Архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлт болон бичил бүтцийн фиброзон өөрчлөлтийг харьцуулан судалсан дүн

М.Сувд[1], М.Бадрах[2], О.Энхээ[4], Б.Онон[5], Б.Ган-Эрдэнэ[5], Р.Номиунгэрэл[1], А.Авирмэд[1], Б.Хонгорзул[3]

[1]АШУҮИС, Био-АС, Анатомийн тэнхим
[2]АШУҮИС, Био-АС, Эмгэг физиологийн тэнхим
[3]АШУҮИС, Био-Анагаахын хүрээлэн
[4]Эмгэг судлалын үндэсний төв
[5]Улсын хоёрдугаар төв эмнэлэг, Ерөнхий мэс заслын тасаг
Цахим шуудан: suvd.m@mnums.edu.mn, Утас: 89190703

Түлхүүр үг:
Архины бус шалтгаант элэг өөхлөх өвчин
Элэг
Хөлдөөсөн эд
Фиброз

Товч утга:
Үндэслэл: Өнөө үед архины бус шалтгаант элэг өөхлөх өвчний хүндрэлээс шалтгаалсан элэгний өвчлөл зүүн өмнөд азийн оруудад улам нэмэгдэх хандлагатай байна. Архины бус шалтгаант элэг өөхлөх өвчин (АБШЭӨӨ) нь согтууруулах ундааны хэрэглээ бага эсвэл огт хэрэглэдэггүй хүмүүсийн элэгний бичил бүтцийн липидийн хуримтлалаар тодорхойлогддог элэгний эмгэг юм. АБШЭӨӨ нь инсулины дөжрөлтэй холбоотой элэгний өөхөн хуримтлал бөгөөд эдийн шинжилгээгээр элэгний эсийн 5-аас бага хувьд өөх хуримтлагдах эсвэл MRI шинжилгээнд 5.6%-иас бага нягтаршилтай өөхөн хэсэг илрэх эсвэл MRI шинжилгээнд өөх ба усны тоон харьцаагаар үнэлэгдэн тодорхойлогддог болохыг тогтоожээ. Манай оронд хөлдөөсөн зүслэг дээр гистологийн энгийн болон тусгай будгийн аргаар хийгдсэн туршилт судалгаа хомс байгаа нь энэхүү судалгааг хийх үндэслэл боллоо. **Зорилго:** Архины бус шалтгаант элэг өөхлөх өвчний үед хөлдөөсөн эдэд өөхлөлтийн зэрэг болон фиброзын зэргийг тодорхойлох. **Арга, аргачлал:** Бид энэхүү судалгааг АШУҮИС-ийн Био-АС-ийн Анатомийн тэнхим, АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын хүрээлэн болон Улсын хоёрдугаар төв эмнэлгийн түшиглэн хийж гүйцэтгэв. АШУҮИС-ийн Судалгааны ёс зүйн хяналтын хорооноос судалгааны ажлыг эхлүүлэх ёс зүйн зөвшөөрөл авсны дагуу лабораторид ажиллах аюулгүй ажиллагааны дүрэм, журмыг чанд мөрдөн хийж гүйцэтгэв. УХТЭ-т төлөвлөгөөт хагалгаагаар цөсний хүүдий авах мэс ажилбарт орсон хүмүүсээс таниулсан зөвшөөрөл авч хамруулах шалгуур үзүүлэлтийн дагуу, эрүүл бүлэг, архины бус шалтгаант элэг өөхлөлттэй (n=2), фиброз өөрчлөлттэй (n=2) хүнийг сонгосон. Дурангийн хагалгаанд орж буй хүмүүсээс хагалгааны явцад элгэнд хатгалт хийж эдээс 1 сантиметр орчим хэмжээтэйг авч тэр дор нь шингэн азотоор гүн хөлдөөж, бичил бэлдмэл бэлдэн бүтцийг судлалаа. **Үр дүн:** Архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлтийн бичил бүтцийг эрүүл бүлгийн элэгний бичил бүтэцтэй харьцуулахад элэгний эсийн баганан бүтэц алдагдсан, перипортал лимфоцитийн нэвчдэс бага зэрэг илэрсэн. Тосон улаан О будгаар будаж үзэхэд 34-66%-д жижиг ба том дусалт өөхөн хувирал илэрч элэг өөхлөлтийн 2-р шат тодорхойлогдлоо. Харин трихром массоноор будаж үзэхэд перивенул ба перипорталд холбогч эдэн өөрчлөлт илэрсэнгүй (Ishak grade 0/4) байна. Архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлтийн 3-р шатанд шилжихэд перивенул ба перипорталд холбогч эдэн өөрчлөлт 1-р шат илэрч (Ishak grade 1/4) байлаа. Харин холбогч эдэн өөрчлөлтийн 3 шатнаас холбогч эдэн таславчийн өөрчлөлт нэмэгдэж 4-р шатанд шилжихэд жижиг том өөхөн дуслын хэмжээ өөрчлөлт илэрсэнгүй. **Дүгнэлт:** 1. Элэгний холбогч эдэн өөрчлөлтийн үе шат ихсэхэд архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлт шууд нөлөө үзүүлэхгүй байгаа нь тодорхойлогдлоо. 2. Архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлтийн зэрэг нэмэгдсэн хэдий ч холбогч эдийн өөрчлөлт илрэхгүй байгаа нь тодорхойлогдлоо.

