille begin van de cholestase zeer hoge serum galzuurspiegels gevonden bij een nog normaal bilirubinegehalte en een licht verhoogde alkalische fosfatase-activiteit, terwijl ook zeer ernstige jeuk aanwezig was (Tabel IV.8).

Lithocholzuur of andere monohydroxy-galzuren die met de toegepaste methode dezelfde retentietijd hadden, waren meestal afwezig of slechts in sporen aantoonbaar (Tabel IV.1).

De correlatie tussen de jeuk en de serum galzuurpatronen werd onderzocht met behulp van een jeukscore (Tabel III.10); geen jeuk (-), lichte jeuk (+), intermitterende jeuk met krabeffecten (++) en continue ernstige jeuk met krabeffecten (+++). Voor de hele groep patiënten bestond er duidelijk de beste positieve correlatie tussen de jeukscore en het serum cholzuurgehalte ($r_s = 0,81$; Fig. IV.14). Voor de hele groep zonder complete extrahepatische obstructie was er ook een goede correlatie tussen de totale serum galzuurconcentratie en de serum bilirubinespiegel (Fig. IV.15). Tussen de alkalische fosfatase-, 5'-nucleotidase-activiteit en de totale serum galzuurconcentratie bestond er een minder goede correlatie (Tabel IV.10). Bij de P.B.C. bestond er een redelijke correlatie tussen het serum bilirubinegehalte en de sgot. Eveneens bestond er een redelijke correlatie tussen het cholzuurgehalte, de totale galzuurconcentratie en de sgot (Tabel IV.5). Bij de groep met een complete extrahepatische obstructie bestond er een matige correlatie tussen de totale serum galzuurconcentratie en de ziekte duur, en de 5'-nucleotidase-activiteit en de ziekte duur (Tabel IV.6).

VI.5.2. Gal

In galmonsters werden bij de groep normale personen de hoogste concentraties aan galzuren aangetroffen (Tabel IV.2). Bij de

P.B.C. was deze concentratie significant minder dan normaal voor wat betreft de totale galzuur-, de chenodesoxycholzuur- en de desoxycholzuurconcentratie. Bij de cirrhose was dit voor alle galzuren significant minder dan normaal (Fig. IV.11). De chol/chen-ratio was bij de P.B.C. significant hoger dan normaal en bij de cirrhose-groep niet significant verschillend van normaal (Fig. IV.11). Bij iedere onderzochte patiënt in de P.B.C.-groep, op één na, en in de cirrhose-groep bleek de chol/chen-ratio in gal significant hoger te zijn dan in serum (Fig. IV.2).

De lithocholzuurconcentratie in gal was bij alle patiënten steeds kleiner dan 3% van het totaal. Het desoxycholzuurgehalte in gal was bij de P.B.C. duidelijk minder dan normaal en bij de cirrhose ongeveer gelijk aan normaal (Tabel IV.2). Bij drie patiënten met een bewezen alcoholcirrhose was geen desoxycholzuur in gal aantoonbaar. Bij vijf patiënten met een P.B.C. was lithocholzuur in gal voor het grootste deel in de sulfaatveresterde vorm aantoonbaar (Tabel IV.3).

VI.5.3. Urine

In 24-uurs urine werden meer galzuren uitgescheiden, naarmate de nuchtere serum galzuurconcentratie hoger was (Fig. IV.12). De chol/chen-ratio in serum was zeer significant hoger dan in urine. Dit hield duidelijk verband met de mate van sulfaatverestering. Het chenodesoxycholzuur was bijna tweemaal zoveel (76,8%) dan cholzuur in de gesulfateerde vorm in urine aantoonbaar (Tabel IV.4). Wel bestond er een redelijke correlatie tussen de chol/chen-ratio in serum en in urine (Fig. IV.13). De chol/chen-ratio in urine was in 80% van de gevallen kleiner dan 1,5, terwijl die in serum steeds groter was dan 1,0. De ratio van de niet aan sulfaatveresterde fractie galzuren was steeds groter dan 1,0 (Tabel IV.4). Het desoxycholzuurgehalte in urine was steeds kleiner dan 1,6% van het totaal bij de groep met een complete extrahepatische obstructie. Bij de overige patiënten was dit steeds meer dan 1,6%, op twee uitzonderingen na. Lithocholzuur was in de urine van patiënten met cholestase vaak aantoonbaar, bijna steeds pas na solvolyse (Fig. IV.3, 5 en 7).

Door het vergelijken van relatieve retentietijden van bekende

en onbekende pieken op het urine chromatogram met behulp van een drietal verschillende stationaire fasen (3% QF-1, 3% OV-1 en 3% OV-17) kon bij 7 patiënten met verschillende vormen van cholestase worden aangetoond, dat zeker sporen lithocholzuur in de urine van deze patiënten aanwezig waren. Tevens werd aannemelijk gemaakt dat zich hierin ook sporen 3β -monohydroxy- Δ 5-choleenzuur en urso-desoxycholzuur bevonden. Opvallend was ook de aanwezigheid van hyocholzuur in aanzienlijke hoeveelheden en van een 3-keto-dihydroxygalzuur, dat niet nader geïdentificeerd kon worden in urine van patiënten met cholestase.

VI.5.4. Invloed van verschillende behandelingsmethoden op de cholestase

Cholestyramine bleek bij 9 patiënten met een incomplete obstructie een gunstig effect te hebben op de jeuk, de serum galzuur-concentratie, de serum transaminasen en de bilirubinespiegel. De chol/chen-ratio steeg niet significant (Fig. IV.16). Hetzelfde effect werd gezien na galwegdrainage bij patiënten met een (in)complete cholestase, waarmee de afvoer van gal hersteld werd (Fig. IV.17).

Opeenvolgende bepalingen in serum en gal bij patiënten met complete (Fig. IV.19) of incomplete cholestase (Fig. IV.8 en Fig. IV.18) lieten zien dat pas na 4 à 7 dagen een balanssituatie ontstond, waarbij de excretie van galzuren per ml gal constant bleef.

VI.6. Discussie en conclusies (Hfdst. V)

Op grond van gegevens uit de literatuur werden een aantal bevindingen verwacht. Een deel der resultaten was echter niet bekend, omdat bepalingen tegelijkertijd in serum en gal en in serum en urine tot nu toe niet verricht waren.

VI.6.1. Serum (Tabel V.1)

In het algemeen werd afhankelijk van de ernst van de cholestase hetzelfde galzuurpatroon gevonden bij patiënten met een extrahepatische en een intrahepatische cholestase. Deze bepaling biedt dan ook geen nadere informatie voor de differentiële diagnostiek van de cholestase. Verder volgt hieruit dat de verandering in het

galzuurpatroon bij cholestase, eerder een gevolg dan een oorzaak van de cholestase is, misschien met uitzondering van de benigne intermitterende intrahepatische cholestase waar het tegengestelde gevonden werd. In overeenstemming met andere onderzoeken werd een goede correlatie gevonden tussen de bilirubinespiegel en de totale galzuurconcentratie in serum.

De chol/chen-ratio was van diagnostische betekenis voor de afgrenzing van de groep met een cirrhose en de patiënten met cholestase. In het algemeen was deze groter dan 1,0 bij de cholestase. Bij de cirrhose gelijk aan 0,7 of kleiner (Fig. IV.10). Carey (1969) suggereerde dat een lage chol/chen-ratio op een infauste prognose duidde. Hij trok de grens bij 1,0. In dit onderzoek lag deze grens bij 0,7.

Op grond van het desoxycholzuurgehalte in serum was een afgrenzing mogelijk tussen de complete extrahepatische en de kleine groep met een incomplete extrahepatische obstructie (Tabel IV.1). Opvallend was de bevinding bij patiënte 4 met een benigne intermitterende intrahepatische cholestase (Tabel IV.8). Extreem hoge serum galzuurconcentraties (277,3 $\mu\text{g/ml}$) werden hierbij gevonden in het prille begin van de cholestase. Bij de complete extrahepatische obstructie werd als hoogste waarde "slechts" 116,2 $\mu\text{g/ml}$ gevonden. Wanneer men aanneemt, dat de galzuurpool bij deze patiënte hetzelfde is gebleven, dan zou zich ongeveer 50% hiervan in de algemene circulatie moeten bevinden, nog voordat van een bilirubine-retentie sprake is. Dit wijst op een abrupte onderbreking van de enterohepatische kringloop van galzuren in de allervroegste fase van de cholestase bij dit ziektebeeld. Het zou kunnen berusten op een defect van een enzym, dat betrokken is bij het (actieve) transport van galzuren vanuit de bloedbaan naar de levercel (van Berge Hengouwen e.a. 1974^d). Een tekortkoming van deze studie is misschien, dat de gesulfateerde fractie aan galzuren in serum niet bepaald werd. Uit de onderzoeken van Admirand e.a. (1972) en Stiehl (1973 en 1974) is echter gebleken dat in de regel deze fractie niet meer dan 5% van het totaal bedraagt. Dit is ook begrijpelijk, aangezien deze gesulfateerde galzuren zeer snel in de urine worden uitgescheiden. Zeer gevoelige technieken zullen nodig zijn om deze fractie precies in serum aan te tonen. Daarom werd hiervan in dit onderzoek afgezien.

Dat monohydroxy-galzuren slechts in sporen aanwezig waren bij patiënten met een cirrhose of P.B.C. pleit niet voor de hypothese dat deze galzuren bij het onderhouden of het ontstaan van cholesta-se of cirrhose een rol van betekenis spelen, zoals gesuggereerd is door de bevindingen van Carey e.a. (1966^a) en Murphy e.a. (1972).

VI.6.2. Gal (Tabel V.2.)

Bij normale personen werd in gal een verhouding van cholzuur : chenodesoxycholzuur : desoxycholzuur : lithocholzuur gevonden van: 1,0 : 1,0 : 0,2 : 0,04. Desoxycholzuur was in relatief geringere hoeveelheden aanwezig dan door andere onderzoekers gevonden werd. Dit zou samen kunnen hangen met de vrij jonge leeftijd in de contro-le-groep. Uit dit onderzoek werd de indruk verkregen, dat bij de oudere personen relatief meer desoxycholzuur in gal aanwezig was dan bij de jongere personen. Verder zou het desoxycholzuurgehalte in gal afhankelijk kunnen zijn van de hoeveelheid ruwvezel die met het voedsel wordt genuttigd (Pomare en Heaton, 1973). Het zou in dit verband interessant zijn de correlatie tussen de desoxychol-zuurconcentratie in gal en de passagesnelheid van voedsel in de darm en de leeftijd bij normale personen na te gaan.

In dit onderzoek werd de bevinding van Turnberg en Grahame (1970) en Bode e.a. (1971) bevestigd, dat bij patiënten met een cirrhose veel lagere concentraties aan galzuren dan normaal na cholecystokinine-stimulatie in de gal worden uitgescheiden. Deso-xycholzuur was relatief niet minder dan normaal aanwezig bij de cirrhose. Hierbij was de verhouding 1,0 : 1,0 : 0,2 : 0,05. Bij drie patiënten met een alcoholcirrhose werd in tegenstelling tot de he-le groep geen desoxycholzuur in de gal teruggevonden. Vlahcevic e.a. (1970^b) vonden ook een sterk verlaagde desoxycholzuurconcen-tratie in de gal van patiënten met een alcoholcirrhose. Bij onze patiënten met alcoholcirrhose leek dit niet veroorzaakt te worden door een meer dan gebruikelijke cholestase.

Bij de P.B.C. was de verhouding in gal 1,0 : 0,4 : 0,03 : 0,00. Hier was wel sprake van een duidelijke vermindering van che-nodesoxycholzuur, desoxycholzuur en lithocholzuur in gal. Dit zal wel een gevolg zijn van een verminderde frequentie van het aantal hepato-enterale circulaties van de galzuurpool. Geheel onverwacht

was de bevinding dat de chol/chen-ratio in gal significant hoger was dan die in serum bij patiënten met een cirrhose en P.B.C. Dit is tegengesteld aan wat tot nu toe algemeen werd aangenomen (Carey, 1969; Miettinen, 1973). Het feit dat bij P.B.C. in gal na solvolyse de concentratie monohydroxygalzuren sterk was toegenomen, wijst er in ieder geval op dat de lever zich ook via deze route van potentieel toxische galzuren (zij het in geringe concentratie) tracht te ontdoen.

VI.6.3. Urine

Ook in urine van patiënten met cholestase werd in tegenstelling tot wat algemeen werd aangenomen (Miettinen, 1973) niet hetzelfde galzuurpatroon gevonden als in serum. Dit hield voornamelijk verband met de relatief sterke toename van de sulfaatfractie van het chenodesoxycholzuur in de urine. Deze relatief sterkere toename van chenodesoxycholzuur dan van cholzuur in de urine wijst er op dat in de lever via een selectieve sulfaatverestering retentie van vooral chenodesoxycholzuur, dat veel sterker detergentend werkzaam is dan cholzuur (Hutterer e.a., 1972) wordt tegengegaan. Er was een zeer significante positieve correlatie tussen de serum galzuurconcentratie en de urine-excretie van galzuren (Fig. IV.12). De totale hoeveelheid galzuren die per 24 uur in de urine werd uitgescheiden viel echter tegen, als men bedenkt dat bij een complete cholestase dit (misschien samen met de huid) de enige excretieroute van betekenis is. Desoxycholzuur was bij twee patiënten (10% van totaal) niet aantoonbaar terwijl geen complete cholestase kon bestaan (Tabel IV.4.). Dit is toch teveel om van een echte diagnostische betekenis te kunnen spreken.

Bij het beoordelen van de cholestase - compleet of incompleet - op grond van dit criterium alleen is dan ook grote voorzichtigheid geboden.

