

Evaluation of multiple-scoring system for non-alcoholic fatty liver patients based on CK18 levels, lipid profile and liver enzymes

Teimouri N¹, Nayeri H^{2*}

1- Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, I. R. Iran.

2- Department of Biochemistry, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, I. R. Iran.

Received July 7, 2015; Accepted November 11, 2015

Abstract:

Background: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), the most common liver disease is usually associated with conditions such as steatosis, steatohepatitis and cirrhosis. Liver biopsy, which is the reference, gold standard and invasive method for the diagnosis of the disease may have complications. Scoring systems are among the noninvasive diagnostic methods. Numerous noninvasive scoring systems based on routinely measured clinical and laboratory parameters were provided that identifies the steatosis and advanced fibrosis in patients with NAFLD. In this study, several scoring system in patients with NAFLD were evaluated.

Materials and Methods: This case-control study was carried out on sonographically established NAFLD (n=51) patients and healthy individuals (n=30). Anthropometric factors, biochemical tests and CK-18 fragment levels were evaluated. Then the scores for hepatic steatosis index, fatty liver index, aspartate aminotransferase (AST) to platelets ratio index (APRI) were calculated. In addition, the BARD and (non-alcoholic steatohepatitis (NASH) scores were calculated.

Results: In this study, as expected, except for FIB-4, there was no significant difference between the two groups.

Conclusions: Scoring systems examined in this study can help to predict the presence or absence of fibrosis and NAFLD or NASH.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease, Non-alcoholic steatohepatitis, Cytokeratin 18, Scoring system

* **Corresponding Author.**

Email: hnaieri@gmail.com

Tel: 0098 913 102 2278

Fax: 0098 313 742 0134

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2017; Vol. 21, No 1, Pages 57-65

Please cite this article as: Teimouri N, Nayeri H. Evaluation of multiple-scoring system for non-alcoholic fatty liver patients based on CK18 levels, lipid profile and liver enzymes. *Feyz* 2017; 21(1): 57-65.

ارزیابی بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکلی با چند سیستم نمره‌دهی بر اساس سطح CK18، پروفایل لیپیدی و آنزیم‌های کبدی

ناهد تیموری^۱، هاشم نیری^{۲*}

خلاصه:

سابقه و هدف: کبد چرب غیرالکلی (Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)، بیماری شایع کبدی همراه با تغییراتی چون استئاتوز، استئاتوهپاتیت و سیروز می‌باشد. نمونه برداری از کبد، روش مرجع، استاندارد و البته تهاجمی برای تشخیص این بیماری است که ممکن است دارای عوارض باشد. از روش‌های تشخیصی غیرتهاجمی سیستم‌های نمره‌دهی هستند. و چند سیستم نمره‌دهی بر اساس شاخص‌های بالینی و آزمایشگاهی ساده برای شناسایی استئاتوز و فیروز پیشرفته در بیماران مبتلا به NAFLD ارائه شده است. این پژوهش به بررسی این سیستم‌ها در بیماران کبد چرب غیرالکلی پرداخته است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه مورد-شاهدی حاضر ۵۱ بیمار مبتلا به NAFLD اثبات شده با سونوگرافی و ۳۰ فرد سالم مورد مطالعه قرار گرفتند. پارامترهای تن‌سنجی و آزمایشات بیوشیمیایی و سطح قطعه سیتوکراتین-۱۸ (CK-18) اندازه‌گیری شد. برای این افراد شاخص استئاتوز کبدی، ایندکس آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) نسبت به پلاکت (APRI)، شاخص کبد چرب، نمره BARD تشکیل شده از ۳ متغیر نسبت $AST/ALT \geq 0.8$, $BMI \geq 28$ و وجود دیابت، نمره پیش‌بینی NASH (Nonalcoholic Steatohepatitis) که ترکیبی از ALT، پلاکت، قطعه (CK-18) و تری‌گلیسیرید (TG) و FIB-4 است، با استفاده از فرمول محاسبه شد.

نتایج: همان‌گونه که انتظار می‌رفت FIB-4 ارتباط معنی‌داری بین دو گروه نشان نداد، ولی سایر سیستم‌های نمره‌دهی در دو گروه تفاوت معنی‌داری نشان دادند.

نتیجه‌گیری: سیستم‌های نمره‌دهی مورد بررسی در مطالعه حاضر می‌توانند در پیش‌گویی NAFLD و NASH وجود یا عدم وجود فیروز کمک کننده باشند.

واژگان کلیدی: کبد چرب غیرالکلی، استئاتوهپاتیت غیرالکلی، سیتوکراتین ۱۸، سیستم‌های نمره‌دهی

دو ماه‌نامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶، صفحات ۶۵-۵۷

مقدمه

در قسمت شمال ایران شیوع کبد چرب غیرالکلی و سندروم متابولیک به ترتیب ۴۳/۸ و ۲۹/۶ درصد گزارش شده است [۳]. در جنوب ایران میزان شیوع کشف شده با روش سونوگرافی در مطالعه سوادکوهی و همکاران ۳۲/۸ درصد بوده است [۵]. در یک مطالعه در ۲۰۱۰ میزان استئاتوهپاتیت غیرالکلی در سه منطقه جغرافیایی ایران ۴/۳ درصد پیش‌بینی شده است [۶]. حدود ۳۰ تا ۴۰ درصد از بیماران NASH مبتلا به سیروز تحت دریافت پیوند کبد قرار می‌گیرند و یا از عوارض مربوط به کبد می‌میرند [۷]. بنابراین، تشخیص بیماران مبتلا به NASH از استئاتوز ساده برای هدایت درمان و برای تعیین خطرات بالقوه پیشرفت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. نمونه‌برداری از کبد، روش مرجع و استاندارد است؛ با این حال، یک روش تهاجمی است و ممکن است دارای عوارض باشد. علاوه بر این، نمونه‌برداری از کبد تنها نمونه یک بخش کوچک از کبد است که ممکن است دارای خطای نمونه‌گیری باشد. با توجه به شیوع بالای کبد چرب غیرالکلی در جمعیت و وجود درصد پایین مبتلایان به NASH، بیوپسی کبد ممکن است برای بسیاری از این بیماران مناسب نباشد. بنابراین، به آزمون‌های غیرتهاجمی قابل اعتماد جهت تشخیص یا حذف فیروز

