Элэгний фиброз үүсэхэд холбогч эдийн ургалтыг дэмжигч PIIINP биомаркерыг тодорхойлсон дүн

Б.Сувдаа[1,7], А.Хас[2], Г.Улзмаа[2], Н.Өлзий-орших[3], Д.Бадамсүрэн[4], Б.Алтанцэцэг[1], Ц.Бат-эрдэнэ[5], Р.Анармаа[5], Ө.Элбэрэлт[7], О.Эрдэнэзаяа[6,7]

[1]АШУҮИС, Био-Анагаахын Сургууль, Гистологийн тэнхим
[2]УГТЭ-ийн Хоол боловсруулах эмгэг судлалын тасаг
[3] УНТЭ, эмнэлзүйн эмгэг судлалын лаборатор
[4]Интермэд эмнэлэг
[5]Натул эмнэлэг
[6]АШУҮИС, Анатомийн тэнхим
[7]АШУҮИС, Био-Анагаахын Сургууль, Био-Анагаахын хүрээлэн
Цахим шуудан: suvdaa@mnums.edu.mn, Утас: 99070549

Түлхүүр үг:

III төрлийн проколлагены N-терминал пропептид
Элэгний хатуурал
Сорвижилт
Инвазив бус маркер
Эдийн сорьц-биопси

Товч утга:

Үндэслэл: Элэгний фиброзын үүсэлт нь элэгний одлог эсүүд (HSCs)-д эсийн гаднах матрицийн (ECM) илүүдэл үүссэнээс үүдэлтэй гэж үздэг. Холбогч эдийн гол бүрэлдэхүүн нь III төрлийн коллаген юм. Шархны эдгэрэлт, элэгний фиброз үүсэхэд холбогч эдийн ширхгийн олшрол гол үүрэг гүйцэтгэдэг. III төрлийн коллагены нийлэгжилтийн үед III төрлийн проколлагены N-терминал пропептид (PIIINP) үүсдэг. PIIINP-ийг элэгний фиброз, элэгний хатуурлын маркер болгон хэрэглэж болох талаар эрдэмтэд дурьдсан байдаг. Тиймээс PIIINP-ын хэмжээ нь коллагены нийлэгжилт, эсийн гаднах орон зайд (матрикс) хуримтлагдах шууд үзүүлэлт болдог байна. Disse-ийн орон зайд ECM хуримтлагдах нь элэгний гэмтэлд хүргэх гол нөхцөл болдог. **Зорилго:** Элэгний эсийн гэмтлийн шууд биомаркер PIIINP-ыг тодорхойлж, элэгний эдэд үүсэх холбогч эдийн ургалт сорвижилтыг бичил бүтцийн өөрчлөлтөөр тодорхойлж харьцуулах. **Арга, аргачлал:** Бид судалгаагаа эмнэлэгт суурилсан нэг агшингийн судалгааны загвараар хийж гүйцэтгэсэн. Эрүүл мэндийн яамны Анагаах ухааны ёс зүйн хяналтын хорооны тогтоол (23/001)-ийг үндэслэн хийж гүйцэтгэсэн. Судалгаанд УГТЭ-ийн элэгний төвөөр 2023 оны 2 дугаар сараас -2024 оны 7 дугаар сар хүртэлх хугацаанд хэвтэн эмчлүүлэгсдээс судалгааны шалгуур хангасан 42 үйлчлүүлэгчдийг хамруулсан. Судалгаанд оролцсон эмчлүүлэгчдийн элэгний эдээс хатгалтын аргаар сорьц авч эдийн шинжилгээ хийсэн. Харин цусны ийлдсэнд PIIINP-ийг тодорхойлохдоо ELISA цомог ашигласан. Элэгний эдэд үүсэж буй холбогч эдийн олшролын зэргийг Метаврын (F0-F4) ангиллын дагуу үнэлсэн. Судалгааны үр дүнгийн статистик боловсруулалтыг STATA-14 программыг ашиглан бүлэг хоорондын харьцуулалт болон дунджуудын ялгаатай байдлыг ANOVA тест бодож, $p<0.05$ үед статистик ач холбогдолтойд тооцов. **Үр дүн:** Судалгаанд хамрагдсан эмчлүүлэгчдийн 31 (73.8%) нь эмэгтэй, 11 (26.2%) эрэгтэй байв. Метаврын ангиллаар элэгний эдэд үүссэн холбогч эдийн ургалтыг F0-1, F2-3, F4 гэж 3 бүлэг болгосон. Гистологийн шинжилгээгээр элэгний эдэд үүссэн холбогч эдийн ургалтыг Трихром Массоны будгаар будаж Метаврын ангилалтай харьцуулан судлав. Бид бүлэг хоорондох PIIINP-ийн илрэлийн ялгаатай эсэхийг тодорхойлоход ($p=0.017$) статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай байв. Холбогч эдийн ургалтын илрэл F0-1 болон F2-3 бүлгийн хооронд ялгаа ажиглагдав ($p=0.05$). PIIINP-ийн босго утга $\geq$ 15.15нг/мл байх үед мэдрэг чанар 71.4%, өвөрмөц чанар 74.3% байна. **Дүгнэлт:** Бидний судалгаанд хамрагдсан үйлчлүүлэгчдийн цусны сийвэндэх PIIINP маркерын илрэлийг гистологийн шинжилгээгээр баталгаажуулахад элэгний эдэд үүсэх холбогч эдийн ургалтанд шууд дэмжих нөлөөлөл үзүүлдэг болох нь тодорхойлогдов.