Evenals door Makino e.a. (1971) en Back (1973) bij kinderen met een extrahepatische galgangatresie en patiënten met intra- en extrahepatische cholestase, werden ook in deze studie lithocholzuur en 3β -hydroxy- Δ^5 -choleenzuur, voornamelijk in sulfaatvorm, in geringe concentraties in de urine aangetroffen. Voor de bepaling hiervan gebruikten Makino e.a. en Back galzure trimethylsilylethers die op een HiEff8Bp als stationaire fase bepaald werden,

welke gevoeliger is voor monohydroxy-galzuren, omdat deze achteraan op het chromatogram te voorschijn komen. Ursodesoxycholzuur dat in deze studie werd gevonden, werd ook door Back in urine van patiënten met cholestase aangetroffen. Het zou mogelijk zijn dat in de lever chenodesoxycholzuur wordt omgezet in ursodesoxycholzuur dat een geringere detergentende werking heeft. De aanwezigheid van hyocholzuur en een onbekend β -keto-dihydroxygalzuur in de urine wijst ook op andere, tot nu toe onbekende, syntheseswegen in de lever die tijdens cholestase bij de mens actief kunnen zijn. Het feit dat hyocholzuur in aanzienlijke hoeveelheden bij patiënten met cholestase in de urine werd teruggevonden is ook van belang, daar dit galzuur door sommige onderzoekers als interne standaard wordt toegepast.

Op een enkele uitzondering na, zoals de door Williams e.a. (1972) beschreven familie met een neonatale fataal verlopende cholestatische cirrhose, lijkt, ook al omdat monohydroxy-galzuren zowel bij de extrahepatische als intrahepatische cholestase werden aangetoond, het belang van deze galzuren zeer gering of afwezig bij het ontstaan of onderhouden van de cholestase.

VI.6.4. Jeuk

Op de goede correlatie tussen het serum cholzuur en de jeuk was tot nu toe nog niet gewezen. Wel bestond er een overlapping in het gebied van 2,5 - 7,5 $\mu\text{g/ml}$ tussen patiënten met jeuk (+) en patiënten zonder jeuk (Fig. IV.14). De subjectieve interpretatie van de patiënt en de binding van galzuren aan plasma eiwitten kunnen hierbij van betekenis zijn.

VI.6.5. Het verband tussen de biochemische parameters onderling en de ziekteduur

Het serum cholzuurgehalte correleert nog het beste met de overige parameters bij de hele groep onderzochte patiënten (Tabel IV.10.). Dit suggereert dat het cholzuur een zeer gevoelige parameter is voor cholestase. Interessant was de goede correlatie tussen de ziekteduur en de 5'-nucleotidase en alkalische fosfatase-activiteit (waarbij de cirrhose-groep buiten beschouwing gelaten werd). Ook bij de P.B.C. springt de cholzuurconcentratie er als beste parameter uit (Tabel IV.5.). In deze groep bestond er

ook een redelijke correlatie tussen de sgot als uiting van een leverparenchymbeschadiging en de serum galzuurconcentratie in tegenstelling tot de groep met een complete extrahepatische obstructie (Tabel IV.6.). Dit suggereert een verband tussen retentie van galzuren en de leverparenchymbeschadiging bij langdurige cholestase.

VI.6.6. Behandeling van cholestase

Cholestyramine verbeterde in een kortdurende studie (3 à 6 weken) niet alleen de jeuk en de serum galzuurconcentraties significant, maar ook de bilirubinespiegel en de serum transaminasen daalden significant (Fig. IV.16). Hiermee wordt gesuggereerd dat de galafvloed wordt verbeterd, terwijl tevens de leverparenchymbeschadiging minder ernstig wordt. Mogelijk zou het primaire ziekteproces (P.B.C.) hiermee kunnen worden afgeremd. Het lijkt zeer zinvol een prospectief onderzoek naar de waarde van langdurige cholestyraminetoediening bij syndromen met een incomplete obstructie te doen. Controlebiopsiën zouden hierbij regelmatig verricht dienen te worden. Een nauwkeurige registratie van de bijwerkingen zou hierbij ook moeten geschieden.

Fenobarbital werd slechts bij één patiënt toegepast (Fig. IV.9). Het veroorzaakte een snelle daling van de serum galzuurconcentratie, de bilirubinespiegel en een relative toename van het serum desoxycholzuurgehalte en een toename van de excretie van urobilinogeen in de feces. Ook dit suggereert een verbetering van de galafvloed naar de darm en een beter functioneren van de hepato-enterale circulatie der galzuren.

Galwegdrainage veroorzaakte hetzelfde fenomeen als cholestyramine, maar veel sneller en meer uitgesproken (Fig. IV.8; Fig. IV.17; Fig. IV.18; Fig. IV.19).

VI.6.7. Kwantitatieve aspecten van veranderingen in het galzuurmetabolisme bij de cholestase

Dowling e.a. (1970) toonden bij kortdurende experimenten met apen aan dat een complete biliaire obstructie leidde tot een totale stopzetting van de synthese van primaire galzuren in de lever. Waarschijnlijk gaat dit via een alles of niets principe, waarbij de kritisch remmende concentratie van galzuren in de lever de bepa-

lende factor is (Small e.a., 1972). Waarschijnlijk is ook bij langdurige obstructie de synthese verminderd of gestopt (Norman en Strandvik, 1971). De pool aan galzuren bevindt zich onder deze omstandigheden voor een groot deel in de lever en de rest verdeelt zich over de algemene circulatie en de verdere extra-cellulaire ruimte. De nier - en misschien de huid - wordt de voornaamste excretie-route. De totale excretie van galzuren per 24 uur is echter beperkt (Tabel IV.4.).

VI.6.8. Kwalitatieve aspecten van veranderingen in het galzuurmetabolisme bij de cholestase

De chol/chen-ratio in serum weerspiegelt niet alleen verschillen in synthese van primaire galzuren, maar ook verschillen in renale klaring, in poolgrootte, in het aantal entero-hepatische circulaties en in klaring door de lever. Op grond van verschillen van deze ratio in serum, gal en urine en de bevindingen van andere onderzoekers kan men een aantal conclusies trekken. In Fig.VI.1. vindt men een model weergegeven, waarin de belangrijkste suggesties betreffende veranderingen in het galzuurmetabolisme bij de cholestase worden weergegeven:

1. De synthese in de lever van primaire galzuren is verminderd of gestopt. Indien er nog enige synthese van primaire galzuren bestaat, kan de hogere chol/chen-ratio in gal dan in serum wijzen op een grotere synthese van cholzuur dan van chenodesoxycholzuur. Een primaire synthese van monohydroxygalzuren tijdens cholestase zal waarschijnlijk wel bestaan, maar deze zal kwantitatief slechts van een geringe betekenis zijn.
2. De galsecretie en de afvoer van galzuren naar de darm is verminderd of gestopt. Bij de P.B.C. zou een selectief verhoogde canaliculaire secretie van cholzuur een rol kunnen spelen. De secretie van monohydroxy-galzuren in de sulfaatveresterde vorm is duidelijk toegenomen.
3. De actieve terugresorptie van galzuren in het terminale ileum functioneert waarschijnlijk normaal. Verschillen in de mate van absorptie tussen cholzuur en chenodesoxycholzuur zouden theoretisch van belang kunnen zijn.
4. De fecale excretie van galzuren is verminderd of afwezig.

5. De aanvoer van galzuren via de vena portae naar de lever is verminderd.
6. Retentie van galzuren in de lever.
 - a. Via een selectief mechanisme wordt tweemaal zoveel chenodesoxycholzuur als cholzuur aan sulfaten gekoppeld.
 - b. Mogelijk bestaat er een omzetting van chenodesoxycholzuur in cholzuur.
 - c. Eveneens lijkt een omzetting van chenodesoxycholzuur in ursodesoxycholzuur niet uitgesloten.
 - d. Er bestaat waarschijnlijk een synthese van hyocholzuur en een 3-ketodihydroxygalzuur in de lever.
7. Overloop van galzuren vanuit de lever naar de algemene circulatie.
8. Toename van de renale excretie van galzuren. Selectief wordt meer chenodesoxycholzuur dan cholzuur uitgescheiden.
9. Uitscheiding van galzuren naar de huid en de rest van het extra-cellulaire compartiment. Een verschil in verdeling van het cholzuur en het chenodesoxycholzuur over de extra-cellulaire ruimte zou mogelijk ook van betekenis kunnen zijn.
10. Aanvoer van galzuren via de algemene circulatie naar de lever via de art. hepatica en de art. mesenterica superior en inferior.

Wanneer men de belangrijkste aspecten hieruit samenvat, kan men concluderen dat de beide primaire galzuren cholzuur en chenodesoxycholzuur op verschillende manieren door de lever geklaard worden. Het chenodesoxycholzuur wordt relatief meer dan cholzuur in de lever aan sulfaat veresterd en naar de algemene circulatie getransporteerd, waar het snel via de nier zal worden uitgescheiden. Het cholzuur zal in relatief hogere concentraties dan het chenodesoxycholzuur door de lever geklaard worden via de galsecretie. De verwachting is dan ook dat het cholzuur bij syndromen zoals de P.B.C. waar nog enige galproductie bestaat, in relatief hogere concentraties dan het chenodesoxycholzuur in de entero-hepatische kringloop zal circuleren. Via een aantal van de bovengenoemde mechanismen zou de ophoping van potentieel toxische galzuren, zoals de α -dihydroxy-galzuren en met name het chenodesoxycholzuur, zolang de leverparenchymfunctie nog voldoende is, worden tegengegaan (van Berge Henegouwen en Brandt, 1974^e en 1975).

VI.6.9. Verandering in het galzuurmetabolisme bij de cirrhose

Bij de cirrhose is de totale cholzuurpool duidelijk kleiner dan de chenodesoxycholzuurpool en daarmee omgekeerd aan normaal (Vlahcevic e.a., 1972). Het zou zelfs zo zijn dat de mate van cholzuursynthese van prognostische betekenis is bij de levercirrhose (McCormick e.a., 1973). Het is mogelijk dat de hogere chol/chen-ratio in gal dan in serum bij cirrhose ook verklaard wordt door een verschillend klaringsmechanisme van de primaire galzuren door de lever. Het extra verlies van chenodesoxycholzuur in de sulfaatveresterde vorm zou dan weer gecompenseerd kunnen worden door een relatief hogere synthese van chenodesoxycholzuur dan van cholzuur in de lever.

Summary

Bile acids and cholestasis

Bile acid analyses using gas-liquid chromatography in serum, bile and urine from patients with cholestasis.

VII.1. Introduction

By determining bile acids in serum, bile and urine from patients with cholestatic syndromes distinguishable according to clinical, biochemical, serological and histological criteria, an attempt was made at a more detailed evaluation of their diagnostic importance. The gas-chromatographic method of determination was chosen for its sensitivity and reliability, and for what proved to be a considerable degree of accuracy.

No attempt was made to differentiate between conjugated and unconjugated bile acids in this study. Nor was a differentiation made between glyco-conjugated and tauro-conjugated bile acids.

Disorders of the bile acid metabolism in cholestasis can be investigated by kinetic studies and chemical determinations of bile acids in the various body fluids. No kinetic studies were made in the context of this investigation. Simultaneous determination of bile acids in serum, bile and urine supplies only snapshot information. Nevertheless this procedure makes it possible to study qualitative as well as quantitative aspects of disorders of the bile acid metabolism in cholestasis. Comparison of the results obtained in serum, bile and urine could be expected to enhance our insight into the pathogenesis or the diagnosis of various types of cholestasis.

Chapter II presents a survey of current knowledge of the bile acid metabolism under normal and under pathological circumstances, specifically in the case of cholestasis. It also discusses the synthesis of bile acids (Fig. II.1 and Fig. II.2) and the mechanism of bile secretion. With a view to the present study, a number of questions arose from this survey.

VII.2. Problem statement and purpose of this study

Is a particular bile acid pattern present in the various syndromes with cholestasis?

Are correlations demonstrable between bile acid patterns in serum, bile and urine, and is the primary bile acid ratio the same in serum, bile and urine?

Is there a correlation between duration of illness and bile acid patterns in serum and the other biochemical parameters?

Are monohydroxy-bile acids also demonstrable by the methods used?

Is there a correlation between a given bile acid pattern and the pruritus?

In addition it seemed of importance to study the effects of various methods of treatment (medication with cholestyramine and with phenobarbital, and biliary drainage) on the bile acid patterns in serum, the pruritus and the biochemical parameters.

VII.3. Persons examined (Chapter III; tables III.11 through III.16)

The study comprised 30 normal controls, 18 patients with liver cirrhosis, 19 with primary biliary cirrhosis (PBC), 13 with complete and 3 with incomplete extrahepatic obstruction, 4 with primary and 2 with secondary sclerosing cholangitis, 5 with benign recurrent intrahepatic cholestasis (BRIC), including 4 who were related by family ties, and 4 patients with intrahepatic cholestasis of unknown etiology. The normal controls and the group with liver cirrhosis were used as control groups for comparison with the cholestatic syndromes.

VII.4. Methods of determination (Chapter III)

For comparison of bile acid patterns, use was made of the total bile acid concentration, the cholic/chenodeoxycholic acid (CA/CDCA) ratio and the presence of deoxycholic acid and lithocholic acid. In isolating bile acids from serum, enzymatic hydrolysis was carried out before protein precipitation. Next came a purification phase according to Roovers et al. (1968) and a liquid-liquid extraction with diethyl ether (Table III.1.). The protein precipitation and the purification phase were omitted for routine deter-

mination in bile. For determination in urine, the bile acids were first extracted with the aid of Amberlite-XAD₂ (Makino and Sjövall, 1972), whereupon a solvolysis phase was introduced (Palmer, 1967). The residu was then dissolved in water, and this was followed by enzymatic hydrolysis and extraction with diethyl ether. In serum determinations as well as in determinations in bile and urine, trifluoroacetate methylester derivatives of bile acids were prepared which were gaschromatographically determined on a column with 1% OV-210 on Gaschrom Q as stationary phase.