Үндэслэл: Архи хэрэглэдэггүй, хоёрдогчоор элэгний өөхлөлт үүсгэх ямар нэг эмгэггүй хүнд багажийн болон эдийн шинжилгээгээр элэгний өөхлөлт батлагдахыг "Архины бус шалтгаант элэг өөхлөх өвчин" гэнэ.[1] 2016 онд хэвлэгдсэн мета-анализ судалгааны үр дүнд АБШЭӨӨ Азид 1000 хүн амд 52.34, барууны орнуудад

1000 хүн амд 28 шинээр тохиолдсон байна.[2] АБШЭӨӨ (NAFLD) гэдэгт архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлт (АБШЭӨ) (NAFL/steatosis), АБШЭӨУ (NASH), өөхлөлтийн шалтгаант фиброз, цирроз гэсэн бүлэг өвчин багтдаг байна.[3] АБШЭӨӨ үүсэж, хөгжихөд нас, хүйс, удмын хүчин зүйлээс гадна гадаад хүчин зүйлс нөлөөлдөг байна.[3]

АБШЭӨӨ нь дэлхийд хөгжингүй болон хөгжиж буй орнуудын аль алинд нь элэгний хамгийн түгээмэл өвчлөлийн нэг болж хурдацтай тархаж байгаа бөгөөд дэлхийн хэмжээнд ойролцоогоор 25%-ийн тархалттай байгааг тогтоожээ.[4]

Түүнчлэн таргалалт, чихрийн шижин хэвшинж 2, дислипидемийн үед АБШЭӨӨ үүсэх өндөр эрсдэлтэй байдаг. Тухайлбал, таргалалттай нас барагсдын элэгний эдийн шинжилгээний 91% АБШЭӨӨ-тэй байсан ба үүнээс 37% АБШЭӨУ-тэй байсан болох нь тогтоогджээ.[1,5] Мөн чихрийн шижин хэвшинж 2-ийн үед 62.3-69%, дислипидемийн үед 50% тохиолдож байна.[5]

Судлаачдын тогтоосноор чихрийн шижин хэв шинж 2 болон таргалалт хавсарсан хүнд, хөнгөн зэргийн элэг өөхлөх өвчин 100% тохиолддог ба үүнээс 50%-д элэгний өөхлөлт үрэвсэл, 19%-д элэгний цирроз тохиолдох магадлалтай хэмээн тооцоолсон байдаг.[1] Манай оронд хүн амын дунд АБШЭӨӨ-ний тархалтыг тогтоосон судалгаа хараахан хийгдээгүй байна.

Зорилго: Архины бус шалтгаант элэг өөхлөх өвчний үед хөлдөөсөн эдэд өөхлөлтийн зэрэг болон фиброзын зэргийг тодорхойлох.

