Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında prolidaz enzim aktivitesi ile ultrasonografik evreleme arasındaki ilişki

The relationship between prolidase enzyme activity and ultrasonographic grading in non-alcoholic fatty liver disease

Hakan Buyukhatipoglu[1], İdris Etkar[1], Mehmet Ali Eren[2], Mehmet Demir[1], Abdullah Taskin[3], Nurten Aksoy[3]

[1] Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Şanlıurfa
[2] Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Endokrinoloji Bilim Dalı, Şanlıurfa
[3] Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Şanlıurfa

Yazışma adresi:
Yard. Doç. Dr. Hakan Büyükhatipoğlu, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi , İç Hastalıkları Anabilim Dalı, 63300, Şanlıurfa, buyukhatipoglu@gmail.com

Özet

Amaç: Son zamanlarda yapılan az sayıda çalışmaya göre serum prolidaz enzim aktivitesinin fibrozisin bir göstergesi olabileceği iddia edilmektedir. Dolayısıyla biz bu çalışmada non-alkolik yağlı karaciğer hastalarında prolidaz enzim aktivitesindeki değişiklikleri ve ultrasaonografik evrelendirme ile ilişkilerini araştırmayı hedefledik.

Materyal ve metod: Çalışmaya ultrasonografi ile hepatosteatoz tanısı konmuş 84 erkek, 29 kadın dahil edildi. Bu hastalar ultrasonografik evrelemeye göre üç gruba ayrıldı: 40 hasta evre 1, 40 hasta evre 2, 33 hasta evre 3. Kontrol grubu olarak sağlıklı bireylerden oluşan 30 kişi (evre 0) çalışmaya alındı. Prolidaz enzim aktivitesi her grupta ölçüldü.

Bulgular: Prolidaz enzim aktivitesi grade 1 ve kontrol grubu arasında ve grade 2 ve grade 3 arasında farklılık göstermedi. Ancak grade 2 ve 3 hastalar, grade 1 ve kontroller ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık izlendi.

Sonuç: Serum prolidaz aktivitesi grade arttıkça yükselmektedir. Bu da muhtemelen artmış fibrotik aktiviteye bağlıdır. Klinik ve histopatolojik olarak doğrulanması halinde serum prolidase aktivitesi fibrozisin belirlenmesinde, takibinde ve tedaviye cevapta kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: prolidaz, hepatosteatoz, ultrasonografi, fibrozis

Abstract

Backround: In accordance with a few recent studies prolidase enzyme activity might be an indicator of fibrosis. Therefore, in this study our aim was to research the changes in prolidase enzyme activity and its possible relationships with ulstrasonographic grading in patients with non-alcoholic hepatosteatosis.

Methods: Based on ultrasonographic findings 84 male 29 female patients were diagnosed as hepatosteatosis. These patients were divided into three groups based on ultrasonographic grading: 40 patients as grade 1, 40 patients as grade 2, and 33 patients as grade 3. 30 health volunteers (grade 0) were recruited as control group. Serum prolidase enzyme levels were measured in each group.

Results: No difference were observed between control group and grade 1 patients, and between grade 2 and grade 3 patients. However, as compared to controls prolidase enzyme activity was significantly higher in grade 2 and grade 3 patients.

Conclusions: Serum prolidase activity increases as grade progresses. This probably indicates increased fibrotic activity. Once histopathologically and clinically verified serum prolidase activity might be used to determine the degree of fibrosis, follow-up, and the evaluation of response to treatment.

Keywords: prolidase, hepatosteatosis, ultrasonography, fibrosis

Giriş

Alkol dışı karaciğer yağlanması hastalığı veya diğer adıyla non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (ADKYH=NAYKH) alkol kullanımı öyküsü olmadan karaciğerde yağlanma ile ilgili bulguların varlığına verilen addır (1). Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının (NAYKH) önemi son yıllarda gittikçe artmaktadır. Bu hastalık Ludwig ve arkadaşları tarafından ilk olarak 1980 yılında tanımlanmıştır (1). NAYKH uzun yıllar değişik nedenlerle yapılan karaciğer biyopsilerinin sıklıkla karşılaşılan bir bulgusu olmuş, ancak doğrudan bir hastalık olarak değerlendirilmemiştir (1).