Using 7-ketodeoxycholic acid as internal standard it was possible to achieve adequate separation of the individual bile acids: cholic acid, chenodeoxycholic acid, deoxycholic acid and lithocholic acid (table III.2; fig. III.1). There was a linear correlation between dose and response on the gas chromatograph (fig. III.4. and fig. III.5).

Recovery experiments with unconjugated and conjugated bile acids added to water, serum, bile and urine demonstrated good reproducibility (tables III.3. and III.4). Control determinations of serum cholic acid by radio-immunoassay (Simmonds et al. 1973) were carried out in the Mayo Clinic (Rochester, Minnesota, USA) by Dr A.F. Hofmann (fig. III.6). These results correlated very well with those we obtained by the gas-chromatographic method.

The only loss of any significance, mainly of cholic acid and lithocholic acid, occurred during enzymatic hydrolysis. Special attention was focused on purification and diethyl ether extraction in order to minimize the loss of bile acids during these phases. The recovery of conjugated bile acids was 80-95% for serum, 83-100% for bile and 75-81% for urine. Duplicate determinations in serum (table III.7), bile (table III.8) and urine (table III.9) likewise revealed good reproducibility.

The methods of determination in serum and bile have been described in detail elsewhere (Van Berge Henegouwen et al. 1974^b).

Bile acid concentrations found in fasting serum from normal controls were 0.3-2.5 μ g/ml; this is in agreement with the results which other investigators obtained with comparable techniques (table III.5).

In bile collected from normal controls with a Dreiling double-lumen tube after cholecystokinin stimulation, a mean total

bile acid concentration of 27.24 mg/ml (\pm 6.84) was found. In this bile the cholic acid: chenodeoxycholic acid: deoxycholic acid: lithocholic acid ratio was 1.0 : 1.0 : 0.2 : 0.04.

In urine from normal controls, no or only traces of bile acids were found, at concentrations below the lower limit of sensitivity of the method of determination (< 0.2 mg/l).

VII.5. Results (Chapter IV)

VII.5.1. Serum

The highest serum concentrations were found in complete extrahepatic obstruction, and the lowest in cirrhosis (table IV.1). Per group, the serum bile acid concentration was as much higher as the cholestasis, measured by the serum bilirubin concentration, was more marked (fig. IV.10). This did not apply to the individual patients in the group with complete extrahepatic obstruction, who showed no evident correlation between serum bile acid concentration and bilirubin level (fig. IV.6). In the cirrhosis group, patients with signs of hepatocerebral intoxication had a total serum bile acid concentration at least twice as high as the mean in this group.

The CA/CDCA ratio was highest in the group with complete extrahepatic obstruction and lowest (in fact significantly below normal) in the cirrhosis group (fig. IV.10). The ratio was generally lower in patients with PBC in later stages (III and IV), but the difference from earlier stages (I and II) was not significant (fig. IV.4).

In most cases of intrahepatic as well as of complete extrahepatic cholestasis, serum deoxycholic acid was not demonstrable or only in trace amounts detectable (table IV.1). In three patients with incomplete extrahepatic obstruction, the serum deoxycholic acid concentration averaged 7.8% of the total concentration, and was always readily demonstrable. Patients with primary and secondary sclerosing cholangitis and with intrahepatic cholestasis of unknown etiology as a rule showed the same serum bile acid pattern as those with PBC and complete extrahepatic obstruction (table IV.1). One of the patients with BRIC (table III.14 re 4) could

be observed during a cholestatic episode on three occasions. On three occasions very high serum bile acid levels were found in the earliest phase of a cholestatic episode, while bilirubin values were normal and alkaline phosphatase activity slightly increased, very severe pruritus being in evidence (table IV.8).

Lithocholic acid or other monohydroxy-bile acids which had the same retention time with the method used, were usually absent or demonstrable only in traces (table IV.1).

The correlation between pruritus and serum bile acid pattern was studied with the aid of a pruritus score (table III.10): no pruritus (-), mild pruritus (+), intermittent pruritus with scratch marks (++) , and continuous severe pruritus with scratch marks (+++). For the entire group of patients the best correlation was obviously that between pruritus score and serum cholic acid concentration ($r_s = 0.81$; fig. IV.14). For the entire group without complete extrahepatic obstruction, there was a good correlation between total serum bile acid and bilirubin concentration (fig. IV.15). A less good correlation was found between alkaline phosphatase, 5'-nucleotidase and total serum bile acid concentration (table IV.10). In PBC there was a fair correlation between serum bilirubin and SGOT, and also between cholic acid, total bile acid concentration and SGOT (table IV.5). In the group with complete extrahepatic obstruction there was a moderate correlation between total serum bile acid concentration and duration of illness, and between 5'-nucleotidase activity and duration of illness (table IV.6).

VII.5.2. Bile

The highest bile acid concentrations in bile samples were found in the group of normal controls (table IV.2). In PBC this concentration was significantly below normal for total bile acid, chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid. In the cirrhosis group all bile acids showed significantly lower concentrations than normal (fig. IV.11). The CA/CDCA ratio was significantly higher than normal in PBC, and not significantly different from normal in the cirrhosis group (fig. IV.11). In all patients examined in the PBC group except one, and in the cirrhosis group, the CA/CDCA ratio in bile was significantly higher than that in serum (fig. IV.2). The lithocholic acid concentration in bile was invariably less than 3%

of the total. The bile deoxycholic acid concentration was evidently less than normal in the PBC group, and about normal in cirrhosis (table IV.2). No deoxycholic acid was demonstrable in bile in three patients with a verified alcohol-induced cirrhosis. In five patients with PBC, lithocholic acid in bile was demonstrable for the most part as sulphate ester (table IV.3).

VII.5.3. Urine

The excretion of bile acid in the 24-hour urine was as much greater as the fasting serum bile acid concentration was higher (fig. IV.12). The CA/CDCA ratio in serum was very significantly higher than that in urine. There was a good correlation between this ratio in serum and that in urine, too (fig. IV.13); this evidently depended on the degree of sulphate esterification. The amount of chenodeoxycholic acid present in urine as sulphate ester (76.8%) was almost twice as large as the amount of cholic acid present as sulphate ester (table IV.4). In 80% of cases the CA/CDCA ratio in urine was less than 1.5, while that in serum was always more than 1.0. Deoxycholic acid in urine was always less than 1.6% of the total in the group with complete extrahepatic obstruction. In the remaining patients it was always more than 1.6%, with two exceptions.

Lithocholic acid was often demonstrable in urine from patients with cholestasis, but nearly always only after solvolysis (fig. IV. 3, 5, 7).

Further analysis with the aid of three different stationary phases (3% QF-1, 3% OV-1 and 3% OV-17) in order to establish the identity of known and unknown peaks in the urinary chromatogram of seven patients, disclosed traces of lithocholic acid in the urine from these patients with cholestasis. It also demonstrated the likelihood that this urine contained traces of 3β -monohydroxy- Δ^5 -cholenoic acid and ursodeoxycholic acid. A surprising finding was the presence of hyocholic acid and a β -keto-dihydroxy-bile acid not further identifiable, in the urine from nearly all patients with cholestasis.

VII.5.4. Cholestyramine and T-tube-drainage

In nine patients with incomplete cholestasis cholestyramine was found to have a favourable effect on pruritus, serum bile acids, serum transaminases and bilirubin. The CA/CDCA ratio showed no significant increase (fig. IV.16). A similar effect was observed following biliary drainage in patients with (in)complete cholestasis, which restored the efferent flow of bile (fig. IV.17). Successive determinations in serum and bile in three patients with complete (fig. IV.19) and with incomplete cholestasis (fig. IV.8 & 18) revealed that a steady state with constant excretion of bile acids per ml bile did not develop until after 4-7 days.

VII.6. Discussion and conclusions (Chapter V)

A number of findings were anticipated in view of data published in the literature. A proportion of results could not be predicted because simultaneous determinations in serum and bile and urine had not hitherto been made.

VII.6.1. Serum (table V.1)

Dependent on the severity of cholestasis, patients with extrahepatic and those with intrahepatic cholestasis generally showed the same bile acid pattern. This determination therefore supplies no further information of use in the differential diagnosis of cholestasis. This also indicates that the change in the bile acid pattern in cholestasis is a consequence rather than a cause of the cholestasis, perhaps with the exception of BRIC. In agreement with other studies a good correlation was found between bilirubin and serum total bile acid concentration. The CA/CDCA ratio was of diagnostic significance in differentiation between the cirrhosis group and the group of patients with cholestasis. The ratio was generally higher than 1.0 in cholestasis, whereas in cirrhosis it was always less than 0.8 (fig. IV.10).

Carey (1969) suggested that a low CA/CDCA ratio should be interpreted as suggestive of a bad prognosis. He set the limit at 1.0. In the present study the limit was 0.7.

On the basis of the serum deoxycholic acid concentration it

was possible to differentiate between complete extrahepatic and the small group with incomplete extrahepatic obstruction.

A surprising finding was obtained in patient 4 with BRIC (table IV.8), in whom extremely high bile acid concentrations (277.3 $\mu\text{g/ml}$) were found in the early phase of cholestasis. The highest value obtained in complete extrahepatic obstruction was 'only' 116.2 $\mu\text{g/ml}$. Given the same pool, about 50% of this pool should be present in the systematic circulation even before bilirubin retention occurs. This indicates an abrupt interruption of the enterohepatic circulation of bile acids in the very earliest phase of cholestasis in this syndrome. This might be based on a deficiency of an enzyme involved in the (active) transport of bile acids from the blood circulation to the liver cell (van Berge Henegouwen et al. 1974^d).

It is perhaps a shortcoming of this study that the sulphated fraction of bile acids in serum was not determined. However, studies by Admirand et al. (1972) and Stiehl (1973, 1974) have shown that this fraction as a rule does not exceed 5% of the total concentration. This is understandable in view of the fact that these sulphated bile acids are very rapidly excreted in the urine. Highly sensitive techniques will be required for exact determination of this fraction in serum. In the absence of such techniques, this determination was not carried out in this study.

That only traces of monohydroxy-bile acids were found in patients with cirrhosis or PBC seems to contradict the hypothesis that these bile acids play a significant role in the pathogenesis or maintenance of cholestasis or cirrhosis, as suggested by the findings of Carey et al. (1966^a) and Murphy et al. (1972).

VII.6.2. Bile (table V.2)

The cholic acid: chenodeoxycholic acid: deoxycholic acid: lithocholic acid ratio found in bile from normal controls was 1.0 : 1.0 : 0.2 : 0.04. Deoxycholic acid was found in relatively smaller amounts than reported by other investigators. This might be due to the fairly young age in this control group. From this study we gained the impression that older subjects showed relatively higher deoxycholic acid levels than younger ones. Moreover, this differen-

ce could also be a result of geographical differences in dietary habits.

The present study confirmed the reports of Turnberg and Grahame (1970) and Bode et al. (1971) that patients with cirrhosis excrete much lower than normal concentrations in bile after cholecystokinin stimulation. Deoxycholic acid was not relatively subnormal in cirrhosis. The ratio in these cases was 1.0 : 1.0 : 0.2 : 0.05. Three patients with alcohol-induced cirrhosis differed from the entire group in that no deoxycholic acid was recovered from the bile. Vlahcevic et al. (1970^b) likewise found a greatly reduced deoxycholic acid concentration in bile from patients with alcohol-induced cirrhosis. In PBC the ratio in bile was 1.0 : 0.4 : 0.03 : 0.00. These patients showed an unmistakable decrease in chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid concentrations in bile. This was probably a consequence of a reduced frequency of enterohepatic circulations of the bile acid pool.

A conspicuous finding was that the CA/CDCA ratio in bile was significantly higher than that in serum in cirrhosis and PBC. This contradicts the general assumption accepted so far (Carey 1969; Miettinen 1973).

In any case the fact that, in PBC, the concentration of monohydroxy-bile acids in bile was found to be markedly increased after solvolysis indicates that the liver tries to remove potentially toxic bile acids (be it in low concentrations) via this route as well.

VII.6.3. Urine (table V.3)

Contrary to generally accepted views, the bile acid pattern found in urine was not the same as that in serum (Miettinen 1973). This was mainly due to the relatively marked increase of the sulphate fraction of chenodeoxycholic acid in urine. This relatively more marked increase of chenodeoxycholic acid than of cholic acid in urine suggests that selective sulphate esterification in the liver counteracts retention of particularly chenodeoxycholic acid, which has a much stronger detergent action than cholic acid (Hutterer et al. 1972).

There was a highly significant correlation between serum bile acid concentration and urinary excretion of bile acids (fig. IV.

12). The total amount of bile acids excreted in the urine per 24 hours, however, was less than would be expected in view of the fact that in complete cholestasis this is the only excretion route of significance (perhaps together with the skin).

In two patients (10% of the total) deoxycholic acid was not demonstrable although complete cholestasis was ruled out with certainty. This percentage is too large to attach real diagnostic significance to deoxycholic acid, and great prudence is therefore imperative in evaluating (complete or incomplete) cholestasis on the basis of this criterion alone.

Like Makino et al. (1971) and Back (1973) in children with extrahepatic bile duct atresia and patients with intrahepatic and extrahepatic cholestasis, we too demonstrated low urinary lithocholic acid and 3β -monohydroxy- Δ^5 -cholenoic acid concentrations, mainly in sulphate ester form. For this determination Makino et al. and Back used trimethylsilyl ether derivatives, which were determined on a column with HiEff8Bp as stationary phase (this is more sensitive for monohydroxy-bile acids, which appear late on the chromatogram).