Зорилт:

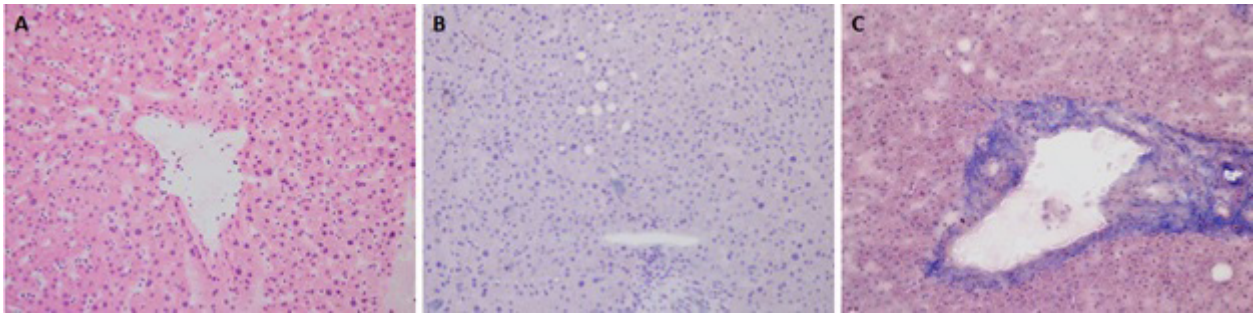
1. Эдийг гематоксилин Эозин болон трихром массоны будгаар будаж фиброзын зэргийг Ishak grade-ээр үнэлэх
2. Эдийг Oil Red O будгаар будаж өөхлөлтийн зэргийг үнэлэх

Арга, аргачлал: Бид энэхүү судалгааг АШУҮИС-ийн Био-АС-ийн Анатомийн тэнхим, Био-Анагаахын хүрээлэн болон Улсын хоёрдугаар төв эмнэлгийг түшиглэн хийж гүйцэтгэв. АШУҮИС-ийн Судалгааны ёс зүйн хяналтын хорооноос судалгааны ажлыг эхлүүлэх ёс зүйн зөвшөөрлийг авсны (хурлын тэмдэглэл №2024/3-06) үндсэн дээр лабораторид ажиллах аюулгүй ажиллагааны дүрэм, журмыг чанд мөрдөн хийж гүйцэтгэв. УХТЭ-т төлөвлөгөөт хагалгаагаар цөсний хүүдий авах мэс ажилбарт орсон хүмүүсээс таниулах зөвшөөрөл авч хамруулах шалгуур үзүүлэлтийн дагуу эрүүл бүлэг-1, архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлт-2, өөхлөлтийн шалтгаант фиброзон өөрчлөлт-3 бүхий элгийг сонгосон. Дурангийн хагалгаанд орж буй хүмүүсээс хагалгааны явцад элгэнд хатгалт хийж эдээс 1 сантиметр орчим хэмжээтэйг авч тэр дор нь шингэн азотоор хөлдөөж лаборатори руу зөөвөрлөсөн. Хөлдөөсөн эдийг хөлдөөгч микротом (SLEE MEV) ашиглан 5 мкм хэмжээтэй зүсэж тасалгаанд хатаасны дараа гематоксилин эозин, NovaUltra™ Masson Trichrome Stain Kit, VitroView™ Oil Red O Stain Kit-ээр тус тус будаж элэг өөхлөлтийн зэргийг 0,1,2,3 оноогоор, фиброзын зэргийг Ishak stage. 0,1,2,3,4 оноогоор тус тус үр дүнг дүгнэсэн.

Судалгааны ёс зүйн зөвшөөрөл: АШУҮИС -ийн “Судалгааны ёс зүйн хяналтын хороо” -ны 2024 оны 06 сарын 14-ний хурлаар (2024/3-06) хэлэлцүүлж зөвшөөрөл авсан. Мөн судалгаанд хамрагдагсдаас “Таниулсан зөвшөөрлийн хуудас” -аар бичгээр зөвшөөрөл авсан.

Үр дүн: Бид эрүүл бүлэг, архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлтэй болон фиброз өөрчлөлттэй элэгний бичил бэлдмэлийг гематоксилин эозин, тосон улаан О, трихром массон будгуудаар будаж өөрчлөлтийг судаллаа.