NAYKH oluşmasına sebep olan faktörlerin en başında diyabetes mellitus, obezite, hiperlipidemi ve gelmektedir. Daha az olarak da ilaçlar, by-pass cerrahisi, gebelik, yağ metabolizması hastalıkları ve total parenteral beslenme gibi faktörler sebep olabilmektedir (1, 2).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı basit steatozdan, steatohepatit, fibrozis ve siroza kadar ilerleyen geniş bir spektruma sahiptir. Kriptojenik (idiyopatik) olarak kabul edilen sirozların önemli bir kısmına uzun dönemde hepatosteatozun sebep olduğu anlaşılmıştır (3). Kronik hastalıkta hastalığın seviyesi fibrozisin derecesi ile paralellik gösterir (4). Karaciğer fonksiyonlarını takipte kullanılan biyokimyasal testler hepatosteatozun varlığı ile fibrozis

düzeyinin ortaya konulmasında yetersiz kalmaktadır. Fibrozisin kesin tanısı ve derecesi ancak biyopsi ile kesin olarak saptanabilmektedir (5).

Histolojik inceleme yöntemlerinin uzun süre takibi gereken hastalarda karaciğer iğne biyopsisi ile araştırılması çeşitli güçlükler içermekte ve invaziv bir yöntem olması nedeniyle hasta ve hekim açısından bir risk teşkil etmektedir. Bundan dolayı fibrozis gelişiminin takibinde invaziv olmayan çeşitli testler araştırma konusudur. Bu amaçla günümüze değin birçok çalışmada ekstasellüler matriksi oluşturan yapılar ve fibrozis gelişiminde rol alan mediyatörler araştırılmış ve fibrotik aktivite ile ilişkileri ortaya konmuştur (3-7).

Prolidaz enzimi, kollajen yıkım sonrasında ortaya çıkan imminopeptidlerin parçalanmasından sorumlu bir enzimdir. Kollajen yapım ve yıkım sürecindeki artış prolidaz enzim aktivitesinin artışına neden olmaktadır. Prolidaz enzimi ile karaciğer fibrozisi arasındaki ilişki arasında yeterli bilgiye sahip değiliz. Yapılan az sayıda çalışmada serum prolidaz enzim düzeyi ile fibrotik aktivite arasında ilişki olduğunu gösterilmiştir (8, 9). NAYKH ile prolidaz arasındaki ilişkisi konusunda literatürde sadece bir çalışma bulunmaktadır (10). Ultrasonografik değerlendirme ve NAYKH ilişkisi konusunda çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle biz bu çalışmada hepatosteatozun ultrasonografik olarak evrelendirilmesinin, fibrozisin bir göstergesi olarak, prolidaz enzim aktivitesi ile ilişkisini araştırmayı hedefledik.

Materyal ve metod

Hasta Seçimi

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi genel dâhiliye, endokrinoloji ve gastroenteroloji polikliniklerine 2009–2010 yılları arasında çeşitli şikâyetlerle başvuran ve batın ultrasonografi tetkiklerinde farklı derecelerde yağlı karaciğer hastalığı tespit edilen hastalar ile aynı polikliniklere çeşitli şikâyetlerle başvurup tetkiklerinde karaciğerde yağlanma saptanmamış olan sağlıklı hastalar çalışmaya dâhil edildi. Hastaların ve kontrol gurubunun demografik verileri Tablo 1'de gösterilmiştir. Çalışma dışı bırakılma kriterleri su şekildeydi: Alkol kullanma öyküsü (>20 gr/gün), KOAH, astım, KBY, tiroid hastalıkları, hipertansiyon, gebelik, tütün mamülleri kullanımı, büyüme hormonu eksikliği, cushing hastalığı bulunan hastalar; HBsAg veya anti-HCV pozitifliği olan, otoimmün hepatit, Wilson hastalığı, hemakromatozis veya diğer kronik karaciğer hastalıkları saptanan, asetilsalisilikasit hariç olmak üzere insülin veya oral anti-diyabetik kullanan hastalar ve son üç ayda vücut ağırlığının >%20'sini kaybeden hastalar ile nöropsikiyatrik hastalar çalışma dışında bırakıldı.