Ursodeoxycholic acid was identified in this study and also found by Back in urine from patients with cholestasis. It might be that chenodeoxycholic acid is transformed in the liver to ursodeoxycholic acid (which has a much less pronounced detergent action). The presence of hyocholic acid and another, unidentified 3-keto-dihydroxy-bile acid in the urine also suggests hitherto unidentified alternative synthetic pathways in the liver during human cholestasis.

Apart from a few exceptions such as the family with neonatal fatal cholestatic cirrhosis described by Williams et al. (1972), the importance of mono-hydroxy-bile acids in the pathogenesis or maintenance of cholestasis seems negligible, also because these bile acids have been demonstrated in extrahepatic as well as in intrahepatic cholestasis.

VII.6.4. Pruritus

The good correlation between serum cholic acid and pruritus had not been previously pointed out. There was some overlapping in

the range of 2.5 - 7.5 $\mu\text{g/ml}$ between patients with pruritus (+) and those without it (fig. IV.14). The patient's own subjective interpretation and the degree of conjugation of bile acids to plasma proteins can play a role in this respect.

VII.6.5. Correlation between biochemical parameters, and between these parameters and duration of illness

The serum cholic acid concentration showed the best correlation with the other parameters studied (table IV.10). This would seem to suggest that cholic acid is a sensitive parameter of cholestasis. An interesting finding was the good correlation between duration of illness and 5'-nucleotidase as well as alkaline phosphatase activity, in which respect the cirrhosis group was not taken into account. In PBC, too, the cholic acid concentration stands out as the best parameter (table IV.5). In this group there was a fair correlation between SGOT and serum bile acids, in contrast with the group with complete extrahepatic obstruction (table IV.6). This suggests a correlation between retention of bile acids and damage to the liver parenchyma in the case of prolonged cholestasis.

VII.6.6. Treatment of cholestasis

In a brief study, treatment with cholestyramine caused not only significant improvement in pruritus and serum bile acid concentration, but also significantly reduced the bilirubin and serum transaminases (fig. IV.16). This suggests that bile excretion was improved, and that damage to the liver parenchyma was reduced. In this way the primary disease process (PBC) could perhaps be arrested to a certain extent. It seems highly advisable to carry out a prospective study with control liver biopsies in order to establish the value of long-term cholestyramine medication in syndroms of incomplete cholestasis. Such a study should include a careful registration of side effects.

Phenobarbital was used in only one case (fig. IV.9). It caused a rapid decrease in serum bile acids and bilirubin, a relative increase in serum deoxycholic acid and an increase in the faecal excretion of urobilinogen. This, too, suggests an improvement of the flow of bile to the intestine.

Biliary drainage caused the same phenomenon as cholestyramine medication, but much more quickly and more pronounced (fig. IV.8; fig. IV.17; fig. IV.18; fig. IV.19).

VII.6.7. Quantitative aspects of changes in bile acid metabolism during cholestasis

In brief experiments on monkeys, Dowling et al. (1970) demonstrated that complete biliary obstruction led to total arrest of the synthesis of primary bile acids in the liver. This is probably effected by an all-or-nothing principle, the determinant factor being the critical inhibitory concentration of bile acids in the liver cell (Small et al. 1972). In protracted obstruction, too, synthesis is probably reduced or arrested (Norman and Strandvik, 1971). Under these circumstances the bile acid pool is largely localized in the liver, the remainder being divided over the systemic circulation and what remains of the extracellular space. The kidney (and perhaps the skin) becomes the principal route of excretion. The total excretion of bile acids per 24 hours, however, is limited (table IV.4).

VII.6.8. Qualitative aspects of changes in bile acid metabolism during cholestasis

The CA/CDCA ratio in serum reflects not only differences in synthesis of primary bile acids but also differences in renal clearance, pool size and frequency of enterohepatic circulations as well as hepatic clearance. On the basis of differences in this ratio between serum, bile and urine, and in view of findings reported by other investigators, several conclusions can be formed.

Fig. VII.1. shows a model in which the principal suggestions concerning changes in bile acid metabolism during cholestasis, as elicited in this study, are reflected.

1. The synthesis of primary bile acids in the liver is reduced or arrested. If some synthesis of primary bile acids persists, then the higher CA/CDCA ratio in bile than in serum can indicate a greater synthesis of cholic acid than of chenodeoxycholic acid. Synthesis of monohydroxy-bile acids in the liver during cholestasis probably does occur, but it must be of inconsider-

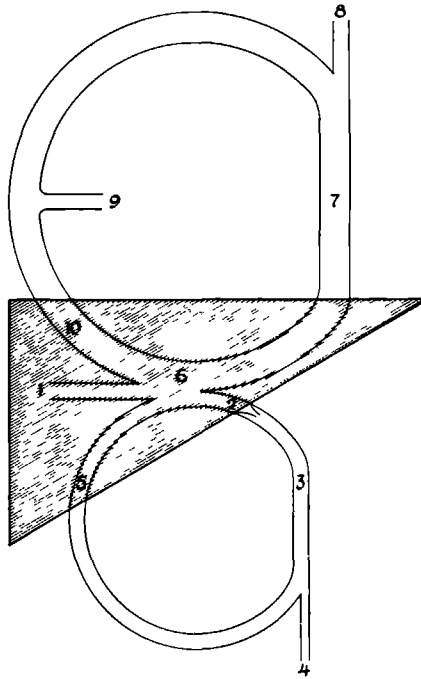


Fig. VI(VII).1 For an explanation of this figure see §VI(VII) 6.8

able quantitative significance.

2. The biliary secretion and the flow of bile acids to the intestine are reduced or discontinued. Selectively increased canalicular secretion of cholic acid could play a role in PBC. The secretion of monohydroxy-bile acids in sulphate ester form is unmistakably increased.
3. Active re-absorption of bile acids in the terminal ileum functions normally, but differences in absorption between cholic acid and chenodeoxycholic acid could be of importance.
4. Faecal excretion of bile acids is reduced or discontinued.
5. The supply of bile acids through the portal vein to the liver is decreased.
6. Retention of bile acids in the liver.
 - a. Via a selective mechanism, twice as much chenodeoxycholic acid as cholic acid is conjugated to sulphates.
 - b. There may be conversion of chenodeoxycholic acid to cholic acid.
 - c. Nor is conversion of chenodeoxycholic acid to ursodeoxycholic acid excluded.
 - d. There is probably synthesis of hyocholic acid and a 3-keto-dihydroxy-bile acid in the liver.
7. Overflow of bile acids from the liver to the systemic circulation.
8. Increased renal excretion of bile acids; selectively, more chenodeoxycholic acid than cholic acid is excreted.
9. Excretion of bile acids to the skin and the remainder of the extracellular compartment. A difference in distribution of cholic acid and chenodeoxycholic acid over the extracellular space could possibly also play a role.
10. Supply of bile acids from the systemic circulation to the liver via the hepatic artery and the superior and the inferior mesenteric artery.

It can be concluded, that in cholestasis probably different hepatic clearance mechanisms exist for cholic acid and chenodeoxycholic acid. In incomplete cholestasis, such as PBC, cholic acid is cleared by the liver to a higher extent than chenodeoxycholic acid by biliary excretion. Whereas chenodeoxycholic acid is cleared by the liver to a much higher extent than cholic acid by sulphation

and transport to the systemic circulation, where it will be cleared rapidly by the kidney in relatively higher proportions than cholic acid.

A number of the above mentioned mechanisms should enable the liver temporarily (as long as parenchymal function is still adequate) to prevent accumulation of potentially toxic bile acids such as α -dihydroxy-bile acids and specifically chenodeoxycholic acid (van Berge Henegouwen and Brandt 1974^e and 1975).

VII.6.9. Change in bile acid metabolism in cirrhosis

In the case of alcoholic cirrhosis, the total cholic acid pool is unmistakably smaller than the chenodeoxycholic acid pool, and thus the situation is the reverse of normal (Vlahcevic et al. 1972).

In fact the degree of cholic acid synthesis is believed to be of prognostic significance in liver cirrhosis (McCormick et al. 1973). The higher CA/CDCA ratio in bile than in serum in cirrhosis could also be indicative for differences in the hepatic clearance of cholic and chenodeoxycholic acid, where cholic acid will circulate proportionally more than chenodeoxycholic acid in the entero-hepatic circulation.

The relatively higher loss of chenodeoxycholic acid than of cholic acid by sulphation is compensated by a relatively higher synthesis of chenodeoxycholic acid.

LITERATUUR

- Admirand, W.H. en D.M. Small (1968). The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *J. Clin. Invest.* 47, 1043.
- Admirand, W.H. en C. Trey (1968). Lithocholate levels in diseased human liver. *Clin. Res.* 16, 278.
- Admirand, W.H. en K. Bauer (1971). Phenobarbital: an effective form of therapy in primary biliary cirrhosis. *J. Clin. Invest.* 50, 1a.
- Admirand, W.H., A. Stiehl en M.M. Thaler (1972). Sulfation of bile salts: an important metabolic pathway in cholestasis. *Gastroenterology* 62, 190.
- Alarçon-Segovia, D., A. Mayorga-Cortes en E. Wolpert (1970). Primary biliary cirrhosis: prompt relief of pruritus with azathioprine treatment. *J. Amer. Med. Ass.* 214, 367.
- Ali, S.S. en N.B. Javitt (1970). Quantitative estimation of bile salts in serum. *Can. J. Biochem.* 48, 1054.
- Anderson, K.E., E. Kok en N.B. Javitt (1972). Bile acid synthesis in man: metabolism of 7 α -hydroxycholesterol-¹⁴C and 26-hydroxycholesterol-³H. *J. Clin. Invest.* 51, 112.
- Atkinson, A.J. en W.W. Carroll (1964). Sclerosing cholangitis: association with regional enteritis. *J. Amer. Med. Ass.* 188, 183.
- Back, P. (1973). Identification and quantitative determination of urinary bile acids excreted in cholestasis. *Clin. Chim. Acta* 44, 199.
- Back, P. (1973^a). Synthesis and excretion of bile acids in a case of extrahepatic biliary atresia. *Helv. Med. Acta* 37, 193.
- Badley, B.W., G.M. Murphy, I.A.D. Bouchier en S. Sherlock (1970). Diminished micellar phase lipids in patients with chronic non-alcoholic liver disease and steatorrhea. *Gastroenterology* 58, 781.
- Bakkeren, J.A.J.M. (1968). Actief kationentransport en (Na⁺ + K⁺)-geactiveerd adenosinetriphosfatase in de lever van de rat. Proefschrift, Nijmegen.
- Balint, J.A., D.A. Beeler, E.C. Kyriades en D.H. Treble (1971).

The effect of bile salts upon lecithin synthesis. J. Lab. Clin. Med. 77, 122.

- Bell, C.C.Jr., Z.R. Vlahcevic en L. Swell (1971). Alterations in the lipids of human hepatic bile after oral administration of bile salts. Surg. Gynec. Obstet. 132, 36.
- Berge Henegouwen, G.P. van, F.B. Bronkhorst en J.W. Boersma (1973). Een Patiënte met primaire biliare cirrhose en sclerodermie. Ned. Tijdschr. Geneesk. 117, 1453.
- Berge Henegouwen, G.P. van, H.A.P.C. Oomen, J.W. Boersma, F.B. Bronkhorst, P.K. Jap en K-H. Brandt (1973^a). Non specific and auto-immune liver disease in rheumatoid arthritis. Digestion 8, 462.
- Berge Henegouwen, G.P. van, A.Th. Ruben en K-H. Brandt (1973^b). Serum and biliary bile acids in patients with primary biliary cirrhosis and cirrhosis. Digestion 8, 462.
- Berge Henegouwen, G.P. van, A.P. Hartman, J.M. Werre en K-H. Brandt (1974^a). Icterus door nifluminezuur. Ned. Tijdschr. Geneesk. 118, 1229.
- Berge Henegouwen, G.P. van, A.Th. Ruben en K-H. Brandt (1974^b). Quantitative analysis of bile acids in serum and bile using gasliquid chromatography. Clin. Chim. Acta 54, 249.
- Berge Henegouwen, G.P. van en K-H. Brandt (1974^c). De toepassing van cholestyramine bij de intrahepatische cholestase. Ned. Tijdschr. Geneesk. 118, 1229.
- Berge Henegouwen, G.P. van, K-H. Brandt en A.G.F. de Pagter (1974^d). Is an acute disturbance in the hepatic transport of bile acids the primary cause of cholestasis in benign recurrent intrahepatic cholestasis? Lancet 1, 1249.
- Berge Henegouwen, G.P. van en K-H. Brandt (1974^e). Results of bile acid analyses in serum, bile and urine of patients with primary biliary cirrhosis, liver cirrhosis and extrahepatic obstruction. Proceedings of the III Bile Acid Meeting, June 13-15, Freiburg, W.Germany. ter perse.
- Berge Henegouwen, G.P. van en K-H. Brandt (1975). Bile acid patterns in serum, bile and urine in human cholestasis. Wordt gepubliceerd.
- Bergström, S., H. Danielsson en B. Samuelsson (1960). Formation and

- metabolism of bile acids. In: K. Bloch, Lipid metabolism, p. 291, Wiley, New York.
- Bessey, O.A., O.H. Lowry en M.J. Brock (1946). A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164, 321.
- Bhatial, P.S. en L.W. Powell (1969). Primary intrahepatic obliterating cholangitis: possible variant of sclerosing cholangitis. *Gut* 10, 886.
- Blum, M. en N. Spritz (1966). The metabolism of intravenously injected isotopic cholic acid in Laennec's cirrhosis. *J. Clin. Invest.* 45, 187.
- Bode, C., H. Goebell en W. Kehl (1971). Effect of cholecystokinin-pancreozymin on bile salt secretion into the duodenal juice in patients with liver cirrhosis. *Klin. Wschr.* 49, 881.
- Boon, J.M. (1973). Intrahepatische galgangatresie; klinische, histologische en biochemische onderzoeken. Proefschrift, Nijmegen.
- Brandt, K-H. (1958). Het onderzoek van ontlasting op urobilinogenen volgens de methode van Terwen-Watson bij verschillende vormen van icterus. *Ned. Tydschr. Geneesk.* 102, 1189.
- Brandt, K-H., P.N. Meulendyk, N.J. Poulie, M.J. Schulte, H.C. Zanen en J. Streefkerk (1969). De Sgot- en Sgpt-waarden bij donors van een bloedtransfusiedienst. *Ned. Tydschr. Geneesk.* 113, 424.
- Brandt, K-H. en H.J. Furstner (1970). Huidige inzichten omtrent de primaire biliaire cirrhose. *Ned. Tydschr. Geneesk.* 114, 2080.
- Brandt, K-H., M.N. van de Heyde en D.M.H. Palsma (1972). Diagnostiek, internistische en chirurgische behandeling van een aantal afwijkingen van lever en galwegen. p. 50. Stafleu, Leiden.
- Brandt K-H., en F.B. Bronkhorst (1972). The case of a woman suffering from primary biliary cirrhosis for an unusually long time. *Folia Med. Neerl.* 15, 240.
- Burke, C.W., B. Lewis., D. Panveliwalla en S. Tabaqchali (1971). The binding of cholic acid and its taurine conjugate to serum proteins. *Clin. Chim. Acta* 32, 207.