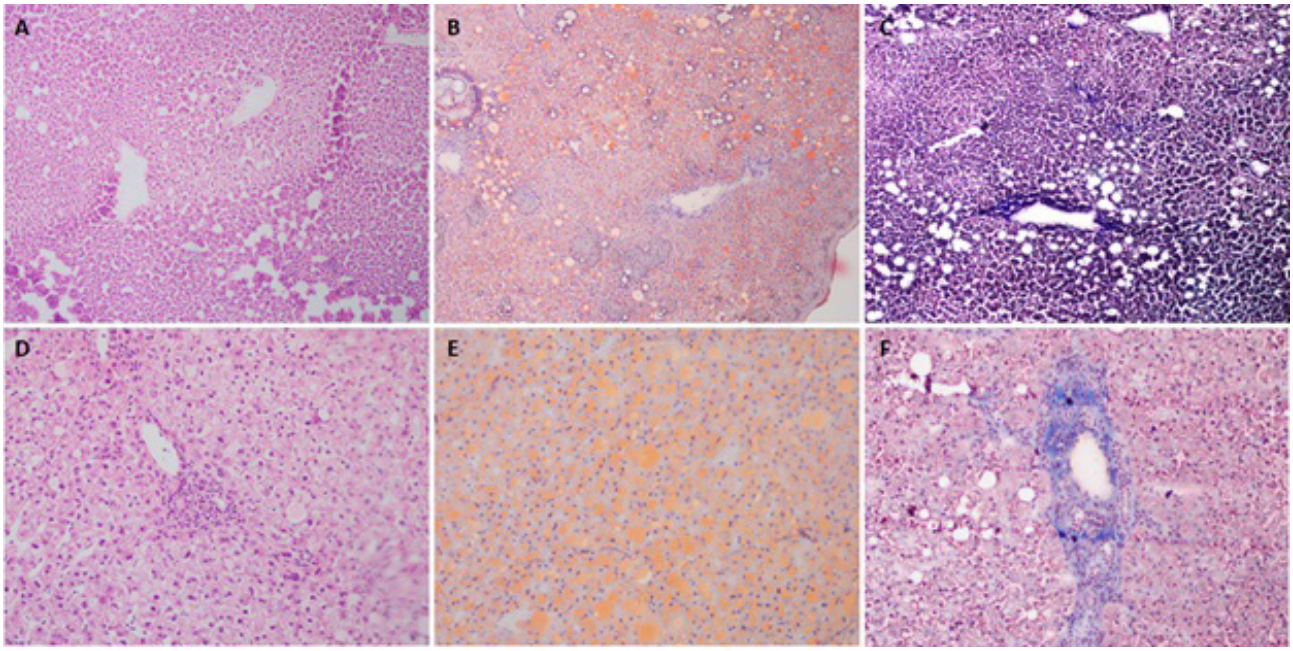
Эрүүл бүлгийн элэгний эс тод, төвийн венийн (v.centralis) ханын бүтэц тод, элэгний эсийн баганан бүтэц хадаглагдсан байлаа. Жижиг ба том дусалт өөхөн хувирал /0/3 илрээгүй, перипортал лимфоцитийн нэвчдэс бага зэрэг илэрсэн, перивенул ба перипорталд холбогч эдэн өөрчлөлт илрээгүй (Ishak grade 0/4). (Зураг 1)



Зураг 1. Элэгний бичил бүтэц.
Жижиг ба том дусалт өөхөн хувирал /0/3, Перипортал бага зэргийн лимфоцитийн нэвчдэс,
Перивенул ба перипортал бага хэмжээний фиброз (Ishak шат 0/4). A. Гематоксилин Эозин, x200 өсгөлт.
B. Тосон улаан О, x200. C. Трихром массон, x100