Çalışma dizaynı:

Çalışmaya yukarıdaki kriterlere uyan, benzer yaş ve cinsiyet ortalamalarına sahip yaşları 18-65 yaş arasında değişen (ortalama yaş 36,3±8.5) 113 hasta (84 erkek, 29 bayan) ve sağlıklı bireylerden oluşan 30 kişilik kontrol (15E,15K) grubu dahil edildi. Hepatosteatoz tanısı için ultrasonografik değerlendirme esas alındı. Ultrasonografi sonuçlarına göre hastalar evrelere ayrıldı: 40 hasta da (25E, 15K) grade 1 yağlanma, 40 hastada (30E, 10 K) grade 2 yağlanma, 33 hastada (28 E, 5K) grade 3 yağlanma mevcuttu. Hasta ve kontrol gruplarının detaylı fizik muayeneleri yapıldı. Kan basıncı ölçümleri hastalar 15 dakika dinlendikten sonra oturur pozisyonda civalı sfingomanometreyle sol koldan ölçüldü.

Hasta ve kontrol gruplarından 10-12 saatlik açlığı takiben sağ antekubital venden kan akımını bozmayarak 20 cc kan alındı bunun 10cc'si hızlı bir şekilde aşağıda belirtilen biyokimyasal parametreler çalışıldı. Kalan 10 cc ise 3000 devirde 5 dakikada santrifüj edilerek ileride çalışılmak üzere -80 C'de muhafaza edildi. Alınan kan örneklerinden plazma glukoz, insülin, AST, ALT, ALP, GGT, üre, total bilurubin, total kolesterol, HDL, LDL, VLDL, trigliserit, total kolesterol düzeyleri, TSH, serum demiri, ferritin, total protein, albumin, PT (INR), HBsAg, ve anti HCV ölçümleri yapıldı. Uygun hastalara hepatobiliyer ultrasonografi yapıldı.Ayrıca hasta ve kontrol gruplarında biyokimyasal parametreler ile birlikte serum prolidaz enzim aktivitesi çalışıldı.

NAYKH tanısı

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı tanısı hepatobiliyer ultrasonografisinde değişik derecelerde karaciğer yağlanması tespit edilen hastalar içinden 20 g /gün'den fazla alkol kullanan, hepatit B ve C'ye ait viral göstergeleri müspet olan, otoimmün hepatitle uyumlu oto antikorları müspet olan veya metabolik karaciğer hastalığı ile ilgili diğer serum göstergeleri müspet olan hastaların dışlanması yoluyla konuldu.

Hepatobiliyer Ultrasonografi

Hastaların hepatobiliyer ultrasonografisi Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Egitim ve Araştırma Hastanesi Radyoloji Kliniği'nde aynı radyolog tarafından yapılmış olup, yağlanma tespitinde aşağıdaki kriterler esas alınmıştır:

1. Hafif yağlanma (grade 1): Hepatik ekojenitede minimal diffüz artış; intrahepatik damarların kenarları ve diyafragma normalde olduğu gibi görülebiliyor.
2. Orta derecede yağlanma (grade 2): Hepatik ekojenitede orta düzeyde artış; intrahepatik damarların kenarları ve diyafragma çok iyi görülemiyor.
3. Şiddetli yağlanma (grade 3): Ekojenitede belirgin artış, karaciğer sağ lobunun posterior segmentine sesin penetre olamaması veya hepatik damarların, diyafragmanın görülememesi.

Çalışmada ultrasonografide yağlanması olmayan hastalar grade 0 yağlanma şeklinde nitelenmişlerdir

Prolidaz ölçümü

Serum 40-kat 2,5 mmol/L Mn2+ ve 40 mmol/L trizma HCL tamponu ile dilue edilip 37°C'de 2 saat preinkübe edildi. Sonra bu karışımın 1 ml'si 30 mmol/l gly-pro, 40 mmol/l trizma HCL tamponu (pH: 8.0), ve 100 µl preinkübasyon serumunu içeren karışımla 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Prolin ölçümü için Chinard's metodunun bir modifikasyonu olan Myara ve ark. tarafından önerilen method ile bu

süpernatant kullanılarak ölçüldü (11).