- Durstein, S. en S. Lieberman (1958). Kinetics and mechanism of solvolysis of steroid hydrogen sulfates. *J. Amer. Chem. Soc.* 80, 5235.
- Carey, J.B. (1958). The serum trihydroxy-dihydroxy bile acid ratio in liver and biliary tract disease. *J. Clin. Invest.* 37, 1494.
- Carey, J.B. en G. Williams (1961). Relief of the pruritus of jaundice with a bile acid sequestering resin. *J. Amer. Med. Ass.* 176, 432.
- Carey, J.B. en G. Williams (1965). Lithocholic acid in human blood serum. *Science* 150, 620.
- Carey, J.B., I.D. Wilson, F. Zaki en R.F. Hanson (1966). The metabolism of bile acids with special reference to liver injury. *Medicine (Baltimore)* 45, 461.
- Carey, J.B., I.D. Wilson, F. Zaki en G. Williams (1966^a). Predominance of the dihydroxy bile acid pathway in cholesterol catabolism in liver cirrhosis: a potential source of liver injury. *J. Lab. Clin. Med.* 68, 862.
- Carey, J.B., I.D. Wilson, G. Onstad en F. Zaki (1967). Role of 12 α -hydroxylase deficiency in continuing liver injury. *J. Clin. Invest.* 46, 1042.
- Carey, J.B., I.D. Wilson en G. Williams (1967^a). Serum lithocholic acid concentration in patients with ulcerative colitis and regional enteritis. *Gastroenterology* 52, 315.
- Carey, J.B. (1969). Bile salts and hepatobiliary diseases. In: L. Schiff, *Diseases of the liver*, 3e ed., p. 103, Lippincott, Philadelphia en Toronto.
- Carman, C.T. en J.E. Gransiracusa (1955). Effect of steroid therapy on the clinical and laboratory features of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 28, 193.
- Christoffersen, P., H. Poulsen en P.J. Scheuer (1972). Abnormal bile duct epithelium in chronic aggressive hepatitis and primary biliary cirrhosis. *Hum. Path.* 3, 227.
- Chun Lam, K., S.P. Mistilis en N. Perrott (1972). Positive tissue antibody tests in patients with prolonged extrahepatic biliary obstruction. *New Engl. J. Med.* 286, 1400.
- Cooper, R.A. en J.H. Jandle (1968). Bile salts and cholesterol in the pathogenesis of target cells in obstructive

- jaundice. J. Clin. Invest. 47, 809.
- Cooper R.A., F.A. Garcia en C. Trey (1972). The effect of lithocholic acid on red cell membranes in vivo. J. Lab. Clin. Med. 79, 7.
- Cooper, R.A., M. Diloy-Puray, P. Lando en M.S. Greenberg (1972^a). An analysis of lipoproteins, bile acids and red cell membranes associated with target cells and spur cells in patients with liver disease. J. Clin. Invest. 51, 3182.
- Crigler, J.F. en N.I. Gold (1966). Sodium phenobarbital induced decrease in serum bilirubin in an infant with congenital non hemolytic jaundice and kernicterus. J. Clin. Invest. 45, 998.
- Dam, H., I. Prange, H.E. Kallehaug en H. Fenger (1971). Studies on human bile. V. Influence of cholestyramine treatment on the composition of bile in healthy subjects. Z. Ernährungsw. 10, 188.
- Danielsson, H. (1969). Mechanism of bile acid formation. In: L. Schiff, J.B. Carey en J.M. Dietschy, Bile salt metabolism, p. 91, C. Thomas, Springfield.
- Danzinger, R.G., A.F. Hofmann, L.J. Schoenfield en J.L. Thistle (1972). Dissolution of cholesterol gallstones by chenodeoxycholic acid. New Engl. J. Med. 286, 1.
- Datta, D.V. en S. Sherlock (1966). Cholestyramine for the long term relief of the pruritus complicating intrahepatic cholestasis. Gastroenterology 50, 323.
- Denk, H., J.B. Schenkman, P.G. Bacchin, F. Hutterer, F. Schaffner en H. Popper (1971). Mechanism of cholestasis. Exp. Mol. Path. 14, 263.
- Denk, H., H. Greim en F. Hutterer (1971^a). Detergent action of bile acids on hepatocellular microsomes and its role in cholestasis. Gastroenterology 60, 187.
- Dietschy, J.M. (1969). Rate controlling effects of bile salts in the intestine and the liver. In: L. Schiff, J.B. Carey en J.M. Dietschy, Bile salt metabolism, p. 13, C. Thomas, Springfield.
- Dietschy, J.M. en J.D. Wilson (1970). Regulation of cholesterol metabolism. New Engl. J. Med. 282, 1128-1138 en 282,

- Doerffel, K. (1962). Beurteilung von Analysenverfahren und - Ergebnissen. Z.f. Anal. Chem. 185, 1.
- Doniach, D. en J.G. Walker (1969). A unified concept of auto-immune hepatitis. Lancet 1, 813.
- Doniach, D., J.G. Walker, I.M. Riott en P.A. Berg (1970). "Auto-allergic" hepatitis. New Engl. J. Med. 282, 86.
- Doniach, D. (1972). The clinical significance of mitochondrial antibodies. Triangle 11, 29.
- Dowling, R.H., E. Mack en D.M. Small (1970). Effects of controlled interruption of the enterohepatic circulation of bile salts by biliary diversion and by ileal resection on bile salt secretion, synthesis and pool size in the Rhesus monkey. J. Clin. Invest. 49, 232.
- Dowling, R.H., E. Mack en D.M. Small (1971). Biliary lipid secretion and bile composition after acute and chronic interruption of the enterohepatic circulation in the Rhesus monkey. IV. Primate biliary physiology. J. Clin. Invest. 50, 1917.
- Earnest, D.L. (1972). The effect of phenobarbital on pruritus and bile salt kinetics in patients with primary biliary cirrhosis and elevated serum bile salt concentrations. In: P. Back en W. Gerok, Bile acids in human disease, p. 145, F.K. Schattauer Verlag, New York en Stuttgart.
- Einhorn, M. (1927). Le tube duodenal. Masson & Cie, Parijs.
- Elias, H. (1967). De galwegen, C.H. Boehringer Sohn, Ingelheim am Rhein.
- Elias, H. en J.C. Sherrick (1969). Morphology of the liver, Academic Press, New York.
- Elliot, W.H. en P.H. Hyde (1971). Metabolic pathways of bile acid synthesis. Amer. J. Med. 51, 568.
- Eneroth, P. (1969). Thin layer chromatography of bile alcohols and bile acids. In: G.V. Marinetti, Lipid chromatographic analysis, Vol. 2, p. 149, Dekker, New York.
- Eneroth, P. en J. Sjövall (1971). Extraction, purification and chromatographic analysis of bile acids in biological materials. In: P. Nair en D. Kritchevsky, The bile acids, Vol. 1, p. 121, Plenum Press, New York en Londen.

- Erlinger, S., D. Dhumeaux en J-P. Benhamou (1969). Effects on bile formation of inhibitors of sodium transport. Nature (Lond.) 233, 1276.
- Erlinger, S., D. Dhumeaux, P. Berthelot en M. Dumont (1970). Effect of inhibitors of sodium transport on bile formation in the rabbit. Amer. J. Physiol. 219, 416.
- Erlinger, S. (1972). Physiology of bile flow. In: H. Popper en F. Schaffner, Progress in liver disease, Vol. 4, p. 63, Grune & Stratton, New York.
- Erlinger, S., M. Beaudoin en J-P. Benhamou (1972). Cholestase recurrenente bénigne. Ann. Med. Intern. 123, 875.
- Essner, E., A.B. Novikoff en B. Masek (1958). Adenosinetriphosphatase and 5-nucleotidase activities in the plasma membrane of liver cells as revealed by electron microscopy. J. Bioch. Biophys. Cytol. 4, 711.
- Eyssen, H., G. Parmentier, F. Compernelle, J. Boon en E. Eggermont (1972). Trihydroxycoprostanic acid in the duodenal fluid of two children with intrahepatic bile duct anomalies. Biochim. Biophys. Acta 273, 212.
- Fisher, J.A. en M. Schmid (1967). Treatment of primary biliary cirrhosis with azathioprine. Lancet 1, 421.
- Fisher, M.M., R. Magnussen en K.M. Miyai (1971). Bile acid metabolism in mammals. I. Bile acid induced intrahepatic cholestasis. Lab. Invest. 25, 88.
- Forker, E.L. (1968). The effect of estrogen on bile formation in the rat. J. Clin. Invest. 48, 654.
- Forsgren, L. (1969). Studies on the intestinal absorption of labeled fat soluble vitamins (A, D, E and K) via the thoracic duct lymph in the absence of bile in man. Acta Chir. Scand. Suppl. 399.
- Foulk, W.T. en A.H. Baggenstoss (1969). Biliary cirrhosis. In: L. Schiff, Diseases of the liver, 3e ed., p. 739, Lippincott, Philadelphia.
- Fox, R.A., D.G. James, P.J. Scheuer, O. Sharma en S. Sherlock (1969). Impaired delayed hypersensitivity in primary biliary cirrhosis. Lancet 1, 959.
- Garbutt, J.T., K.W. Heaton, L. Lack en M.P. Tyor (1969). Increased ratio of glycine to taurine conjugated bile salts in

- patients with ileal disorders. *Gastroenterology* 56, 711.
- Garbutt, J.T., L. Lack en M.P. Tyor (1971). The enterohepatic circulation of bile salts in gastrointestinal disorders. *Amer. J. Med.* 51, 627.
- Garbutt, J.T. en T.J. Kenney (1972). Effect of cholestyramine on bile acid metabolism in normal man. *J. Clin. Invest.* 51, 2781.
- Gips, C.H. (1973). Reflections on the treatment of itch in primary biliary cirrhosis. *Neth. J. Med.* 16, 109.
- Glasinovic, J.C., M. Dumont, M. Duval en S. Erlinger (1973). Hepatocellular uptake of taurocholate. *Digestion*, 8, 432.
- Golding, P.L., R. Bown en A. Stuart-Mason (1971). Studies on multi-system involvement in active chronic hepatitis and primary biliary cirrhosis. In: M. Smith en R. Williams, *Immunology of the liver*, p. 194, Heinemann, Londen.
- Goudie, R.B., R.N. McSween en D.M. Goldberg (1966). Serological and histological diagnosis of primary biliary cirrhosis. *J. Clin. Path.* 19, 527.
- Gregg, J.A. (1966). New solvent system for thin layer chromatography of bile acids. *J. Lip. Res.* 7, 579.
- Greim, H., D. Trülzsch, J. Roboz, K. Dressler, P. Czygan, F. Hutterer, F. Schaffner en H. Popper (1972). Mechanism of cholestasis. 5. Bile acids in normal rat livers and those after bile duct ligation. *Gastroenterology* 63, 837.
- Greim, H., D. Trülzsch, P. Czygan, F. Hutterer, F. Schaffner en H. Popper (1972^a). Mechanism of cholestasis. 6. Bile acids in human livers with or without biliary obstruction. *Gastroenterology* 63, 846.
- Greim, H., P. Czygan, F. Hutterer en F. Schaffner (1973). Bile acids in hepatic needle biopsies and in serum of different liver diseases. *Gastroenterology* 64, 264.
- Groote, J.de., P. Goubeau en J. Vandenbroucke (1960). Ictère cholestatique récidivant. *Acta Gastro-Enterol. Belg.* 23, 747.
- Grundy, S.M., E.H. Ahrens en G. Salen (1971). Interruption of the enterohepatic circulation of bile acids in man: comparative effects of cholestyramine and ileal exclusion on cholesterol metabolism. *J. Lab. Clin. Med.* 78,