Үндэслэл: Элэг хордуулах бодис, гэмтээгч вирүс, архи, бодисын солилцооны дутуу задралын бүтээгдэхүүн, цөсний хүчлүүд зэрэг нь элэгний хепатоцит эсийг гэмтээдэг. Гэмтсэн элэгний хепатоцит эс өөрөөсөө хэт ислийн бодис болон фиброз үүсгэгч медиаторуудыг ялгаруулан үрэвслийн эсээр дамжуулан цусны цагаан эсийн нүүн шилжилтийг сэдээдэг байна. Апоптозод орсон хепатоцит эс нь элэгний миофибробласт эсийн фиброз үүсгэх үйлдлийг нөхцөлдүүлдэг. Үрэвслийн үе дэх лимфоцит, полиморфонуклеар эс нь элэгний одлог эсээс коллаген ялгаралтыг идэвхжүүлнэ. Судлаачид элэгний фиброз буюу холбогч эдийн түрэг ургалт нь эсийн матриксын илүүдэл нийлэгжилт юм.Элэгний фиброзын үүсэлт нь элэгний одлог эсүүд (HSCs)-д эсийн гаднах матрицийн (ECM) илүүдэл үүссэнээс үүдэлтэй гэж үздэг[1-3]. III төрлийн коллаген нь холбогч эдийн гол бүрэлдэхүүн хэсэг юм. Түүний харьцангуй концентраци нь шархны эдгэрэлт, элэгний фиброз үүсэхэд холбогч эдийн ширхэгийн олшролын хариу урвал эхний үе шатанд өндөр байдаг ч фиброзын сүүлийн шатанд хэмжээ нь ихээр нэмэгддэг байна. III төрлийн коллагены нийлэгжилтийн үед III төрлийн проколлагены N-терминал пропептид (PIIINP) үүснэ. PIIINP-ийг элэгний фиброз, элэгний хатуурлын шинж тэмдэг болгон хэрэглэж болох талаар эрдэмтэд дурьдсан байдаг. Ихэнхдээ элгэнд III төрлийн коллаген голчлон үүсдэг байна[4,5]. Тиймээс PIIINP-ын хэмжээ нь коллагены нийлэгжилт, эсийн гаднах орон зайд (матрикс) хуримтлагдах шууд үзүүлэлт болдог байна[6]. Disse-ийн орон зайд ECM хуримтлагдсан хэсгүүд (ойролцоогоор зургаа дахин их) нэмэгдэх нь элэгний гэмтэлд хүргэх нөхцөл болдог[7,8]. ECM-ийн ихэнх хэсгийг коллаген бүрдүүлдэг байна[9]. Элэгний эдийн сорьц (биопси) нь элэгний өвчнийг илрүүлэх «Алтан стандарт» гэж дэлхий нийтээр хүлээн зөвшөөрдөг боловч эдэд гэмтэл үүсгэдэг, хүндрэл гарах эрсдэлтэй төдийгүй элэгний хатуурлыг оношлох, дээж авахад алдаа гарах магадлал өндөр шинжилгээ болохыг цөөнгүй судлаачид дурьдсан байна[10,11]. Түүнчлэн инвазив бус лабораторийн шинжилгээгээр элэгний фиброз, элэгний хатуурлыг оношлох нь ач холбогдол өндөртэй юм. Иймд бид элэгний эсийн гэмтлийн шууд биомаркер PIIINP-ыг тодорхойлж, элэгний эдэд үүсэх холбогч эдийн ургалт сорвижилтыг бичил бүтцийн өөрчлөлтөөр тодорхойлж харьцуулан үнэлэв.