Diğer ölçümler

Plazma glukoz, insülin, AST, ALT, ALP, GGT, üre, total bilurubin, total kolesterol, HDL, LDL, VLDL, trigliserit, total kolesterol düzeyleri, TSH, serum demiri, ferritin, total protein, albumin, PT (INR), HBsAg, ve anti HCV ölçümleri ticari olarak mevcut olan kitler (Abbott, Illinois, ABD) ile otoanalizör (Aeroset, Almanya) ile ölçüldü.

İstatistik

Tüm istatistiksel analizler ve tanımlayıcı analizler SPSS 11.0 programı kullanılarak yapıldı. P<0,05 anlamlı olarak kabul edildi. Gruplar arası farkı değerlendirmek için Student's t-testi ve tek yölü ANOVA testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişkileri değerlendirmek için ise Pearson's korelasyon analizi kullanıldı.

Bulgular

Çalışmaya dahil edilme kriterlerine uyan hastaların yaş ortalaması (36,3±8,5) olup hastaların %78'inde (84 erkek, 29 bayan) ultrasonografik olarak değişik derecelerde (Grade1, 2, ve 3) hepatosteatoz tespit edildi. Kadınlarda hepatosteatoz oranı %65, erkeklerde % 84 olarak bulundu. Hastaların 21'inde (%14.9) karaciğer enzimleri (AST, ALT) yükselmiş bulundu. Bu hastaların 19'unda ultrasonorafi ile karaciğerde yağlanma bulguları tespit edildi. Diğer olgularda ise USG bulguları normal sınırlarda değerlendirildi. Hepatosteatozu olan hastalar (grade 1, 2, ve 3) kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında arteryel kan basıncı ortalamalarının hepatosteatozu olan hasta grubunda daha yüksek olduğu ve bu farkın yağlanmanın derecesi arttıkça arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p<0,001) (Tablo 1).

Hepatobliyer ultrasonografide grade 2 ve 3 yağlanması olan olguların ALT değerleri, grade 1 yağlanması olan ve yağlanması olamayan grade 0 olgulara göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0,01). Prolidaz enzim aktivitesi ile kontrol grubu ve grade 1 arasında, ve grade 2 ve 3 arasında anlamlı fark görülmedi. Ancak prolidaz enzim aktivitesi açısından grade 2 ve 3, grade 1 ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grade 2 ve 3'te prolidaz enzim aktivitesi anlamlı olarak artmış bulundu (tablo1, resim 1).

Tartışma

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı günümüzde önemli bir sağlık problemi olarak önemi gittikçe artmaktadır. Önceleri benin bir rahatsızlık olarak düşünülürken şimdilerde metabolik sendrom, diyabet, insülin direnci gibi pek çok rahatsızlıkla ilişkili olduğu görülmektedir. Hatta daha önceleri idiyopatik (kriptojenik) siroz adı altında sınıflandırılan karaciğer sirozlanın birçoğunun nedeninin NAYKH olduğu ortaya çıkmıştır (3–5).

Nitekim bizim çalışmamızda da glukoz, trigliserid ve kolesterol parametreleri gradeler attıkça artmaktadır. Bunun yanı sıra sistolik ve diastolik kan basıncı düzeyleri de grade arttıkça artmaktadır. Dolayısıyla NAYKH metabolik parameterlerde progresif bir artışa ve bozulmaya sebebiyet vermektedir. Bundan dolayı hastalık süresi arttıkça diyabet ve diğer metabolik hastalıkların insidansında artmaya yol açacağı aşikardır.

NAYKH'daki prognoz açısından en önemli nokta histolojik progresyondur. Histolojik progresyon karaciğer fibrozisine ve neticede karaciğer sirozuna sebebiyet vermektedir. Dolayısıyla bu durumu saptamada en değerli yöntem karaciğer biyopsisidir. Ancak invaziv bir yöntem olması nedeniyle uygulanması hem hasta hem de hekim açısından pratik değildir. Daha önemlisi karaciğer biyopsisi mevcut durumu tespit etmenin dışında (viral hepatitlerdeki kullanımının tersine) tedavi açısından bir yönlendirme yapmamaktadır (10, 12).