- Gumucio, J.J. en V.D. Valdivieso (1971). Studies on the mechanism of ethynyl estradiol impairment of bile flow and bile salt excretion in the rat. *Gastroenterology* 61, 339.
- Hadziyanis, S., P.J. Scheuer, T. Feizi, R. Naccarato, D. Doniach en S. Sherlock (1970). Immunological and histological studies in primary biliary cirrhosis. *J. Clin. Path.* 23, 95.
- Haemmerli, U.P. (1969). Jaundice during pregnancy. In: L. Schiff, *Diseases of the liver*, p. 1023, Lippincott, Philadelphia en Toronto.
- Haslewood, G.A.D. (1952). Comparative studies of "bile salts" 5. Bile salts of crocodylidae. *Biochem. J.* 52, 583.
- Haslewood, G.A.D. (1967). Bile salts, p. 26, Methuen & Co, Londen.
- Heath, T., I.W. Caple en P.M. Redding (1970). Effect of the enterohepatic circulation of bile salts on the flow of bile and its content of bile salts and lipids in sheep. *Quart. J. Exp. Physiol.* 55, 93.
- Heaton, K.W., S.T. Heaton en R.E. Barry (1971). An in vivo comparison of two bile salt binding agents, cholestyramine and lignin. *Scand. J. Gastroent.* 6, 281.
- Heaton, K.W. (1972). Bile salts in health and disease. p. 14, 125 en 148. Churchill Livingstone, Edinburgh en Londen.
- Hellström, K. en J. Sjövall (1961). On the origin of lithocholic acid and ursodeoxycholic acid in man. *Acta Physiol. Scand.* 51, 218.
- Hepner, G.W., A.F. Hofman en P.D. Klein (1973). Altered bile acid metabolism in cholecystectomized patients. *Gastroenterology* 64, 164.
- Herndon, J.H. (1972). Pathophysiology of pruritus associated with elevated bile acid levels in serum. *Arch. Intern. Med.* 130, 632.
- Hofmann, A.F. en D.M. Small (1967). Detergent properties of bile salts: correlation with physiological function. *Ann. rev. Med.* 18, 333.
- Hofmann, A.F. (1968). Functions of bile in the alimentary canal. In: C.F. Code, *Handbook of Physiology*, Vol. 5: Bile, Digestion, Ruminant Physiology, p. 2507, American

- Hofmann, A.F., L.J. Schoenfield, B.A. Kottke en J.R. Poley (1970). Methods for the description of bile acid kinetics in man. In: R.E. Olsen, Methods in medical research, Vol. 12, p. 149, Year Book Medical Publishers, Chicago.
- Hofmann, A.F. (1972). Bile acid malabsorption caused by ileal resection. Arch. Intern. Med. 130, 597.
- Holsti, P. (1960). Cirrhosis of the liver induced in rabbits by gastric instillation of 3-monohydroxycholanic acid. Nature (Lond.) 186, 250.
- Holsti, P. (1962). Bile acids as a cause of liver injury: cirrhotogenic effect of chenodeoxycholic acid in rabbits. Acta Path. Microbiol. Scand. 54, 479.
- Huang, T.C., C.P. Chen, V. Wefler en A. Raftery (1961). Application to rapid serum cholesterol determination. Ann. Chem. 23, 1405.
- Huisjes, H.J. (1971). Intrahepatic cholestasis of pregnancy and its treatment with cholestyramine. Europ. J. Obstet. Gynec. 1, 11.
- Hunt, R.D. (1965). Proliferation of bile ductules (the ductular cell reaction) induced by lithocholic acid. Fedn. Proc. 24, 431.
- Hutterer, F., H. Greim, D. Trürlzsch, P. Czygan en J.B. Schenkman (1972). Microsomal biotransformation system in cholestasis. In: H. Popper en F. Schaffner, Progress in liver disease, Vol. 4, p. 151, Grune & Stratton, New York.
- Itallie, T.B.van., S.A. Hashim en R.S. Crampton (1961). The treatment of pruritus and hypercholesterolaemia of primary biliary cirrhosis with cholestyramine. New Engl. J. Med. 265, 469.
- Javitt, N.B. en S. Emerman (1968). Effect of sodium taurolithocholate on bile flow and bile acid excretion. J. Clin. Invest. 47, 1002.
- Javitt, N.B. (1969). Bile salt regulation of hepatic excretory function. Gastroenterology 56, 622.
- Javitt, N.B. (1971). The cholestatic syndrome-1971. Amer. J. Med. 51, 637.

- Javitt, N.B., K.P. Morrissey, E. Siegel, H. Goldberg, L.M. Gartner, M. Hollander en E. Kok (1973). Cholestatic syndromes in infancy: Diagnostic value of serum bile acid pattern and cholestyramine administration. *Pediat. Res.* 7, 119.
- Johns, W.H. en T.R. Bates (1969). Quantification of the binding tendencies of cholestyramine: I. Effect of structure and added electrolytes on the binding of unconjugated bile salt anions. *J. Pharm. Sci.* 58, 179.
- Johns, W.H. en T.R. Bates (1970). Quantification of the binding tendencies of cholestyramine: II. Mechanism of interaction with bile salt and fatty acid salt anions. *J. Pharm. Sci.* 59, 329.
- Jones, R.S., R.E. Geist en A.D. Hall (1971). The choleric effects of glucagon and secretin in the dog. *Gastroenterology* 60, 64.
- Jonge, H.de. (1958). Inleiding tot de medische statistiek, Deel I. Uitgave Nederlands Instituut voor Preventieve Geneeskunde, Leiden.
- Kaplowitz, N., N. Finlayson en N.B. Javitt (1973). Serum bile acids in antimitochondrial antibody positive liver disease. *Gastroenterology*, 64, 184.
- Kaplowitz, N., E. Kok en N.B. Javitt (1973^a). Postprandial serum bile acids for the detection of hepatobiliary disease. *J. Amer. Med. Ass.* 225, 292.
- Karmen, A., M.F. Wroblewski en J.S. Ladue (1955). Transaminase activity in human blood. *J. Clin. Invest.* 34, 126.
- Kaye, M.D., J.E. Struthers, J.S. Tidball, F. Kern en E. Deniro (1971). Metabolism of isotopically labelled cholic acid in cirrhosis. *Gastroenterology* 60, 186.
- King, J.E. en L.J. Schoenfield (1972). Lithocholic acid, cholestasis and liver disease. *Mayo Clin. Proc.* 47, 725.
- Klaassen, C.D. (1971). Gas-liquid chromatographic determination of bile acids in bile. *Clin. Chim. Acta* 35, 225.
- Korman, M.G., W.H. Summerskill, V.L.W. Go en A.F. Hofmann (1973). Sensitivity and predictive value of serum bile acid concentration in patients with chronic active liver disease. *Gastroenterology* 65, 554.
- Kuksis, A. (1969). Gaschromatography of bile acids. In: G.V.

- Marinetti, Lipid chromatographic analysis, Vol. 2, p. 215, Dekker, New York.
- Lees, R.S. en D.E. Wilson (1971). The treatment of hyperlipemia. *New Engl. J. Med.* 284, 186.
- Lenthall, J., T.B. Reynolds en J. Donovan (1970). Excessive output of bile in chronic hepatic disease. *Surgery (St. Louis)* 130, 243.
- Lewis, B., D. Panveliwalla, S. Tabaqchali en I.D.P. Wootton (1969). Serum bile acids in the stagnant loop syndrome. *Lancet* 1, 219.
- Lottsfeldt, F.I., W. Krivitt en J.B. Aust (1963). Cholestyramine therapy in intrahepatic biliary atresia. *New Engl. J. Med.* 269, 186.
- Low-Beer, T.S., M.P. Tyor en L. Lack (1969). Effect of sulfation of tauroolithocholic and glycolithocholic acids on their intestinal transport. *Gastroenterology* 56, 721.
- Low-Beer, T.S., E.W. Pomare en J.S. Morris (1972). Control of bile salt synthesis. *Nature New Biology* 238, 215.
- Low-Beer, T.S. en E.W. Pomare (1973). Regulation of bile salt pool size in man. *Brit. Med. J.* 2, 338.
- Makino, I., S. Nakagawa en K. Mashimo (1969). Conjugated and unconjugated serum bile acid levels in patients with hepatobiliary diseases. *Gastroenterology* 56, 1033.
- Makino, I., J. Sjövall, A. Norman en B. Strandvik (1971). Excretion of 3β -hydroxy-5cholenoic and 3α -hydroxy-5 α -cholanoic acids in urine of infants with biliary atresia. *Febs Lett.* 15, 161.
- Makino, I., S. Nakagawa, K. Shinozaki en K. Mashimo (1972). Sulfated and non sulfated bile acids in human serum. *Lipids* 7, 750.
- Makino, I. en J. Sjövall (1972). A versatile method for analysis of bile acids in plasma. *Anal. Lett.* 5, 341.
- Makino, I., K. Shinozaki en S. Nakagawa (1973). Sulfated bile acids in urine of patients with hepatobiliary disease. *Lipids* 8, 47.
- Malagelada, J.R., V.L.W. Go, W.H.J. Summerskill en W.S. Gamble (1973). Bile acid secretion and biliary bile acid composition altered by cholecystectomy. *Amer. J. Dig. Dis.* 18, 455.

- Markoff, N. (1973). Primary sclerosing cholangitis. Acta Hepato-Gastroenterol. (Stuttg.) 20, 77.
- McCormick III, W.C., C.C. Bell Jr., L. Swell en Z.R. Vlahcevic (1973). Cholic acid synthesis as an index of the severity of liver disease in man. Gut 14, 895.
- Meyers, R.H., J.H. Cooper en N. Padis (1970). Primary sclerosing cholangitis. Amer. J. Gastroent. 53, 527.
- Miettinen, T.A. (1971). Mechanism of fat malabsorption in patients with liver cirrhosis. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 27, Suppl. 116, 56.
- Miettinen, T.A. en M. Siurala (1971). Micellar solubilisation of intestinal lipids and sterols in gluten enteropathy and liver cirrhosis. Scand. J. Gastroent. 6, 527.
- Miettinen, T.A. (1972). Lipid absorption, bile acids and cholesterol metabolism in patients with chronic liver disease. Gut 13, 682.
- Miettinen, T.A. (1973). Clinical implications of bile acid metabolism in man. In: P. Nair en D. Kritchevsky, The bile acids, Vol. 2, p. 191, Plenum Press, New York en Londen.
- Mitropulos, K.A. en N.B. Myant (1967). The formation of lithocholic acid, chenodeoxycholic acid and α - and β -muricholic acids from cholesterol incubated with rat liver mitochondria. Biochem. J. 103, 472.
- Moore, R.B., C.A. Crane en I.D. Frantz (1968). Effects of cholestyramine on the fecal excretion of i.v. administered cholesterol-4-¹⁴C and its degradation products in a hypercholesterolaemic patient. J. Clin. Invest. 47, 1664.
- Morgan, R.G.H. en B. Børgström (1969). The mechanism of fat absorption in the bile fistula rat. Quart. J. Exp. Physiol. 54, 228.
- Mosbach, E.H., M.A. Rothschild, I. Bekersky, M. Oratz en J. Mongelli (1971). Bile acid synthesis in the isolated perfused rabbit liver. J. Clin. Invest. 50, 1720.
- Mosbach, E.H. (1972). Hepatic synthesis of bile acids: biochemical steps and mechanisms of rate control. Arch. Intern. Med. 130, 478.
- Muller, P. en J.C.M. Verschure (1954) Klinische methoden,

- Murphy, G.M., B.H. Billing en D.N. Baron (1970). A fluorimetric and enzymatic method for the estimation of serum total bile acids. *J. Clin. Path.* 23, 594.
- Murphy, G.M., A. Ross en B.H. Billing (1972). Serum bile acids in primary biliary cirrhosis. *Gut* 13, 201.
- Murphy, G.M., F.H. Jansen en B.H. Billing (1972^a). Unsaturated monohydroxy bile acids in cholestatic liver disease. *Biochem. J.* 129, 491.
- Nair, P., M. Gordon, S. Gordon, J. Reback en A.I. Mendeloff (1965). The cleavage of bile acid conjugates by cell free extracts from *Clostridium Perfringens*. *Life Sci.* 4, 1887.
- Nair, P., M. Gordon en J. Reback (1967). The enzymatic cleavage of the carbonnitrogen bond in 3α , 7α , 12α -trihydroxy- 5β -cholan-24-oyl-glycine. *J. Biol. Chem.* 242, 7.
- Nair, P. (1969). Enzymatic cleavage of bile acid conjugates. In: L. Schiff, J.B. Carey en J.M. Dietschy, *Bile Salt metabolism*, p. 172, C. Thomas, Springfield.
- Neale, G., B. Lewis, V. Weaver en D. Panveliwalla (1971). Serum bile acids in liver disease. *Gut* 12, 145.
- Nilsson, S. en T. Scherstén (1969). Importance of bile acids for phospholipid secretion into human hepatic bile. *Gastroenterology* 57, 525.
- Nilsson, S. (1970). Synthesis and secretion of biliary phospholipids in man. *Acta Chir. Scand., Suppl.* 405.
- Norman, A. en J. Sjövall (1960). Formation of lithocholic acid from chenodeoxycholic acid in the rat. *Acta Chem. Scand.* 14, 1815.
- Norman, A. en R.H. Palmer (1964). Metabolism of lithocholic acid- 24 - ^{14}C in human bile and feces. *J. Lab. Clin. Med.* 63, 986.
- Norman, A. en B. Strandvik (1971). Formation and metabolism of bile acids in extrahepatic biliary atresia. *J. Lab. Clin. Med.* 78, 181.
- Orrenius, S., J.L.E. Ericsson en L. Ernster (1965). Phenobarbital induced synthesis of the microsomal drug-metabolizing enzyme system and its relationship to the proliferation