بیماری کبد چرب غیرالکلی یک بیماری مزمن کبدی با طیفی وسیع از استئاتوز ساده و استئاتوهپاتیت غیرالکلی (Nonalcoholic Steatohepatitis; NASH) تا سیروز و هیپاتوسلولار کارسینوما است [۲،۱]. در اکثر موارد بیماری کبد چرب غیرالکلی، یک بیماری خوش‌خیم و غیرپیش‌رونده به صورت استئاتوز ساده است. البته NASH فرم تهاجمی‌تر کبد چرب غیرالکلی است که توسط استئاتوز مشخص، آسیب کبدی، و التهاب لوپولار با یا بدون الگوی فیروز مشخص می‌شود [۴،۳،۱]. میزان فراوانی کبد چرب غیرالکلی بسته به روش مورد استفاده جهت تشخیص در مناطق مختلف جهان متفاوت گزارش شده است.

^۱ کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی-بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان

^۲ استادیار، گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان

* نشانی نویسنده مسئول:

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه بیوشیمی، فلاورجان

تلفن: ۰۹۱۳۱۰۲۲۲۷۸ | دورنویس: ۰۳۱ ۳۷۴۲۰۱۳۴

پست الکترونیک: hnaieri@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۱۶ | تاریخ پذیرش نهایی: ۹۴/۸/۲۰

مناسب غیرتهاجمی برای تشخیص فیروز وسیع و سیروز در بیماران هیپاتیت C باشد [۴]. ارزش APRI کمتر یا مساوی ۰/۳ و یا ۰/۵ در فیروز قابل توجه و سیروز است و مقدار بیشتر یا مساوی ۱/۵ نشان‌دهنده فیروز قابل توجه است. در بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکلی مقدار APRI متناسب با درجه فیروز، تمایل به افزایش نشان می‌دهد که می‌تواند برای تشخیص این بیماری مفید باشد [۱۰،۹]. APRI از فرمول شماره ۲ به‌دست می‌آید:

$$(۲) \text{APRI} = \text{AST (IU/l)} / (\text{upper limit of normal}) / \text{platelet count} (\times 10^9/l) \times 100.$$

۳- شاخص کبد چرب (Fatty liver index score; FLI) یک پیش‌بینی ساده و دقیق از استئاتوز کبدی در جمعیت عمومی است. FLI یک الگوریتم براساس BMI، دور کمر، تری‌گلیسرید و GGT در تشخیص استئاتوز کبدی است. این الگوریتم به‌منظور بررسی توسعه شاخص کبد چرب بوده، مقدار آن بین صفر و ۱۰۰ متفاوت است. $FLI < 30$ رد کبد چرب و $FLI \geq 60$ تایید کبد چرب است [۸] و براساس فرمول شماره ۳ [۱۱،۸]، یا فرمول شماره ۴ قابل محاسبه است [۸]:

$$(۳) \text{FLI} = (e^{0.953 \times \log_e(\text{triglycerides}) + 0.139 \times \text{BMI} + 0.718 \times \log_e(\text{ggT}) + 0.053 \times \text{waist circumference} - 15.745}) / (1 + e^{0.953 \times \log_e(\text{triglycerides}) + 0.139 \times \text{BMI} + 0.718 \times \log_e(\text{ggT}) + 0.053 \times \text{waist circumference} - 15.745}) \times 100$$

Fatty liver index score (13)

$$P = \frac{e^{0.953 \times \log_e(\text{triglycerides (mg/dL)}) + 0.139 \times \text{BMI} + 0.718 \times \log_e(\gamma\text{GT(u/L)}) + 0.053 \times \text{waist (cm)} - 15.745}}{1 + e^{0.953 \times \log_e(\text{triglycerides (mg/dL)}) + 0.139 \times \text{BMI} + 0.718 \times \log_e(\gamma\text{GT (u/L)}) + 0.053 \times \text{waist (cm)} - 15.745}}$$

۴- شاخص استئاتوز کبدی (Hepatic steatosis index; HSI) از فرمول زیر قابل محاسبه است:

$$P = \frac{e^{0.315 \times \text{BMI} + 2.421 \times \text{ALT-to-AST ratio} + 0.630 \times \text{Diabetes Mellitus (yes = 1/no = 0)} - 9.960}}{1 + e^{0.315 \times \text{BMI} + 2.421 \times \text{ALT-to-AST ratio} + 0.630 \times \text{Diabetes Mellitus (yes = 1/no = 0)} - 9.960}}$$

مقادیر HSI کمتر از ۳۰/۰ و یا کمتر از ۳۶/۰، رد کبد چرب غیر-الکلی با حساسیت ۹۳/۱ درصد و یا تشخیص کبد چرب غیرالکلی با ویژگی ۹۲/۴ درصد است [۱۲]. روش دیگر محاسبه شاخص استئاتوز کبدی (فرمول شماره ۵) توسط Lee و همکاران در ۲۰۱۰ رایج شده است [۱۳].