Зорилго: Элэгний эсийн гэмтлийн шууд биомаркер PIIINP-ыг тодорхойлж, элэгний эдэд үүсэх холбогч эдийн ургалт сорвижилтыг бичил бүтцийн өөрчлөлтөөр тодорхойлж харьцуулах

Арга, аргачлал: Бид судалгаагаа эмнэлэгт суурилсан нэг агшингийн судалгааны загвараар хийж гүйцэтгэсэн. Эрүүл мэндийн яамны Анагаах ухааны ёс зүйн хяналтын хорооны тогтоол (23/001)-ийг үндэслэсэн судалгааг явуулсан. Судалгаанд УГТЭ-ийн элэгний төвөөр 2023 оны 2 дугаар сараас -2024 оны 7 сар хүртэл хэвтэн эмчлүүлэгчдээс судалгаанд шалгуур хангасан 42 эмчлүүлэгчдийг хамруулсан. Эмчлүүлэгчдээс элэгний сорьцын шинжилгээг авах хатгалтыг нэг удаагийн ариун зүү ашиглан дээж авч 10% буфер формалины уусмалд бэхжүүлж, гистологийн шинжилгээний дэс дараалсан дамжилгаар бэлтгэж 5 мкм зузаантай зүсэж, гематоксилин эозин, гистохимийн будаг Трихром Массоноор будаж, Olympus BX41 гэрлийн микроскопийг ашиглан гистопатологийн шинжилгээ хийсэн. Судалгаанд оролцогчдоос цус авч, сийвэнг ялган -80 хэмд хөлдөөн хадгалсан. Сийвэнгийн биомаркер PIIINP-ийг ELISA цомог ашиглан үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу тодорхойлсон.

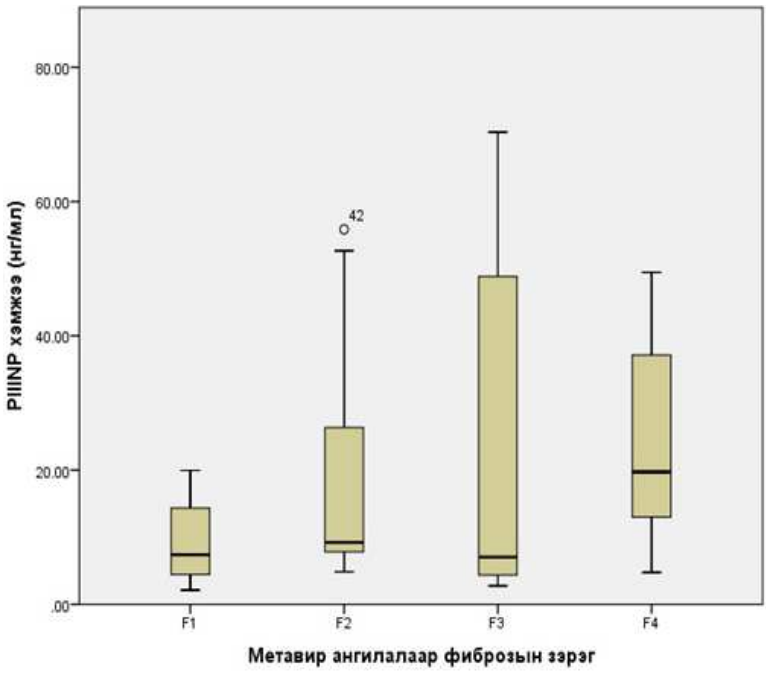
Судалгааны үр дүнгийн статистик боловсруулалтыг STATA-14 программыг ашиглан бүлэг хоорондын харьцуулалтыг ANOVA тест бодож $p<0.05$ үед статистик ач холбогдолтойд тооцов.