- of endoplasmocytic membranes: a morphological and biochemical study. *J. Cell. Biol.* 25, 627.
- Osborn, E.C., I.D.P. Wootton, L.C. Da Silva en S. Sherlock (1959). Serum bile acid levels in liver disease. *Lancet* 2, 1049.
- Pagter, A.G.F.de., G.P. van Berge Henegouwen, K-H. Brandt en J.A. ten Bokkel Huinink (1974). Familial form of benign recurrent intrahepatic cholestasis. Wordt gepubliceerd.
- Palmer, R.H. en Z. Hruban (1966). Production of bile duct hyperplasia and gallstones by lithocholic acid. *J. Clin. Invest.* 45, 1255.
- Palmer, R.H. (1967). The formation of bile acid sulfates: a new pathway of bile acid metabolism in humans. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 58, 1047.
- Palmer, R.H. (1969). Toxic effects of lithocholic acid and related 5-B-H.steroids. In: L. Schiff, J.B. Carey en J.M. Dietschy, Bile salt metabolism, p. 184, C. Thomas, Springfield.
- Palmer, R.H. (1971). Bile acid sulfates II. Formation and excretion of lithocholic acid sulfates in the rat. *J. Lip. Res.* 12, 680.
- Palmer, R.H. en M.G. Bolt (1971). Bile acid sulfates I. Synthesis of lithocholic acid sulfates and their identification in human bile. *J. Lip. Res.* 12, 671.
- Palmer, R.H. (1972). Bile acids, liver injury and liver disease. *Arch. Intern. Med.* 130, 606.
- Panveliwalla, D., B. Lewis, I.D.P. Wootton en S. Tabaqchali (1970). Determination of individual bile acids in biological fluids by thin-layer chromatography and fluorimetry. *J. Clin. Path.* 23, 309.
- Paronetto, F. en H. Popper (1970). Immunologic aspects of liver diseases. In: H. Popper en F. Schaffner, Progress in liver disease, Vol. 3, Hfdst. 19, Grune & Stratton, New York.
- Paumgartner, G. en G. Grabner (1970). Das Verhalten konjugierter Gallensäuren des serums bei Erkrankungen der Leber. *Acta Hepato-Splenol. (Stuttg.)* 17, 334.
- Pellizarri, E.D., F.S. O'Neil, R.W. Former en L.F. LeFabr e (1973).

Identification of lithocholic acid and measurement of other bile acids in serum of healthy humans. Clin. Chem. 19, 248.

- Perez, V., F. Schaffner en H. Popper (1972). Hepatic drug reaction. In: H. Popper en F. Schaffner, Progress in liver disease, Vol. 4, p. 597, Grune & Stratton, New York.
- Persijn, J.P., W. van de Slik, K. Kramer en C.A. de Ruyter (1968). A new method for the determination of serum nucleotidase. Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 6, 441.
- Persijn, J.P., W. van der Slik, C.J. Timmer en A.W. Bon (1969). A new method for determination of serum nucleotidase II. A simplified procedure. Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 7, 199.
- Persijn, J.P., W. van der Slik en A.W. Bon (1969^a). A new method for the determination of serum nucleotidase III. Inhibition of alkaline phosphatase. Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 7, 493.
- Persijn, J.P., W. van der Slik, C.J. Timmer en C.M. Reyntjes (1970). A new method for the determination of serum nucleotidase IV. Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 8, 389.
- Pesendorfer, F. en O. Krassnitzky (1970). The Australia/S-H antigen: detection and clinical significance. Triangle 2, 265.
- Phelan, M.D., G. Neagle en D.W. Moss (1971). Serial studies of serum alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase levels in hepatobiliary disease. Clin. Chim. Acta 32, 95.
- Pomare, E.W. en K.W. Heaton (1973). Alteration of bile acid metabolism by dietary fibre (bran). Brit. Med. J. 4, 262.
- Popper, H. en F. Schaffner (1970). Pathophysiology of cholestasis. Hum. Path. 1, 1.
- Popper, H. en F. Schaffner (1970^a). Non suppurative destructive chronic cholangitis and chronic hepatitis. In: H. Popper en F. Schaffner, Progress in liver disease, Vol. 3, Hfdst. 21, Grune & Stratton, New York.
- Popper, H. (1972). Gallensäuren und cholestase. Leber Magen Darm. 2, 205.
- Porter, H.P., D.R. Saunders, G. Tytgat, O. Brunser en C.E. Rubin

- (1971). Fat absorption in bile fistula man: A morphological and biochemical study. *Gastroenterology* 60, 1008.
- Prandi, D., S. Erlinger, J.C. Glasinovic en M. Dumont (1973). Canalicular bile production in man. *Digestion* 8, 437.
- Preisig, R., H.L. Cooper en H.O. Wheeler (1962). The relationship between taurocholate secretion rate and bile production in the unanesthetized dog during cholinergic blockage and during secretin administration. *J. Clin. Invest.* 41, 1152.
- Rautureau, M., B. Chevrel en J. Caroli (1967). Les acides biliaires sanguins en hepatologie. *Rev. Med. Chir. Mal. Foie* 42, 232.
- Read, A.E. (1971). Clinical spectrum of auto-immune liver disease. In: M. Smith en R. Williams, *Immunology of the liver*, p. 1, Heinemann, Londen.
- Redinger, R.N. en D.M. Small (1972). Bile composition, bile salt metabolism and gallstones. *Arch. Intern. Med.* 130, 618.
- Redinger, R.N. en D.M. Small (1973). Primate biliary physiology VIII. The effect of phenobarbital upon bile salt synthesis and pool size, biliary lipid secretion and bile composition. *J. Clin. Invest.* 52, 161.
- Rodriguez, M., F. Paronetto, F. Schaffner en H. Popper (1969). Antimitochondrial antibodies in jaundice following drug administration. *J. Amer. Med. Ass.* 208, 148.
- Roovers, J., E. Evrard en J. Vanderhaeghe (1968). An improved method for measuring human blood bile acids. *Clin. Chim. Acta* 19, 449.
- Rosenfeld, R.S. en L. Hellman (1962). Excretion of steroid acids in man. *Arch. Biochem. Biophys.* 97, 406.
- Ross, A. en S. Sherlock (1971). Experience with azathioprine in primary biliary cirrhosis. In: M. Smith en R. Williams, *Immunology of the liver*, p. 258, Heinemann, Londen.
- Rubin, E., F. Schaffner en H. Popper (1965). Primary biliary cirrhosis: non suppurative destructive cholangitis. *Amer. J. Path.* 46, 387.
- Rudman, D. en F.E. Kendall (1957). Bile acid content of human serum II. The binding of cholanic acids by human plasma

- proteins. J. Clin. Invest. 36, 538.
- Rudman, D. en F.L. Kendall (1957^a). Bile acid content of human serum I. Serum bile acids in patients with hepatic disease. J. Clin. Invest. 36, 530.
- Rümke, Chr.L. en C. van Deden (1961). Statistiek voor medici, Stafleu, Leiden.
- Salen, G., G.S. Tint, B. Eliav, N. Deering en E.H. Mosbach (1974). Increased formation of ursodeoxycholic acid in patients treated with chenodeoxycholic acid. J. Clin. Invest. 53, 612.
- Samuels, A.D. en R.H. Palmer (1973). Conversion of chenodeoxycholic acid to cholic acid in humans with obstructive jaundice. Gastroenterology 64, 168.
- Sandberg, D.H., J. Sjövall, K. Sjövall en D.A. Turner (1965). Measurement of human serum bile acids by gas-liquid chromatography. J. Lip. Res. 6, 182.
- Schaffner, F., F.H. Klion en A.J. Latuff (1965). The long term use of cholestyramine in the treatment of primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 48, 293.
- Schaffner, F. en N.D. Javitt (1966). Morphologic changes in hamster liver during intrahepatic cholestasis induced by tauroolithocholate. Lab. Invest. 15, 1783.
- Schaffner, F. en H. Popper (1969). Cholestasis is the result of hypoactive hypertrophic smooth endoplasmic reticulum in the hepatocyte. Lancet 2, 355.
- Schaffner, F., P.C. Bacchin, F. Hutterer en H. Popper (1971). Mechanism of cholestasis IV. Structural and biochemical changes in the liver and serum in rats after bile duct ligation. Gastroenterology 60, 888.
- Schalm, L. (1962). Leverbeschadiging door geneesmiddelen. Ned. Tijdschr. Geneesk. 107, 2278.
- Schapiro, R.H. en K.J. Isselbacher (1963). Benign recurrent intrahepatic cholestasis. New Engl. J. Med. 268, 708.
- Scherstén, J., S. Nilsson, L. Cahlin, M. Filipson en G. Brodin-Person (1971). Relationship between the biliary excretion of bile acids and the excretion of water, lecithin and cholesterol in man. Europ. J. Clin. Invest. 1, 242.

- Scheuer, P.J. (1973). Liver biopsy interpretation, 2 ed., Baillière, Tindall en Cassell, Londen.
- Schoenfield, L.J., J. Sjövall en E. Perman (1967). Bile acids on the skin of patients with pruritic hepatobiliary disease. *Nature (Lond.)* 213, 93.
- Schoenfield, L.J. (1969). The relationship of bile acids to pruritus in hepatobiliary disease. In: L. Schiff, J.D. Carey en J.M. Dietschy, Bile salt metabolism, p. 257, C. Thomas, Springfield.
- Sharp, H.L., J.B. Carey, J.G. White en W. Krivit (1967). Cholestyramine therapy in patients with a paucity of intrahepatic bile ducts. *J. Pediat.* 71, 723.
- Sharp, H.L. en B.L. Mirkin (1972). Effect of phenobarbital on hyperbilirubinemia, bile acid metabolism and microsomal enzyme activity in chronic intrahepatic cholestasis of childhood. *J. Pediat.* 81, 116.
- Shefer, S., S. Hauser, I. Bekersky en E.H. Mosbach (1970). Biochemical site of regulation of bile acid biosynthesis in the rat. *J. Lip. Res.* 11, 404.
- Sherlock, S. (1968). Chronic cholangitis: Aetiology, diagnosis and treatment. *Brit. Med. J.* 3, 515.
- Sherlock, S. (1971). Diseases of the liver, 4 ed., p. 395, Blackwell Scientific Publ., Oxford.
- Sherlock, S. en P.J. Scheuer (1973). Current concepts: Primary biliary Cirrhosis. *New Engl. J. Med.* 289, 674.
- Simmonds, W.J., M.G. Korman, V.L.W. Go en A.F. Hofmann (1973). Radio-immunoassay of conjugated cholylyl bile acids in serum. *Gastroenterology* 65, 705.
- Simon, F.R. en I.M. Arias (1972). Alterations in liver plasma membranes and their possible role in cholestasis. *Gastroenterology* 62, 342.
- Sjövall, J. (1960). Bile acids in man under normal and pathological conditions. Bile acids and steroids. *Clin. Chim. Acta* 5, 33.
- Sjövall, J. (1964). Separation and determination of bile acids. In: D. Glick, Methods of biochemical analysis, Vol. 12, p. 97, Interscience, New York.
- Sjövall, J. (1969). Use of gaschromatography-mass spectrometry in

- the study of bile acid metabolism. In: L. Schiff, J.B. Carey en J.M. Dietschy, Bile salt metabolism, p. 205, C. Thomas, Springfield.
- Small, D.M., M. Bourges en D.G. Dervichian (1966). Ternary and quarternary aqueous systems containing bile salt, lecithin and cholesterol. *Nature (Lond.)* 211, 816.
- Small, D.M. en W.H. Admirand (1969). Solubility of bile salts. *Nature (Lond.)* 221, 265.
- Small, D.M. en S. Rapo (1970). Source of abnormal bile in patients with cholesterol gallstones. *New Engl. J. Med.* 283, 53.
- Small, D.M. (1970). The formation of gallstones. *Advances Intern. Med.* 16, 243.
- Small, D.M., R.H. Dowling en R.N. Redinger (1972). The enterohepatic circulation of bile salts. *Arch. Intern. Med.* 130, 552.
- Sobotka, H. (1937). *Physiological chemistry of the bile*. Baillière, Tindall en Cox, Londen.
- Soloway, R.D., L.J. Thistle en L.J. Schoenfield (1971). Hepatic lipid secretion and cholelithiasis. *Amer. J. Dig. Dis.* 16, 437.
- Soloway, R.D., A.F. Hofmann, P.J. Thomas en L.J. Schoenfield (1971^a). Dehydrocholic acid: Hepatic metabolism and effect on biliary secretion in man. *Gastroenterology* 60, 754.
- Sperber, I. (1959). Secretion of organic anions in the formation of urine and bile. *Pharm. Rev.*, 11, 109.
- Sperber, I. (1965). Biliary secretion of organic anions and its influence on bile flow. In: W. Taylor, *The biliary system*, p. 457, Blackwell, Oxford.
- Spiegel, E.L., W. Schubert, E. Ferris en L. Schiff (1965). Benign recurrent intrahepatic cholestasis with reponse to cholestyramine. *Amer. J. Med.* 39, 682.
- Stern, R.B., R.P. Knill-Jones en R. Williams (1973). Pitfalls in the diagnosis of jaundice due to carcinoma of the pancreas or biliary tree. *Brit. Med. J.* 1, 533.
- Stiehl, A. (1972). Bile salt sulfates in intra- and extrahepatic cholestasis. In: P. Back en W. Gerok, *Bile acids in human diseases*, p. 73, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart en New York.