Diğer taraftan karaciğer enzimlerinden özellikle ALT yükseklikleri karaciğer hasarını göstermektedir. Ancak Jepsen ve ark. yaptıkları bir çalışmada ALT düzeyleri normal olsa bile NAYKH olgularında ileri derecede karaciğer fibrozisi olabileceğini göstermişlerdir (13). Yine Mofrad ve ark. ALT düzeyi normal olguların %25'inde ileri derecede fibrozis olduğunu göstermişlerdir (14). Bunların yanı sıra ALT düzeyleri ile karaciğer hasarı arasında kuvvetli korelasyon bulunmamaktadır (10, 14). Bu nedenlerle ALT'den daha spesifik ve invaziv olmayan bir yönteme ihtiyaç olduğu aşikardır.

Prolidaz enzimi kollajen döngüsünde prolinin hidroksiproline dönüşümünde önemli bir ekzopeptidazdır ve kollajen yıkımının son basamağında hız sınırlayıcı basamak olarak rol alır. Daha önceki az sayıda çalışmada prolidaz enziminin karaciğer fibrozisinin belirlenmesinde önemli bir ölçüt olabileceği vurgulanmıştır (8–10).

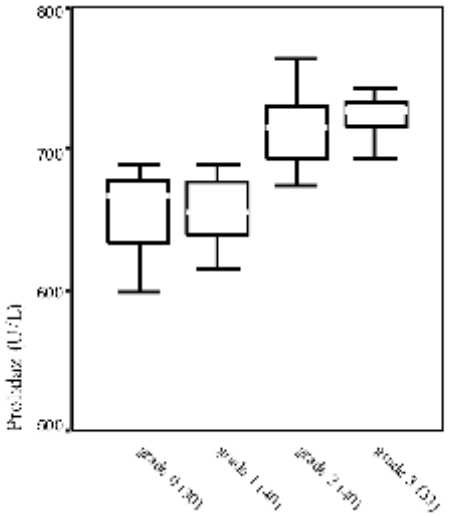
Bizim çalışmamızın diğerlerinden farkı bu çalışmada invaziv olmayan yöntemler kullanmış olmamızdır, yani hepatobiliyer ultrasonografi. Gradeler arttıkça prolidaz enzim aktivitesinin de artıyor olması muhtemel karaciğer harabiyetinin ve fibrozisin bir göstergesi olduğunu düşünüyoruz. Nitekim hafif dereceli hepaosteatozu olan olgularda prolidaz enzim aktivitesi normal olarak bulduk. Grade'ler attıkça prolidaz enzim düzeyi de belirgin olarak artmaktadır. Bu bulgunun fibrozis değerlendirilmesinde önemli olduğunu düşünüyoruz.

Bu çalışmadaki en önemli imitasyon histolojik değerlendirme ölçütümüzün bulunmaması idi. Ultrasonografi önemli bir değerlendirme aracı olmasına rağmen altın standart karaciğer biyopsisidir. Ancak etik nedenler ile hepatosteatozlu hastalara fibrozisin değerlendirilmesi amacıyla biyopsi yapılmadı.

Sonuç olarak bizim çalışmamızda hepatosteatozun metabolik parametrelerde bozulmalara yol açtığı görülmektedir. Diğer taraftan ulstrasonografi gradeleri arttıkça prolidaz enzim düzeyi belirgin olarak artmaktadır, dolayısıyla artmış prolidaz enzim düzeyleri karaciğer hasarının ve fibrozisinin değerlendirilmesinde kullanılabilir. Ancak bu konu için histolojik analizleri de içeren geniş kapsamlı birçok çalışmaya ihtiyaç olduğu açıktır.