Үр дүн: Судалгаанд хамрагдсан эмчлүүлэгчдийн 31 (73.8%) нь эмэгтэй, 11 (26.2%) эрэгтэй байв. Элэгний эдэд үүсэж буй холбогч эдийн олшролын зэргийг Метаврийн (F0-F4) ангиллын дагуу холбогч эдийн ургалтын зэргийг 4 бүлэг болгон ангилан үзэв (Хүснэгт 1).

Хүснэгт 1. Элэгний хатуурлын зэрэг болон PIIINP-ийн дундаж хэмжээг тодорхойлсон дүн

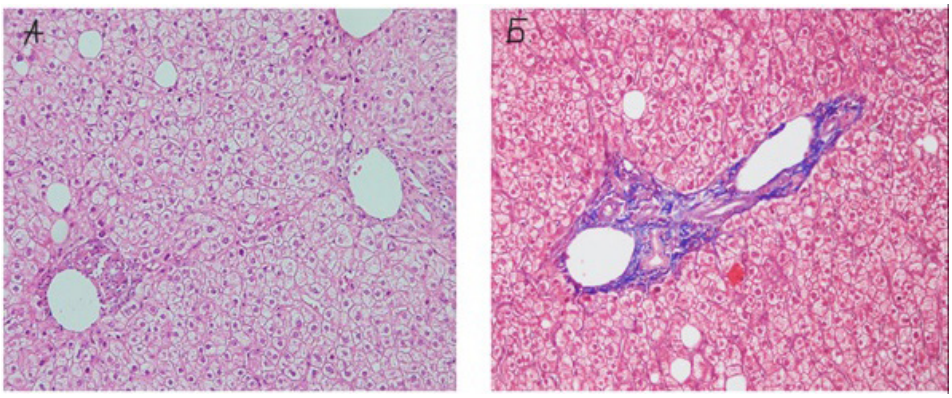
Фиброзын зэрэг	Тоо (n)	Дундаж	Стандарт хазайлт	Стандарт алдаа	95% дундаж утгын итгэлцэлийн интервал	
					Доод хязгаар	Дээд хязгаар
F1	14	8.6748	5.78218	1.54535	5.3363	12.0133
F2	15	19.3091	17.22419	4.44727	9.7707	28.8476
F3	6	23.3888	28.90649	11.80102	-6.9467	53.7243
F4	7	24.8830	16.62121	6.28223	9.5109	40.2551
Нийт	**42**	**17.2761**	**17.21497**	**2.65633**	**11.9116**	**22.6407**

Судалгаанд нийт 42 үйлчлүүлэгч хамрагдсан бөгөөд эдгээрийг Метаврийн ангиллаар ангилахад фиброзын илрэл F2 зэрэгтэй нийт 15 (35.7%) хүн буюу хамгийн олон тодорхойлогдсон (Зураг 1)



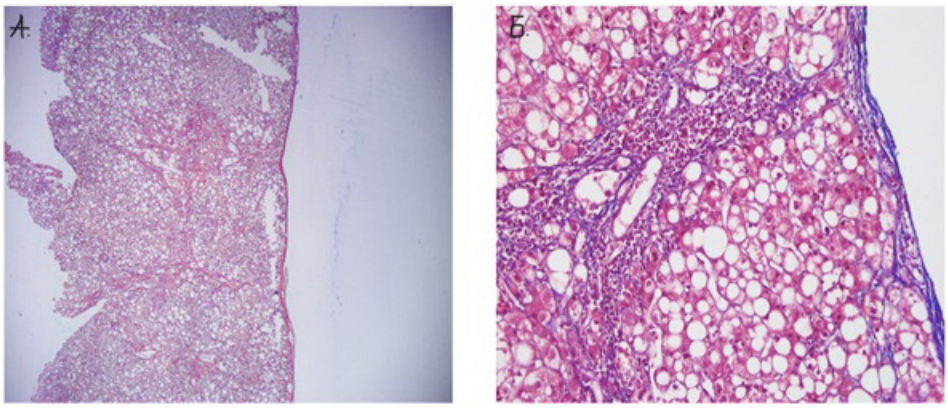
Зураг 1. Элэгний эдэд үүссэн холбогч эдийн ургалтыг Метавир ангилал болон PIIINP маркерийн илрэлийн харьцуулалт.
Элэгний фиброзын зэрэг PIIINP-ийн илрэлийн хооронд эерэг хамааралтай байна (p=0.033).