۶- شاخص FIB-4 با استفاده از فرمول شماره ۶ محاسبه می‌شود: $FIB-4 = \text{Age [yr]} \times \text{AST [U/L]} / ((\text{PLT} [10^9/L]) \times (\text{ALT [U/L]})^{1/2})$ مبنای نظری برای این شاخص قبلا توصیف شده است و پای‌بند به

پیشرفته در راستای کاهش نیاز به بیوپسی کبد نیاز می‌باشد [۴]. از روش‌های تشخیصی غیرتهاجمی سیستم‌های نمره‌دهی هستند. نمرات غیرتهاجمی برای پیش‌بینی دقیق استئاتوز کبدی از سوی پزشکان مورد درخواست هستند [۸]. چند سیستم نمره‌دهی براساس شاخص‌های بالینی و آزمایشگاهی ساده برای شناسایی استئاتوز و فیروز پیشرفته در بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکلی (Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) و سایر بیماری‌های کبدی ارائه شده است که نیاز به اعتبارسنجی خارجی دارد [۴]. در این پژوهش به بررسی چند سیستم نمره‌دهی پرداخته شده است: ۱- یکی از جدیدترین نمرات پیش‌بینی که ترکیبی از ALT، پلاکت، سیتوکراتین-۱۸ (CK-18) و تری‌گلیسرید (TG) است، برای پیش‌بینی NASH از طریق رگرسیون لجستیک در بیماران NAFLD ابداع شده و از طریق فرمول شماره ۱ قابل محاسبه است [۱]. نمره پیشگویی جدید این سیستم ۰/۳۶۴ بوده، حساسیت، ویژگی، ارزش پیشگویی مثبت و نازش پیشگویی منفی آن به-ترتیب ۸۹، ۸۶، ۸۹ و ۸۹ درصد است [۱]:

$$(۱) -12.764 + 0.075 \times \text{ALT (IU/L)} + 0.013 \times \text{platelets} (\times 10^9/L) + 0.012 \times \text{CK-18 fragment levels (U/L)} + 0.006 \times \text{TG (mg/dL)}.$$

۲- یکی دیگر از آنها ایندکس آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) نسبت به پلاکت (Aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index; APRI) است. می‌تواند یک جایگزین

مقادیر HSI کمتر از ۳۰/۰ و یا کمتر از ۳۶/۰، رد کبد چرب غیر-الکلی با حساسیت ۹۳/۱ درصد و یا تشخیص کبد چرب غیرالکلی با ویژگی ۹۲/۴ درصد است [۱۲]. روش دیگر محاسبه شاخص استئاتوز کبدی (فرمول شماره ۵) توسط Lee و همکاران در ۲۰۱۰ رایج شده است [۱۳].

۵- نمره BARD از ۳ متغیر تشکیل شده است: نسبت AST/-

۵) $\text{HSI} = 8 \times (\text{ALT/AST ratio}) + \text{BMI} (+2, \text{ if female} + 2, \text{ if diabetes mellitus})$.

و به‌طور نادر با خطر مرگ‌ومیر همراه است [۱۸]. آزمایشات FBS, Chol, TG, HDL, LDL, AST, ALT, ALK, GGT, α -Amylase, Alb با کیت‌های شرکت پارس آزمون در همان روز با دستگاه Biotechnica مدل BT3500 ساخت کشور ایتالیا در یک آزمایشگاه انجام شد. در ابتدا غربالگری از نظر HBS-Ag و HCV antibody انجام شد و سرم بیماران پس از سانتریفوژ جهت بررسی CK-18 در ۳۲- درجه نگهداری شد. گروه شاهد نیز از میان افراد همسان‌سازی شده از نظر سن و جنس با گروه آزمون انتخاب شدند. شرط ورود این افراد به پژوهش، تشخیص کبد سالم توسط سونوگرافی و سطح طبیعی آنزیم‌های کبدی بود. سیتوکراتین ۱۸ فراگمنت-۳۰ با استفاده از روش الایزا، و کیت تجاری M30-apoptosense ELISA kit شرکت PEVIVA از کشور سوئد اندازه‌گیری شد. تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۹ انجام گرفت. تمام متغیرهای کمی به صورت میانگین و خطای استاندارد و متغیرهای کیفی به صورت تعداد و درصد بیان گردیدند. برای مقایسه میانگین متغیرهای کمی از آزمون‌های t و ANOVA استفاده گردید و برای انجام آزمون تعقیبی از Tukey استفاده شد. برای بررسی ارتباط بین متغیرهای کمی از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. سطح معنی‌دار آماری به صورت $P < 0.05$ تعریف گردید.

نتایج

این مطالعه ۵۱ نفر از افراد بزرگسال با میانگین سنی 37.5 ± 10.2 سال مبتلا به NAFLD که ۸ نفر آنها (۱۵/۷ درصد) زن بودند، و ۳۰ نفر از افراد سالم با میانگین سنی 36.5 ± 11.2 سال که ۶ نفر آنها (۲۰/۰ درصد) زن بودند را شامل می‌شد. آزمون مجذور کای نشان داد که توزیع فراوانی جنس بین دو گروه اختلاف معنی‌دار ندارد ($P=0.62$). نمایه توده بدن (BMI) در افراد مبتلا به کبد چرب غیرالکلی به‌طور معنی‌داری ($P=0.002$) بیشتر از افراد سالم بود (جدول شماره ۱). آنالیز رگرسیون لجستیک نشان داد از میان فاکتورهای تن‌سنجی بهترین معیار پیشگویی کننده کبد چرب، دور کمر می‌باشد که نمودی از چاقی شکمی است ($OR: 1.71; 95\% CL 1.23-3.74$). میانگین گلوکز خون ناشتا به‌طور معنی‌داری بالاتر از افراد سالم بود ($P=0.01$)، ولی در هر دو گروه در محدوده طبیعی بود. میانگین تری‌گلیسیرید ($P=0.04$) و نسبت HDL/LDL ($P=0.03$) در گروه کبدچرب به‌طور معنی‌داری بالاتر از افراد سالم بود. میانگین HDL در گروه کبدچرب به‌طور معنی‌داری ($P=0.04$) پایین‌تر از افراد سالم بود. میانگین کلسترول نیز در گروه کبد چرب غیرالکلی