Tablo 1. Grupların demografik özellikleri ve prolidaz enzim düzeyleri

	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	p
Cinsiyet (E/K)	15/15	25/15	31/9	28/5	0,006
Yaş (Yıl)	30,4±6,7	34,2±7,2	36,75±5,97	38,2±12,4	0,002
Kilo (Kg)	64,4±7,7	78,7±11,3	87,40±9,42	99,2±15,8	<0,001
Boy (cm)	166,7±6,9	169,93±7,6	169,35±7,60	171,8±9,0	0,077
BMI (Kg/m2)	23,1±2,2	27,2±3,4	30,51±3,10	33,6±4,9	<0,001
Sistolik kan basıncı	113,3	117,3	121,87	125,6	<0,001
Diastolik kan basıncı	113,3	117,3	121,87	125,6	<0,001
Prolidaz (U/L)	656,1±25,5	655,7±22,1	712,8±24,6	719,5±22,0	<0,001
AST(mg/dl)	21,0±4,27	23,5±11,2	27,7±14,1	25,5±7,1	0,052
ALT (mg/dl)	22,3±11,0	29,2±12,3	40,9±12,5	43,0±10,9	0,008
Total Bilirübin	0,45±0,19	0,53±0,22	0,63±0,31	0,61±0,23	0,015
Trigliserit (mg/dl)	145,5±62,2	155,6±82,7	210,2±123,7	224,3±126,2	0,003
HDL Kolestrol (mg/dl)	40,70±6,42	37,9±8,8	37,90±9,6	33,8±10,4	0,030
LDL Kolestrol (mg/dl)	100,3±23,1	115,8±28,7	132,8±44,0	130,6±45,5	0,001
İnsülin (uIU/mL)	8,71±2,68	15,8±5,27	22,2±5,4	26,16±6,5	<0,001
Total Kolesterol (mg/dl)	170,1±24,5	184,9±34,1	212,8±49,2	209,3±47,7	<0,001
TSH (uIU/mL)	1,89±0,92	1,73±0,50	1,5±0,5	1,85±0,47	0,086
Glukoz (mg/dl)	87,6±8,8	90,5±8,7	91,3±11,8	97,33±6,3	0,001



Resim 1. Serum prolidaz aktivitesinin grade'lere göre dağılımı

Yazarlarla ilgili bildirilmesi gereken konular (Conflict of interest statement) : Yok (None)

Referanslar

1) Ludwig J,Viggiano TR, McGiLL DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis:.Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease.Mayo Cin Proc 1980;55:434-438.
2) Angulo P.Keach JC.Batts KP et al. Independent predictors of liver fibrozis in patient with nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 1999;30:1356-62.
3) Lonardo A, Bellini M, Tondelli E, et al. Nonalcoholic steatohepatitis and the "bright liver syndrome": should a recently expanded clinical entity be futher expanded? Am J Gastroenterol 1995;90:2072-4.
4) Demir K. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı: Etyoloji ve patogenez. Çapa Gastroenteroloji Günleri. Beşışık F, ed. İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2004: 90-94.
5) Tözün N. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Çapa Gastroenteroloji Günleri. Kaymakoğlu S, ed. Arset Matbaacılık, İstanbul, 2003: 241-246.
6) Ratziu V, Giral P, Munteanu M, et al. Screening for liver disease using non-invasive biomarkers (FibroTest, SteatoTest and NashTest) in patients with hyperlipidaemia. Aliment Pharmacol Ther 2007;25:207–218.
7) Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: A prospective study. Lancet 2001;357:1069–1075.
8) Brosset B, Myara I, Fabre M, Lemonnier A. Plasma prolidase and prolinase activity in alcoholic liver disease. Clin Chim Acta 1988;175:291–295.
9) Abraham P, Wilfred G, Ramakrishna B. Plasma prolidase may be an index of liver fibrosis in the rat. Clin Chim Acta 2000;295:199–202.
10) Horoz M, Aslan M, Bolukbas FF, et al. Serum prolidase enzyme activity and its relation to histopathological findings in patients with non-alcoholic steatohepatitis.J Clin Lab Anal 2010;24:207-11.
11) Myara I, Charpentier C, Lemonnier A. Optimal conditions for prolidase assay by praline colorimetric determination: Application to iminodipeptiduria. Clin Chim Acta 1982;125:193–205.
12) James CH, Lindor KD. Outcome of patients admitted with complications after outpatient liver biopsies. Ann Intern Med 1993;118:96–98.
13) Jepsen P, Vilstrup H, Mellemkjaer L, et al. Prognosis of patietns with a disgnosis of fatty liver- a registry based cohort study. Hepatogastroenterology 2003;50:2101-4.
14) Mofrad P, Contos MJ, Haque et al. Clinical and histological spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. Hepatology 2003; 37:1286-1292.