Судалгаанд хамрагдсан эмчлүүлэгчдийн элэгний эдийн шинжилгээг гистологийн аргаар судалж Метаврын ангилалаар ангилж үзэхэд F1 зэрэг 14 тохиолдол буюу 33.3%, F2 зэрэг 15 тохиолдол буюу 35.7%, F3 зэрэг 6 тохиолдол буюу 14.2%, F4 зэрэг 7 буюу 16.8% оношлогдсон. Бид элэгний эдэд олширч буй гурвалыг тойрсон холбогч эдийн ширхэгийг гистохимийн арга болох Трихром Массоны будгаар будаж баталгаажуулсан (Зураг 2).



Зураг 2. Элэгний эдэд фиброз үүссэн өөрчлөлт Метавр ангилал F2.
А. Гурвал тойрсон холбогч эдийн ургалт, хажуугийн хэлтэр лүү таславч үүсгэсэн байдал, Будаг: Гематокилин эозин, Өсгөлт х 20. Б. Гурвал тойрсон холбогч эдийн ширхгийн олшрол, Будаг: Трихром Массон, Өсгөлт х 20.

Бичил бүтцийн шинжилгээнд элэгний эсийн сийвэнд том жижиг өөхөн дуслууд ихээр хуримтлагдсан. Зарим элэгний эсүүд хоёрлож бөөм сийвэнгийн харьцаа алдагдсан. Элэгний гурвалыг тойрсон үрэвслийн эсийн нэвчдэс, холбогч эдийн ширхэгүүд түрж урган хоорондоо нийлсэн зураглалтай. Гурвал тойрсон өргөн холбогч эдийн ширхэгийн олшрол Трихром Массоны будагдалтаар хөх өнгөөр тод будагдаж байлаа (Зураг 3).



Зураг 3. Элэг өөхжиж, фиброз үүссэн өөрчлөлт Метавр ангилал F3.
А. Холбогч эдийн ширхэгийн олшрол хэд хэдэн таславч үүсгэж гурвал, болон хэлтэр хоорондын таславч холбогдсон байдал, будаг- Гематокпсилийн эозин, өсгөлт х 10. Б. Элэгний эсэд өөхөн дуслууд хуримтлагдсан, гурвалыг тойрсон холбогч эдийн ширхэг, үрэвсийн эсийн нэвчдэст өөрчлөлт, будаг: Трихром Массон, өсгөлт х 20.

Бичил зураглалд элэгний эдэд түгэмэл өөхөн эдийн хувирал үүссэн. Гурвал тойрсон холбогч эдийн ургалт салбарлан хөрш гурвалтай холбогдож хуурамч хэлтэр үүсгэсэн зураглалтай. Холбогч эдийг дагасан нэг эст үрэвслийн эсийн нэвчидэстэй.Холбогч эдийн ширхэгүүдийг Трихром Массоноор будаж баталгаажуулсан.

Судалгаанд хамрагдсан эмчлүүлэгчдийн цусны ийлдсэнд фиброзын зэргийг тодорхойлох зорилгоор биомаркер PIII NP кит ашиглан үр дүнг гаргаж авсан. Гистологийн шинжилгээ болон ELISA аппаратаар уншуулсан үр дүнг харьцуулан хоорондын хамаарлыг судалсан. PIIINP-ийн босго утга ≥15.15нг/мл байх үед мэдрэг чанар 71.4%, өвөрмөц чанар 74.3% байв.