سه منطبق زیر است: ۱) سن مربوط به طول مدت بیماری است و با فیروز شدید همراه است؛ ۲) افزایش در AST بیشتر از ALT است، کلیرانس AST نسبت به ALT با تاخیر بیشتری انجام می‌شود و هرچه فیروز پیشرفته‌تر باشد آسیب به میتوکندری بیشتر است؛ و ۳) ترومبوسیتوپنی که به دلایل زیر اتفاق می‌افتد: الف) با پیشرفت فیروز و بدتر شدن فشارخون پورتال پلاکت‌ها در طحال بزرگ از بین می‌روند؛ و ب) کاهش تولید Thrombopoietin توسط سلول‌های کبدی. نتایج FIB-4 به صورت زیر تفسیر می‌شود: FIB-4 کمتر از $1/45$ عدم وجود سیروز؛ اعداد بین $1/45$ تا $3/25$ نامعین؛ و اعداد بالاتر از $3/25$ نشان‌دهنده سیروز می‌باشد [۱۴]. هدف از این مطالعه مقایسه عملکرد تشخیصی تعدادی از تست‌های غیرتهاجمی ساده در شناسایی کبد چرب غیرالکلی در گروهی از افراد اثبات شده با سونوگرافی است.

مواد و روش‌ها

برای انجام مطالعه مورد-شاهدی حاضر از میان افراد مراجعه‌کننده به بیمارستان شهید صدوقی اصفهان در بازه زمانی بهمن ۱۳۹۲ تا آبان ۱۳۹۳، افراد میانسال زن و مرد دارای اضافه وزن که تظاهر بارزی از بیماری کبدی، سابقه‌ای از هپاتیت B و C، مصرف استروئید، الکل، دیابت، حاملگی، هیپوتیروئیدی، نارسایی کلیوی، فشارخون، بیماری‌های قلبی-عروقی و مصرف دخانیات نداشتند و قبلاً مورد درمان برای کبد چرب قرار نگرفته بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. جهت رعایت موازین اخلاقی افراد در جریان چگونگی انجام کار و دلایل آن به صورت شفاهی قرار گرفتند و در صورت داشتن رضایت کامل برای هر فرد پرسشنامه عمومی و پزشکی شامل سابقه بیماری، مصرف دارو و غیره تکمیل شد. سپس، جهت انجام سونوگرافی کبد و مجاری صفراوی معرفی شدند. از ۵۱ بیمار زن و مرد که سونوگرافی آنها وجود کبد چرب را تایید نمود، نمونه خون با رعایت ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی جهت انجام تست‌های بیوشیمی و شمارش پلاکت گرفته شد. داده‌های تن‌سنجی مانند قد، وزن، اندازه دور کمر، دور مچ، دور باسن اندازه‌گیری شد. BMI با استفاده از فرمول (تقسیم وزن به کیلوگرم بر مجذور قد به مترمربع) و نسبت دور کمر به باسن (WHR) به دست آمد. در مطالعه حاضر برای تشخیص کبد چرب از روش سونوگرافی استفاده شد؛ زیرا اگرچه بیوپسی کبد استاندارد مرجع برای مرحله‌بندی بیماری و استاندارد طلایی برای تشخیص یافت-شناسی کبد در بیماران مبتلا به NAFLD است، دارای محدودیت‌های نیز هست؛ از جمله اینکه گران و تهاجمی است، دارای خطاهای مربوط به نمونه‌برداری بوده و انجام آن با برخی عوارض

معنی داری بیشتر از افراد سالم بود، اما میانگین آلبومین ($P=0/81$)، آلکالن فسفاتاز ($P=0/16$) و آمیلاز ($P=0/07$) بین دو گروه اختلاف معنی داری نداشت. میزان سیتوکراتین ۱۸ به عنوان مارکر آپوپتوز در بیماران کبد چرب، به طور معنی داری بالاتر از افراد سالم بود ($P=0/005$) (جدول شماره ۲).

بالاتر از افراد سالم بود ولی این اختلاف معنی دار نبود ($P=0/29$). میانگین LDL هم تفاوت معنی داری در دو گروه نداشت ($P=0/41$). میانگین آسپاراتات آمینوترانسفراز ($P=0/04$)، آلانین آمینوترانسفراز ($P=0/002$)، AST/ALT ($P<0/001$)، گاما گلو-تامین ترانسفراز ($P<0/001$) در مبتلایان به کبد چرب به طور

جدول شماره ۱- مقایسه میانگین سن، جنس و متغیرهای تن سنجی در دو گروه مطالعه

متغیر	NAFLD	شاهد	P
جنس (مرد/زن)	۸/۴۳	۶/۲۴	۰/۶۲
سن (سال)	۳۷/۵±۱۰/۲	۳۶/۵±۱۱/۲	۰/۶۸
وزن (kg)	۸۵/۹±۱۰/۳	۷۷/۹±۱۲/۳	*۰/۰۰۲
BMI (kg/m ²)	۲۸/۵۳±۲/۸۱	۲۶/۳۶±۳/۱	*۰/۰۰۲
طول قد (سانتی متر)	۱۷۳/۶±۸/۲	۱۷۱/۷±۸/۸	۰/۳۳
دور کمر (سانتی متر)	۱۰۱/۵±۶/۸	۹۵/۲±۷/۴	*<۰/۰۰۱
دور باسن (سانتی متر)	۱۰۹/۲±۵/۲	۱۰۵/۴±۶/۳	*۰/۰۰۴
دور کمر به باسن (WHR)	۱/۰۷±۰/۰۵۷	۱/۱۱±۰/۰۷۹	*۰/۰۰۴

جدول شماره ۲- مقایسه میانگین قند و پروفاایل لیپیدی و آنزیم های کبد در دو گروه مطالعه