- Stiehl, A. en W. Admirand (1972). The effect of phenobarbital on bile salts and bilirubin in patients with intrahepatic and extrahepatic cholestasis. *New Engl. J. Med.* 286, 858.
- Stiehl, A. (1973). Sulfation of bile salts in patients with extrahepatic obstruction, hepatitis and cirrhosis. *Digestion* 8, 440.
- Stiehl, A. (1974). Bile salt sulphates in cholestasis. *Europ. J. Clin. Invest.* 4, 59.
- Strasberg, S., B.C. Dorn, R.N. Redinger en D.M. Small (1971). The effects of alteration of biliary pressure on bile composition - a method for study. *Gastroenterology* 61, 357.
- Summerskill, W.H.J. en J.M. Walshe (1959). Denign recurrent intrahepatic "obstructive" jaundice. *Lancet* 2, 686.
- Swell, L., C.C. Bell Jr. en C. Entenman (1968). Bile acids and lipid metabolism III. Influence of bile acids on phospholipids in liver and bile of the isolated perfused dog liver. *Biochim. Biophys. Acta* 164, 278.
- Swell, L., C. Entenman, G.F. Leong en R.J. Holloway (1968^a). Bile acids and lipid metabolism IV. Influence of bile acids on biliary and liver organel phospholipids and cholesterol. *Amer. J. Physiol.* 215, 1390.
- Takao, T., M. Nishimura en S. Nagamitsu (1972). The differential diagnosis of jaundice by analysis of urine bile acid contents. *Gastroenterologia Japonica* 7, 56.
- Thompson, B.W., R.C. Read en H.J. White (1972). Sclerosing cholangitis. *Arch. Surg.* 104, 460.
- Thureborn, E. (1962). Human hepatic bile composition changes due to altered enterohepatic circulation. *Acta Chir. Scand. Suppl.* 303.
- Tinckler, L. (1972). Primary sclerosing cholangitis. *Postgrad. Med. J.* 47, 666.
- Tongeren, J.H.M. van (1967). *Elwitverlies via de darmwand*. Proefschrift, Nijmegen.
- Turnberg, L.A. en G. Grahame (1970). Bile salt secretion in cirrhosis of the liver. *Gut* 11, 126.
- Tygstrup, N. (1960). Intermittent possibly familial intrahepatic

- cholestatic jaundice. *Lancet* 1, 1171.
- Tygstrup, N. en B. Jensen (1969). Intermittent intrahepatic cholestasis of unknown etiology in five males from the Faroe Islands. *Acta Med. Scand.* 185, 523.
- Van den Heuvel, W., C. Sweeley en E.C. Horning (1960). Micro-analytical separations by gaschromatography in the sex hormone and bile acid series. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, 33.
- Vink, D. (1970). Verestering van vetzuren en dicarbonszuren met diazomethaan t.b.v. gaschromatografie. *Aku Research Arnhem* (niet gepubliceerd).
- Vlahcevic, Z.R., C.C. Bell Jr., en L. Swell (1970). Significance of the liver in the production of lithogenic bile in man. *Gastroenterology* 59, 62.
- Vlahcevic, Z.R., C.C. Bell Jr., I. Buhac, J.T. Farrar en L. Swell (1970^a). Diminished bile acid pool size in patients with gallstones. *Gastroenterology* 59, 165.
- Vlahcevic, Z.R., I. Buhac, C.C. Bell Jr. en L. Swell (1970^b). Abnormal metabolism of bile acids in patients with cirrhosis. *Gut* 11, 420.
- Vlahcevic, Z.R., J.R. Miller, J.T. Farrar en L. Swell (1971). Kinetics and pool size of primary bile acids in man. *Gastroenterology* 61, 85.
- Vlahcevic, Z.R., I. Buhac, J.T. Farrar, C.C. Bell Jr., en L. Swell (1971^a). Bile acid metabolism in patients with cirrhosis I. Kinetic aspects of cholic acid metabolism. *gastroenterology* 60, 491.
- Vlahcevic, Z.R., P. Juttyudata, C.C. Bell Jr., en L. Swell (1972). Bile acid metabolism in patients with cirrhosis II. Cholic and chenodeoxycholic acid metabolism. *Gastroenterology* 62, 1174.
- Vlahcevic, Z.R., T. Yoshida, P. Juttyudata, C.C. Bell Jr., en L. Swell (1973). Bile acid metabolism in cirrhosis III. Biliary lipid secretion in patients with cirrhosis and its relevance to gallstone formation. *Gastroenterology* 64, 298.
- Wachstein, M. en E. Meisel (1958). Substrate specific phosphatases at pH 7.2 in biliary obstruction and liver cell damage.

Arch, Path. 65, 449.

- Wachtel, N., S. Emerman en N.B. Javitt (1968). Metabolism of cholest-5-ene-3 β -26-diol in the rat and hamster. J. Biol. Chem. 243, 5207.
- Warren, K.W., S. Athanassiades en J.J. Mange (1966). Primary sclerosing cholangitis. Amer. J. Surg. 11, 23.
- Weiner, I.M., J.E. Glasser en L. Lack (1964). Renal excretion of bile acids: Taurocholic, glycocholic and cholic acids. Amer. J. Physiol. 207, 964.
- Weis, H.J. en J.M. Dietschy (1971). Presence of an intact cholesterol feedback mechanism in the liver in biliary stasis. Gastroenterology 61, 77.
- Weis, H.J. en E.U. Baas (1972). Causes of hypercholesterolaemia after biliary ligation in the rat. In: P. Back en W. Gerok, Bile acids in human disease, p. 121, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart.
- Werre, J.M., P.W. Helleman, M.C. Verloop en J. de Gier (1970). Causes of macroplania of erythrocytes in diseases of the liver and biliary tract with special reference to leptocytosis. Brit. J. Haemat. 19, 223.
- Werre, J.M. (1972). Anemie bij leverziekten. In: Bloed-I, p. 103, Stafleu, Leiden.
- Wheeler, H.O. (1968). Water and electrolytes in bile. In: C.F. Code, Handbook of physiology, Section 6, Alimentary canal, p. 2409. American physiological society, Washington.
- Wheeler, H.O. (1969). Secretion of bile. In: L. Schiff, Diseases of the liver, 3e ed., p. 84, Lippincott, Philadelphia en Toronto.
- Williams, C.N. en J.R. Senior (1971). ³H-cholic acid and ¹⁴C-chenodeoxycholic acid kinetic studies in Laennec's cirrhosis: correlation with steatorrhea and pancreatic function. Gastroenterology 60, 737.
- Williams, C.N., R. Kaye, L. Daker, R. Hurwitz en J.R. Senior (1972). Progressive familial cholestatic cirrhosis and bile acid metabolism. J. Pediat. (St.Louis). 81, 493.
- Williams, R., M.A. Cartter, S. Sherlock, P.J. Scheuer en K.R. Hill (1964). Idiopathic recurrent cholestasis: a study of

the functional and pathological lesions in four cases.

Quart. J. Med. New Series, 131, 387.

Wilson, F.A. en J.M. Dietschy (1972). Approach to the malabsorption syndromes associated with disorderd bile acid metabolism.

Arch. Intern. Med. 130, 584.

Wilson, J.D. (1972). The role of bile acids in the overall regulation of steroid metabolism. Arch. Intern. Med. 130, 493.

Witmans, J., L. Schalm en M.J. Schulte (1961). Some aspects of bilirubin determination. Clin. Chim. Acta 6, 7.

Wroblewski, M.F. en J.S. Ladue (1956). Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 91, 569.

Nomenclatuur galzuren

<u>Triviale naam</u>	<u>Systematische naam</u>
Cholzuur	3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 β -cholaanzuur
Chenodesoxycholzuur	3 α , 7 α -dihydroxy-5 β -cholaanzuur
Desoxycholzuur	3 α , 12 α -dihydroxy-5 β -cholaanzuur
Lithocholzuur	3 α -monohydroxy-5 β -cholaanzuur
Isolithocholzuur	3 β -monohydroxy-5 β -cholaanzuur
Allolithocholzuur	3 α -monohydroxy-5 α -cholaanzuur
Ursodesoxycholzuur	3 α , 7 β -dihydroxy-5 β -cholaanzuur
α -Muricholzuur	3 α , 6 β , 7 α -trihydroxy-5 β -cholaanzuur
β -Muricholzuur	3 α , 6 β , 7 β -trihydroxy-5 β -cholaanzuur
3 β -Monohydroxy- Δ^5 -choleenzuur	idem
7-Ketolithocholzuur	7-keto-3 α -monohydroxy-5 β -cholaanzuur
7-Ketodesoxycholzuur	7-keto-3 α , 12 α -dihydroxy-5 β -cholaanzuur
Dehydrocholzuur (Erebile ^R)	3, 7, 12-keto-5 β -cholaanzuur
Hyocholzuur	3 α , 6 α , 7 α -trihydroxy-5 β -cholaanzuur

DANKBETUIGING

Dit onderzoek werd in 1971 gestart onder leiding van Dr L. Schalm en na diens vertrek in januari 1973 voortgezet onder leiding van Dr K-H. Brandt. Beiden hebben dit onderzoek zeer gestimuleerd.

Zonder de enthousiaste medewerking van Annie Ruben, die de galzuurbepalingen verrichtte, en van Nelly Gudden, die het type-werk verzorgde, zou dit onderzoek onmogelijk geweest zijn.

Bij het bewerken van de gegevens ondervond ik veel steun van mijn collegae van de afdeling Inwendige Geneeskunde, in het bijzonder van Dr R.A.F. Chamuleau, Dr H.A.P.C. Oomen, Dr A.J.M. Vogten en van de patholoog-anatoom F.B. Bronkhorst, die de leverbiopten beoordeelde. Dr J.H. Veerkamp, Biochemisch Instituut van de Medische Faculteit der Universiteit Nijmegen gaf nuttige adviezen betreffende de opzet van het hoofdstuk "Methoden van onderzoek". De statistische analyse van de bij het onderzoek verkregen gegevens werd uitgevoerd onder leiding van Drs Ph. van Elteren (Mathematisch-Statistische Adviesafdeling van de Nijmeegse Universiteit), van wie ik vele waardevolle adviezen mocht ontvangen. Prof. Dr H. Eyssen en Dr G. Parmentier (REGA-Instituut van de Universiteit te Leuven) ben ik zeer erkentelijk voor de uitgebreide analyse van enige urinemonsters.

I am much indebted to Dr A.F. Hofmann (Division of Gastroenterology, Mayo Clinic and Mayo Foundation, Rochester, Minnesota) on behalf of control determinations of serum cholic acid with his sensitive radioimmuno assay.

De tekeningen werden vervaardigd door de Heer C.P. Nicolassen (Tekenkamer van de Medische Faculteit van de Universiteit te Nijmegen; Hoofd: J.J. de Bekker) en de afdeling Medische Fotografie maakte dit materiaal drukklaar.

Deze uitgave kwam tot stand mede dank zij de financiële steun van de Jan Dekker- en de Dr Ludgardine Bouwmanstichting en de Wellcome Foundation.

STELLINGLN

I

Bij aanwezigheid van cholestase is een selectieve conjugatie van sulfaatgroepen aan galzuren, bedoeld als detoxificatie-mechanisme, van grote betekenis.

Dit proefschrift.

II

Een synthese van monohydroxygalzuren in de lever als oorzaak van intrahepatische cholestase bij de mens is onwaarschijnlijk.

Dit proefschrift.

III

De door de lever geproduceerde lithogene gal is de primaire oorzaak van het ontstaan van cholesterolhoudende galstenen.

Vlahcevic, Z.R. e.a. Gastroenterology (1970) 59, 62-69, idem (1970) 59, 165-173 en idem (1972) 62, 73-83.

Almond, H.R. e.a. New Engl. J. Med. (1973) 289, 1213-1216.

IV

Er zijn aanwijzingen dat dragers van het hepatitis B-Antigeen door geslachtsgemeenschap hepatitis bij hun partners kunnen overbrengen.

Heathcote, J. e.a. Lancet (1974) I, 71-73, idem (1974) II, 370-372.

V

Een slechts matig verhoogde serum alkalische fosfatase-activiteit is een niet ongewone bevinding bij extrahepatische obstructie-icterus.

Stern, R.B. e.a. Brit. Med. J. (1973) 1, 533-534.

VI

De secundaire hyperoxalurie die na ileumresectie kan ontstaan, is het gevolg van een meer dan normale oxalaatabsorptie uit het dieet.

Chadwick, V.S. e.a. New Engl. J. Med. (1973) 289, 172-176.

Earnest, D.L. e.a. Gastroenterology (1974) 66, 1114-1122.

VII

Het gebruik van het verzadigingspercentage van ijzer in serum heeft voor de diagnose ijzergebrek weinig waarde.

Omnibus, Informatieblad voor en door artsen in Arnhem en omgeving (1972), 6, 22.

VIII

Het antidiuretisch effect van carbamazepine (Tegretol^R) berust niet op een verhoogde productie van endogeen arginine-vasopressine.

Meinders, A.L. e.a. Clin. Sci. and Mol. Biol. (1974) ter perse.

IX

Dat bij lijdens aan chronische hepatitis met hyperimmune kenmerken en bij lijdens aan primaire biliare cirrhose regelmatig ook renale tubulaire acidose, het syndroom van Sjögren, rheumatoide arthritis of sclerodermie wordt aangetroffen, wijst op het bestaan van een "systeemziekte".

X

Het is de vraag of bij de behandeling van het coma diabeticum het streven gericht moet zijn op een zo snel mogelijke normalisatie van biochemische afwijkingen.

Arieff, A.I. en C.R. Kleeman. J. Clin. Endocrinol. Metab. (1974) 38, 1057-1067.

XI

Een volwaardige voeding verhindert het ontstaan van alcohol-hepatitis of alcohol-cirrhose niet.

Rubin, E. en C.S. Lieber. New Engl. J. Med. (1974) 290, 128-135.

XII

Het is zeer de vraag of de huisarts "nieuwe stijl" toegerust is voor de taak in het eerste échalon die hem krachtens de structuurnota gezondheidszorg toegemeten wordt.

XIII

De huidige herenmode werkt bewegingsarmoede in de hand.