Хэлцэмж: Элэгний архаг өвчний салшгүй хэсэг нь фиброз юм. Төрөл бүрийн шалтгааны улмаас элэгний үрэвсэл үүсэх нь элэгний хэвийн үйл ажиллагааны эсийг орлуулагч, паренхимд холбогч эдийг хуримтлуулж, эрхтэн эд дэх судасжилтыг өөрчлөн, элэгний үйл ажиллагааг алдагдуулдаг үйл явц гэж Rappaport AM(1983) нар судалгаандаа дурьдсан байна[12]. Элэгний фиброзыг гематоксилин-эозин болон гистохимийн будаг (Трихром Массон эсвэл Сириус Улаан) гистологийн хувьд сайн үнэлгээ өгч чаддаг. Энэ нь янз бүрийн түвшний холбогч эдийн ширхгүүдийн хуримтлалтыг үүсгэдэг[13]. Элэгний хатуурал нь сорвижилтын хэлбэр, даамжрах хурд, давшингуй хэлбэрийн хувьд нь элэгний архаг өвчнийг оношлохдоо «Элэгний хатуурал» гэсэн нэр томъёог «Дэвшилтэт үе шат» фиброзоор солихыг Hytiroglou P (2012) нар санал болгосон байна[14]. Элэгний гэмтлийн үзүүлэлт болох PIIINP дээр үндэслэсэн судалгаагаар фиброгенийн өндөр идэвхжилтэй эдүүд болон холбогч эдийн ширхэгийн олшролын эхний үед ихэвчлэн III төрлийн коллагенаас бүрддэг бол олширч фиброз үүсгэсэн эдэд III төрлийн коллагены түвшин багасаж буй Bataller R (2005) нарын судалгааны үр дүн бидний судалгаатай дүйж байна.[7]

Бидний судалгаагаар элэгний өвчтэй өвчтөнүүдийн сийвэн дэх проколлаген III N-терминал пропептидын дундаж түвшин өндөр байгаа нь Nøjgaard C(2003) нарын судалгаатай дүйж байна.[9] Collazos J (1994) нарын судалгааны дүн элэгний эмгэгийн үед эсийн гаднах матрицийн (ECM) нийлэгжилт, эргэлт нэмэгдэх нь холбогч эдийн олшрол ихсэж фиброз үүсэх нөхцөл бүрдэнэ гэсэн судалгааны үр дүнтэй дүйж байна.[15] Smedsrød, B нар PIIINP нь элэгний хатууралтай харьцуулахад үрэвслийн илүү сайн үзүүлэлт гэж таамаглаж болно гэсэн судалгааны үр дүн хэвлүүлсэн байна.[16]

Дүгнэлт: Бидний судалгаанд хамрагдсан үйлчлүүлэгчдийн цусны сийвэндэх PIIINP маркерын илрэлийг гистологийн шинжилгээгээр баталгаажуулахад элэгний эдэд үүсэх холбогч эдийн ургалтанд шууд дэмжих нөлөөлөл үзүүлдэг болох нь тодорхойлогдов.

Ном зүй:

1. *Liu X, Wu H, Byrne M, Krane S, Jaenisch R. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(5):1852-1856.*
2. *Scheuer PJ. Liver biopsy size matters in chronic hepatitis: bigger is better. Hepatology. 2003;38(6):1356-1358.*
3. *Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. J Hepatol. 1991;13(3):372-374.*
4. *Colli A, Colucci A, Paggi S, et al. Accuracy of a predictive model for severe hepatic fibrosis or cirrhosis in chronic hepatitis C. World J Gastroenterol. 2005;11(46):7318-7322.*
5. *Baranova A, Lal P, Birerdinc A, Younossi ZM. Non-invasive markers for hepatic fibrosis. BMC Gastroenterol. 2011;11:91.*
6. *Cross TJ, Calvaruso V, Maimone S, et al. Prospective comparison of Fibroscan, King's score and liver biopsy for the assessment of cirrhosis in chronic hepatitis C infection. J Viral Hepat. 2010;17(8):546-554.*
7. *Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest. 2005;115(2):209-218.*
8. *Berry SD, Ramachandran VS, Cawthon PM, et al. Procollagen type III N-terminal peptide (P3NP) and lean mass: a cross-sectional study. J Frailty Aging. 2013;2(3):129-134.*
9. *Nøjgaard C, Johansen JS, Christensen E, Skovgaard LT, Price PA, Becker U. Serum levels of YKL-40 and PIIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease. J Hepatol. 2003;39(2):179-186.*
10. *Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or*