متغیر	NAFLD	شاهد	P
FBS (mg/dL)	۹۲/۵±۹/۹	۸۶/۴±۱۰/۳	*۰/۰۱
Total cholesterol (mg/dL)	۱۸۶/۹±۳۱/۷	۱۸۲/۹±۲۵/۹	۰/۲۹
Triglyceride (mg/dL)	۱۵۷/۷±۵۰/۵	۱۳۰/۲±۲۲/۰	*۰/۰۰۴
LDL (mg/dL)	۱۱۰/۳±۲۲/۷	۱۱۲/۰±۲۲/۰	۰/۴۱
HDL (mg/dL)	۴۲/۹±۱۱/۷	۵۱/۵±۲۵/۵	*۰/۰۰۴
HDL/LDL	۰/۳۹۱±۰/۷۷	۰/۵۴±۰/۱۰۷	*۰/۰۰۳
AST (IU/L)	۳۱/۴±۱۵/۵	۲۵/۳±۱۵/۹	*۰/۰۰۴
ALT (IU/L)	۵۲/۴±۴۱/۹	۲۷/۹±۱۲/۱	*۰/۰۰۲
GGT (IU/L)	۴۳/۳±۲۰/۸	۲۱/۱±۱۱/۹	*<۰/۰۰۱
Amylase (IU/L)	۶۲/۷±۲۰/۷	۷۲/۴±۲۶/۷	۰/۰۷
ALK (IU/L)	۲۴۵/۳±۲۰/۲/۴	۲۰۵/۵±۱۱۷/۵	۰/۱۶
Albumin (mg/dL)	۴/۷۲±۰/۳۳	۴/۷۳±۰/۲۸	۰/۸۱
AST/ALT	۰/۶۸±۰/۲۹	۰/۸۸±۰/۴۸	*<۰/۰۰۱
Ck18 (U/L)	۲۴۳/۵±۱۴۰/۴	۱۴۷/۳±۳۳/۶	*۰/۰۰۵

جدول شماره ۳- نتایج نمرات موجود برای پیش بینی تشخیص کبد چرب غیرالکلی

متغیر	گروه A میانگین (انحراف معیار)	گروه B میانگین (انحراف معیار)	گروه C میانگین (انحراف معیار)	P1	P2	P3
FLI (fatty liver index)	(۱۱/۳)۶۸/۳	(۴/۱۸)۶۰/۶	(۳/۸۷)۴۲/۸۹	۰/۱۸	*<۰/۰۰۱	*۰/۰۰۳
HIS (Hepatic steatosis index)	(۱/۲۸)۹۳/۲۷	(۳/۶۸)۸۳/۱۷	(۴/۰۷)۷۲/۸۲	*۰/۳۸۰	*<۰/۰۰۱	*۰/۰۰۳۷
AST×PLT×CK18	(۰/۸۲)۰/۴۲	(۰/۳۰)۰/۵۰	(۰/۲۳)۰/۵۲	*۰/۸۰	*<۰/۱۰۰	*<۰/۰۰۱
FIB4	(۰/۰۷)۰/۷۶	(۰/۰۳)۰/۶۲	(۰/۳۷)۰/۷۳	۰/۱۸	۰/۷۳	۰/۳۰
PARI	(۰/۰۴)۰/۴۷	(۰/۰۲)۰/۲۶	(۰/۰۲)۰/۳۱	*۰/۰۱	*۰/۰۰۴	۰/۳۶۵

P1 (گروه سونو مثبت و آنزیم بالا با گروه فقط سونو مثبت)، P2 (گروه سونو مثبت و آنزیم بالا با گروه نرمال)، P3 (گروه سونو مثبت با گروه نرمال)

همان‌طور که در جدول شماره ۳ نشان داده شده است، بیماران به سه گروه تقسیم شدند: گروه اول: سونوگرافی آنها وجود کبد چرب را نشان داده و همچنین سطح آنزیم کبدی و یا سطح AST و ALT هر دو بالا هستند (گروه A)؛ گروه دوم: سونوگرافی آنها کبد چرب را نشان داده، ولی سطوح آنزیمی طبیعی بود (گروه B)؛ و گروه شاهد: سونوگرافی و سطوح آنزیمی آنها هر دو طبیعی بود (گروه C). در این سه گروه نمرات پیشگویی به تفکیک محاسبه شد. نمره پیشگویی جدید و APRI در این مطالعه تفاوت معنی‌دار بین سه گروه نشان داد. همان‌طور که در جدول شماره ۳ مشاهده می‌کنیم و قابل انتظار است هر دو گروه اول و دوم میزان FLI بیشتر از ۶۰ است و در گروه شاهد به‌طور معنی‌دار کمتر است. در این مطالعه HSI از فرمول دوم محاسبه شد و تفاوت معنی‌دار در مقادیر HSI بین سه گروه مشاهده شد. نمره BARD اکثر افراد مورد مطالعه ۱ بود، زیرا هیچ‌کدام مبتلا به دیابت نبودند و میانگین نسبت AST/ALT آنها کمتر از ۰/۸ بود. همچنین، در این مطالعه میانگین نمرات فیروز ۰/۷۶ بود (عدم وجود فیروز) و تفاوت معنی‌داری بین سه گروه مشاهده نشد (جدول شماره ۳).

بحث

پژوهش حاضر به ارزیابی چند سیستم نمره‌دهی شامل نمره پیشگویی جدید $(AST \times PLT \times CK18)$ ، APRI، شاخص کبد چرب، شاخص استئاتوز کبدی، BARD و FIB4 پرداخته و نشان داد که این سیستم‌ها می‌توانند در تشخیص کبد چرب غیر-الکلی به‌عنوان یک روش غیرتهاجمی سودمند باشند. مطالعات متعددی با پانل‌های مختلف غیرتهاجمی برای پیش‌بینی و یا تشخیص NASH انجام شده است. در مطالعه Coa و همکاران (۲۰۱۳) یک سیستم نمره‌دهی جدید که شامل ALT، پلاکت، قطعات CK-18 و TG بود برای تشخیص NASH در بیماران کبد چرب غیرالکلی به‌کار گرفته شد و دقت تشخیص این مدل بهتر از استفاده از قطعات CK-18، ALT، پلاکت یا TG به‌تنهایی بود. سطح تشخیص سیستم ۰/۳۶۱، حساسیت آن ۸۹ درصد و ویژگی آن ۸۶ درصد بود. بنابراین، این مدل می‌توانست به‌عنوان یک آزمون غیرتهاجمی نوظهور جایگزینی برای بیوپسی کبد در تشخیص NASH در نظر گرفته شود [۱]. این پانل در مطالعه حاضر در هر سه گروه از بیماران ما تفاوت معنی‌داری را نشان داد. FIB-4 عبارت است از ۴ نمره شامل سن، میزان AST، میزان ALT و شمارش پلاکت‌ها که در بزرگسالان مبتلا به NAFLD

به‌عنوان روشی غیرتهاجمی تشخیص فیروز بهتر از سایر روش‌ها بوده است [۱۵]. در یک پژوهش منتشر شده در سال ۲۰۱۲ در کودکان مبتلا به NAFLD تایید شده با بیوپسی، FIB-4 بالاترین دقت تشخیصی را در میان سایر نمرات غیرتهاجمی فیروز کبدی در افتراق فیروز قابل توجه (مرحله ۲ یا بیشتر) از فیروز خفیف نشان داد [۱۶]. ارزیابی FIB-4 در بیماران کبد چرب در ژاپن سطح زیرمنحنی ۰/۸۷ را نشان داد [۱۷]. FIB-4 در بیماران با HCV و شروع درمان با داروهای ضد ویروسی بررسی شده و به‌عنوان یک نشان‌گر غیرتهاجمی مورد استفاده برای تشخیص وجود فیروز کبد در مبتلایان به HCV معتبر است [۱۴، ۱۸]. در مطالعه Shokla و همکاران یک نمره با استفاده از نشان‌گر ساده از جمله GGT، آپو A1، و پلاکت بررسی شد و نشان داد که با عدم وجود فیروز کبد در بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکلی در ارتباط است [۱۹]. HSI ابزاری ساده و کارآمد برای غربالگری NAFLD است و این امکان را فراهم می‌سازد که افراد نیازمند به اصلاح شیوه زندگی و کاندید برای اولتراسونوگرافی با آن مشخص شوند. در مطالعه Lee و همکاران سطح زیر منحنی آن ۰/۸۱۲ بوده است [۱۳]. FLI توسط Bedogni و همکاران به‌عنوان یک تست ساده و دقیق در پیش‌بینی استئاتوز کبدی در جمعیت عمومی معرفی شد و بر اساس یک الگوریتم پیچیده با استفاده از تست‌های ساده و با دقت ۸۴ درصد می‌تواند کبد چرب را پیش‌گویی نماید [۲۰، ۱۱]. در مطالعه McPherson و همکاران APRI، BARD، FIB-4 و ALT/AST در بیماران کبد چرب غیرالکلی مورد بررسی قرار گرفت و سطح زیر منحنی برای BARD برابر ۰/۷۷ و برای APRI برابر ۰/۶۷ به‌دست آمد. همچنین، مطالعه ایشان نشان داد که نسبت FIB-4 و ALT/AST نمرات قابل اعتمادی برای فیروز هستند [۴]. NAFLD یک اپیدمی مهم و چالش‌برانگیز است. روش‌های غیرتهاجمی دقیق جدید که قابل اعتماد و به‌راحتی در دسترس باشد تا حد زیادی به‌منظور تعیین نیاز استراتژی درمان، پاسخ به درمان و پیش‌آگهی مورد نیاز است. روش‌های تشخیص متعددی برای تشخیص FLD وجود دارند که برخی از آنها عبارت‌اند از: تاریخچه بیماری، تجزیه و تحلیل بیوشیمی، تجزیه و تحلیل بافت‌شناسی (بیوپسی کبد) و روش‌های تصویربرداری مثل سونوگرافی، الاستوگرافی گذرا (Transient Elastography; TE)، ام‌آرای و سی‌تی اسکن [۲۱]. با توجه به مراجعه تعداد زیادی از بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکلی که برای ارزیابی به درمانگاه مراجعه می‌نمایند، استفاده از آزمایشات غیرتهاجمی می‌تواند باعث کاهش قابل ملاحظه انجام بیوپسی و