based on liver-dependent malfunction tests. Clin Chim Acta. 2007;381(2):107-113.
11. Muiznieks LD, Keeley FW. Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. Biochim Biophys Acta. 2013;1832(7):866-875.
12. Rappaport AM, MacPhee PJ, Fisher MM, Phillips MJ. The scarring of the liver acini (Cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory considerations. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1983;402(2):107-137.
13. Kim MY, Cho MY, Baik SK, et al. Histological subclassification of cirrhosis using the Laennec fibrosis scoring system correlates with clinical stage and grade of portal hypertension. J Hepatol. 2011;55(5):1004-1009.
14. Hytiroglou P, Snover DC, Alves V, et al. Beyond "cirrhosis": a proposal from the International Liver Pathology Study Group. Am J Clin Pathol. 2012;137(1):5-9.
15. Collazos J, Díaz F. Role of the measurement of serum procollagen type III N-terminal peptide in evaluating liver diseases. Clin Chim Acta. 1994;227(1-2):37-43.
16. Smedsrød B, Pertoft H, Gustafson S, Laurent TC. Scavenger functions of the liver endothelial cell. Biochem J. 1990;266(2):313-327.

Evaluation of N-terminal propeptide of procollagen type III for Live fibrosis

Suvda B[1,7], Khas A[2], Ulzmaa G[2], Ulzii-Orshikh N[3], Badamsuren D[4], Altantsetseg B[1], Bat-Erdene Ts[5], Anarmaa R[5], Elberelt U[7], Erdenezaya O[6,7]

[1]*Department of Histology, School of Biomedicine, MNUMS*
[2]*Third state Central Hospital, Department of Gastroenterology*
[3]*Laboratory of Clinical Pathology, First Central Hospital of Mongolia*
[4]*Intermed Hospital*
[5]*Natul Hospital*
[6]*Department of Anatom, School of Biomedicine, MNUMS*
[7]*Institute of Biomedical Sciences, MNUMS*
E-mail: suvdaa@mnums.edu.mn, Tel: +976-99070549

Background: Hepatic stellate cells promote fibrosis, responding to injury and inflammation, causing excessive accumulation of ECM and liver fibrosis. The N-terminal peptide of type III procollagen (PIIINP) is released during the synthesis of type III collagen and is a direct indicator of ECM collagen accumulation. Excessive accumulation of ECM in the space of Disse is the main characteristic of liver fibrosis5,6.
Aim: To evaluate the effect of clinical severity of liver fibrosis on the serum level of PIIINP.
Materials and Methods: We used a cross-sectional study design. We included 42 patients who were admitted to Third State Central Hospital from February 2024 to July 2024 and fulfilled the study's criteria. We collected serum samples to measure PIIINP levels using an ELISA kit, and percutaneous liver biopsies were obtained for histopathology. The study was approved and carried out by the 23/001 protocol of the Ethical Committee. STATA-14 was used for analysis, and correlation and mean differences were calculated using ANOVA.
Results: The study patients were females n=31 (26.2%) and males n=11 (26.2%). A Metavir scoring system was used to classify liver fibrosis grades. We divided into 3 groups: minimal or no fibrosis (F0-1), advanced fibrosis (F2-3), and Liver cirrhosis (F4). A moderate positive correlation was found between PIIINP level and liver fibrosis grade (p=0.03). There was a significant statistical difference in serum mean PIIINP level between the F0-1 and F2-3 groups (p=0.05). The accuracy of the test, according to AUC, was 0.714. When we set the PIIINP cut-off value to ≥15.15ng/ml, sensitivity and specificity were 71.4% and 74.3%, respectively.
Conclusion: Our study concluded that serum PIIINP level is a direct biomarker of liver fibrosis and cirrhosis.

Keywords: N-terminal propeptide of procollagen type III, Liver fibrosis, Sclerosis, Non-invasive, liver biopsy