تنه و چربی داخل شکمی، نشان‌دهنده پتانسیل خطر بیشتر ابتلا به کبد چرب غیرالکلی در نوجوانان چاق است، زیرا مشاهده شده است که تری‌گلیسیرید بالا و چربی تنه در نوجوانان چاق مبتلا به کبد چرب غیرالکلی دو برابر بیشتر از همتایان سالم آنهاست [۲۹]. یافته‌های این مطالعات نشان می‌دهد که سیتوکراتین-۱۸ فراگمنت M30 در بیماران با اضافه وزن و نه چاقی مفرط و درجات پایین کبد چرب (گرید I) می‌تواند ابزار مناسبی برای غربال‌گری افراد NAFLD باشد. هم‌چنین، بیان شده است که بین CK-18 با ALT، AST، GGT، ALK رابطه مستقیم و قوی وجود داشته و بین CK-18 و آمیلاز و AST/ALT رابطه معکوس وجود دارد [۳۰]. نتایج نشان می‌دهد که بیماران دارای NASH سطوح بالاتری از قطعه CK-18 دارند که با شدت استئاتوز، بالونی، التهاب لوبولار و مرحله فیروز در بیماران کبد چرب غیرالکلی همبستگی نشان می‌دهد. هم‌چنین، قطعه CK-18 سرم می‌تواند به-عنوان یک نشان‌گر برای پیش‌بینی شدت کبد چرب غیرالکلی عمل نماید، ولی مطالعه Coa و همکاران نشان داد که نشان‌گر آپوپتوز به‌تنهایی نمی‌تواند به اندازه کافی جهت پیش‌بینی NASH دقیق باشد، زیرا آپوپتوز تنها یکی از مکانیسم‌های پیچیده NASH است [۷]. Feldstein و همکاران از اندازه‌گیری سطح قطعه CK-18 در خون، به‌عنوان یک مارکر آپوپتوز سلول‌های کبدی و یک تست قابل اعتماد برای تشخیص NASH در کودکان مشکوک به NAFLD استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان می‌دهد که سطح سیتوکراتین-۱۸ پلاسما به‌مقدار فراوانی در کودکان مبتلا به NASH در مقایسه با استئاتوز کبدی بالاتر است، CK-18 دارای دقت بسیار عالی برای تشخیص NASH در بیوپسی بوده، و سطح CK-18 با ویژگی‌های اصلی بافت‌شناسی از NAS، NASH و مرحله فیروز مرتبط می‌باشد [۲۳]. چند گروه تحقیقاتی دقت و صحت قطعات CK-18 برای پیش‌بینی حضور NASH در افراد بزرگسال را مورد بررسی قرار داده و نتیجه گرفته‌اند که سطح CK-18 به‌عنوان تنها آزمون غیرتهاجمی و امیدوارکننده‌ترین تست برای تشخیص NASH بزرگسالان و برای تشخیص و مدیریت کبد چرب غیرالکلی است [۳۱، ۲۵، ۱۵، ۲]. محدودیت ما در این مطالعه عدم استفاده از بیوپسی کبد به‌عنوان روش استاندارد و در نتیجه عدم توانایی تشخیص بین NAFLD و NASH بود. و تشخیص NAFLD توسط سونوگرافی داده شد. محدودیت دیگر بررسی تعداد کم بیماران به‌علت هزینه‌ها بود.

نتیجه‌گیری

سیستم‌های نمره‌دهی مورد بررسی در مطالعه حاضر

صرفه‌جویی در هزینه‌ها شود. بنابراین، به‌نظر می‌رسد بیوپسی کبد برای تمام بیمارانی که نمره آزمایشات غیرتهاجمی آنها بالاتر از حد Cut off بوده و نیز برای افرادی که در آنها تشخیص قطعی وجود ندارد و یا مشکوک به یک بیماری دیگر همراه هستند، مناسب است [۲۲]. مطالعات اخیر نشان داده که بیماران مبتلا به استئاتوز ساده ممکن است به NASH پیشرفت نمایند [۱]. مطالعات طولی بلندمدت نشان می‌دهد که بیماران NASH مرگ-ومیر بالاتری دارند و در مقایسه با بیماران با استئاتوز ساده به احتمال بیشتر به عوارض مرتبط به کبد مبتلا می‌شود. از آنجاکه هیچ سطحی از ALT برای پیش‌بینی بهینه NASH و فیروز پیشرفته وجود ندارد [۲۴، ۲۳]، تشخیص سریع و دقیق NASH و پیگیری منظم در پیش‌بینی توسعه کبد چرب غیرالکلی ضروری به‌نظر می‌رسد. تجزیه و تحلیل روابط بین نشان‌گرهای زیستی بالینی و کبد چرب غیرالکلی در تعدادی از مطالعات انجام شده است [۲۵]. سونوگرافی یک روش غیرتهاجمی، ارزان و به‌طور گسترده در دسترس، برای تشخیص استئاتوز کبدی با حساسیت مفید از ۹۴-۶۰ درصد و ویژگی از ۹۵-۶۶ درصد است؛ هم‌چنین، منجر به برآورد ذهنی از نفوذ چربی در کبد در یک سیستم نمره‌دهی سه‌نقطه‌ای یا بیشتر (خفیف، متوسط و شدید) می‌شود. این روش دارای محدودیت‌هایی از جمله حساسیت کم برای استئاتوز خفیف، ناتوانی برای افتراق فیروز خفیف از استئاتوز و عدم تعیین دقیق کمیت نفوذ چربی و وابستگی آن به اپراتور و نظر مشاهده‌گر تا ۷۲ درصد و هم‌چنین کاربرد کم برای بیماران چاق و کسانی که بیش از حد گاز در روده دارند، می‌باشد [۲۶، ۲۷]. الاستوگرافی گذرا یک ابزار جدید است که برای مطالعه غیرتهاجمی سفتی کبد طراحی شده، ولی در تشخیص کبد چرب غیرالکلی نتایج متضاد را مستند کرده است. عیب TE این است که در افراد با BMI بالا موارد اشتباه آن زیاد است، زیرا انجام TE در مورد افراد چاق دشوار است؛ چربی زیرجلدی بافت با کاهش نفوذ امواج الاستیک، سبب کاهش میزان موفقیت انجام آن می‌شود [۲۸، ۲۷، ۲۶]. با در نظر گرفتن عملکرد تشخیصی پارامترهای غیرتهاجمی مختلف برای تشخیص فیروز کبد در NAFLD، محققان سعی در تدوین و فرموله کردن مدارک الگوریتم ترتیبی، انتخاب ابزار تشخیصی دارای بهترین عملکرد تشخیصی، و کاهش موارد مثبت و منفی کاذب دارند [۲۷]. در مطالعه حاضر دور کمر و BMI قوی‌ترین پیش‌بینی از کبد چرب را نشان داد (OR=۱/۱۷۱) که این یافته به شدت از این فرضیه که چاقی مسئول اصلی بیماری کبد چرب است، پشتیبانی می‌نماید. این یافته با یافته‌های Bedogni و همکاران مشابهت دارد [۱۸]. بیان شده است که میزان بالاتر چربی

تشکر و قدردانی

با تشکر از دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان و سرکار خانم دکتر رازی و مدیریت و پرسنل آزمایشگاه شهید صدوقی اصفهان که نهایت همکاری با این پروژه را داشتند.

FLI، HIS، APRI، FIB4 و سیستم نمرده‌دهی جدید شامل ALT، PLT، TG و CK18 می‌توانند در پیش‌گویی NAFLD و وجود یا عدم وجود فیبروز حتی در بیماران با مرحله یک و دو کمک‌کننده باشند.

References:

- [1] Cao W, Zhao C, Shen C, Wang Y. Cytokeratin 18, Alanine Aminotransferase, Platelets and Triglycerides Predict the Presence of Nonalcoholic Steatohepatitis. *PloS One* 2013; 8(12): e82092.
- [2] Amirkalali B, Poustchib H, Keyvani H, Khansari MR, Ajdarkosh H, Maadi M, et al. Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Its Predictors in North of Iran. *Iran J Public Health* 2014; 43(9): 1275-83.
- [3] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012; 55(6): 2005-23.
- [4] McPherson S, Stewart SF, Henderson E, Burt AD, Day CP. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2010; 59(9): 1265-9.
- [5] Savadkoohi F, Hosseini Tabatabaei MT, Shahabi Nezhad S. The frequency of fatty liver in sonography of patients without liver diseases background and its correlation with blood cholesterol and triglyceride. *Zahedan Univ Med Sci* 2003; 5(2): 9-15.
- [6] Sohrabpour A, Rezvan H, Amini-Kafiabad S, Dayhim M, Merat S, Pourshams A. Prevalence of Nonalcoholic Steato hepatitis in Iran: A Population based Study. *Middle East J Digestive Dis* 2010; 2(1): 14-9.
- [7] McCullough AJ. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004; 8(3): 521-33.
- [8] Koot GP, van der Baan-Slootweg OH, Bohte A E, Nederveen AJ, van Werven JR, Merkus MP, et al. Accuracy of prediction scores and novel biomarkers for predicting nonalcoholic fatty liver disease in obese children. *Obesity* 2013; 21(3): 583-90.
- [9] Loaeza-del-Castillo A, Paz-Pineda F, Oviedo-Cárdenas E, Sánchez-Avila F, Vargas-Vorácková F. AST to platelet ratio index (APRI) for the noninvasive evaluation of liver fibrosis. *Ann Hepatol* 2008; 7(4): 350-7.
- [10] Yang HR. Noninvasive diagnosis of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J Pediatrics* 2013; 56(2): 45-51.
- [11] Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006; 2: 6-33.
- [12] Francque SM, Verrijken A, Mertens I, Hubens G, Van Marck E, Pelckmans P, et al. Noninvasive assessment of nonalcoholic fatty liver disease in obese or overweight patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10(10): 1162-8.
- [13] Lee JH, Kim D, Kim HJ, Lee CH, Yang JI, Kim W, et al. Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis* 2010; 42(7): 503-8.
- [14] Mascolini M. FIB-4 Predicts Major Liver Complications and Death in HCV+ People Starting ART. *20th International AIDS Conference*, 2014 July 20-25. Melbourne, Australia
- [15] Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ, et al. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7(10): 1104-12
- [16] Yang HR, Kim HR, Kim MJ, Ko JS, Seo JK. Noninvasive parameters and hepatic fibrosis scores in children with nonalcoholic fatty liver. *World J Gastroenterol* 2012; 18(13): 1525-30.
- [17] Sumida Y, Yoneda M, Hyogo H, Itoh Y, Ono M, Fujii H, et al. Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). Validation of the FIB4 index in a Japanese nonalcoholic fatty liver disease population. *BMC Gastroenterol* 2012; 12(1): 2.
- [18] Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, Verkarre V, Nalpas A, Dhalluin-Venier V, et al. FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology* 2007; 46(1): 32-6.
- [19] Shukla A, Kapileswar S, Gogtay N, Joshi A, Dhore P, Shah C, et al. Simple biochemical parameters and a novel score correlate with absence of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Indian J Gastroenterol* 2015; 34(4): 281-5.
- [20] Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 33.
- [21] Razavizade M, Jamali R, Arj A, Talari H. Serum parameters predict the severity of

ultrasonographic findings in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int* 2012; 11(5): 513-20.

[22] Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu Yao C, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: A multicenter validation study. *Hepatology* 2009; 50(4): 1072-8.

[23] Feldstein AE, Alkhoury N, De Vito R, Alisi A, Lopez R, Nobili V. Serum Cytokeratin-18 Fragment Levels Are Useful Biomarkers for Nonalcoholic Steatohepatitis in Children. *Am J Gastroenterol* 2013; 108(9): 1526-31.

[24] Verma S, Jensen D, Hart J, Mohanty SR. Predictive value of ALT level for nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Liver International* 2013; 33(9): 1398-405.

[25] Diab DL, Yerian L, Schauer P, Kashyap SR, Lopez R, Hazen SL, et al. Cytokeratin 18 fragment levels as a noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in bariatric surgery patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6(11): 1249-54.

[26] Jamali R. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Diagnosis and Evaluation of Disease Severity. *Thrita* 2013; 2(4): 43-51.

[27] Festi D, Schiumerini R, Marzi L, Di Biase AR,

Mandolesi D, Montrone L, et al. Review article: the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease—availability and accuracy of non-invasive methods. *Alimentary Pharmacol Therapeutics* 2013; 37(4): 392-400.

[28] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. 2012. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 55(6): 2005-23

[29] Monteiro PA, Mota J, Silveira LS, Cayres SU, Antunes B, Fernandes RA, et al. Morphological and metabolic determinants of nonalcoholic fatty liver disease in obese youth: a pilot study. *BMC Res Notes* 2013; 6(1): 89.

[30] Yilmaz Y. Systematic review: caspase-cleaved fragments of cytokeratin 18—the promises and challenges of a biomarker for chronic liver disease. *Alimentary Pharmacol Therapeutics* 2009; 30(11-12): 1103-09.

[31] Wieckowska A, Feldstein AE. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive. *Seminars in liver disease. Hepatology* 2008; 28(4): 386.