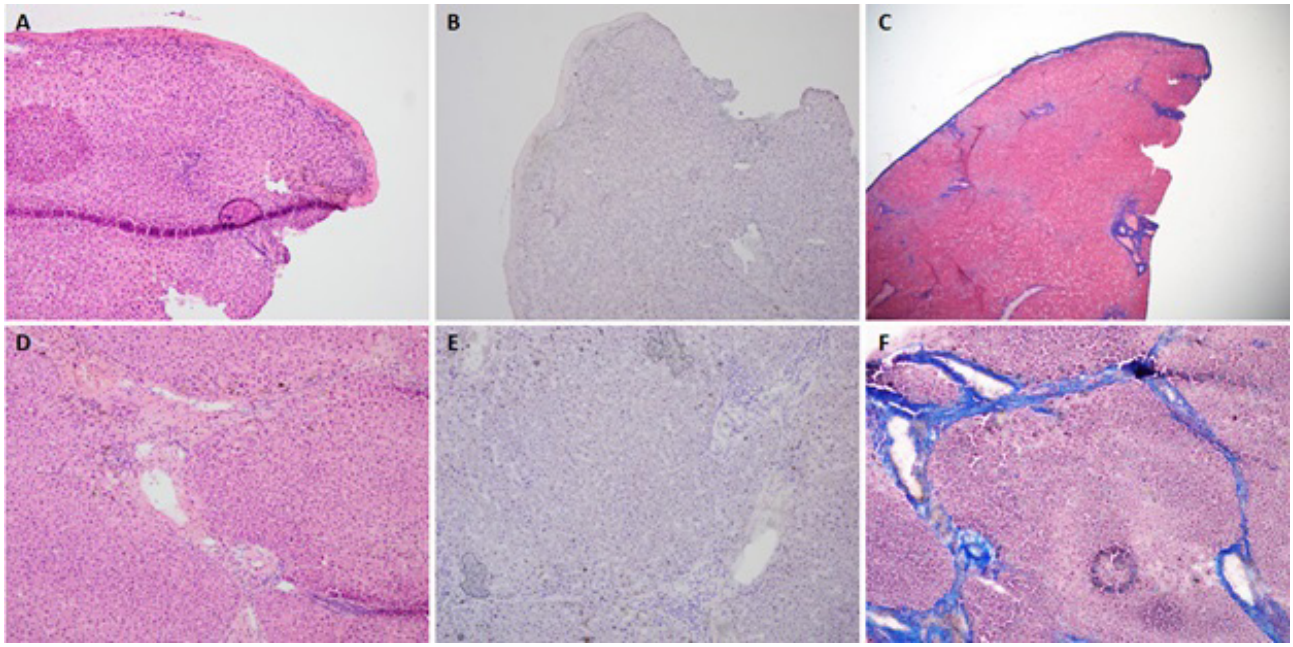
Архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлтийн бичил бүтцийг эрүүл бүлгийн элэгний бичил бүтэцтэй харьцуулахад элэгний эсийн баганан бүтэц алдагдсан, перипортал лимфоцитийн нэвчдэс бага зэрэг илэрсэн. Тосон улаан О будгаар будаж үзэхэд 34-66% жижиг ба том дусалт өөхөн хувирал илэрч элэг өөхлөлтийн 2-р шат тодорхойлогдлоо. Харин трихром массоноор будаж үзэхэд перивенул ба перипорталд холбогч эдэн өөрчлөлт илэрсэнгүй (Ishak grade 0/4) байна. (Зураг 2 A, B, C) Мөн архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлтийн

3-р шатанд шилжихэд тосон улаан О будгаар будахад 70%-иас дээш талбайг жижиг болон том дусалт өөхөн хувирал эзэлж байсан хэдий ч трихром массоноор будаж үзэхэд перивенул ба перипорталд холбогч эдэн өөрчлөлт 1-р шат илэрч (Ishak grade 1/4) байна.(Зураг 2 D, E, F)



Зураг 2. Архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлтийн бичил бүтэц.
Жижиг ба том дусалт өөхөн хувирал 2 шат-А, В Перипортал бага зэргийн лимфоцитийн нэвчдэс-А, Перивенул ба перипортал хэсгийн фиброз илрээгүй (Ishak шат 0/4)-С Жижиг ба том дусалт өөхөн хувирал /3/3/-Е, Перипортал дунд зэргийн лимфоцитийн нэвчдэс-D, Перивенул ба перипортал бага хэмжээний фиброз (Ishak grade 1/4)-F. А, D-Гематоксилин Эозин, х200 өсгөлт. В, Е-Тосон улаан О, х200. С, F Трихром массон, х200

Элэгний холбогч эдэн өөрчлөлтийн бичил бүтцийг эрүүл бүлгийн элэгний бичил бүтэцтэй харьцуулахад элэгний эсийн баганан бүтэц алдагдсан, перипортал лимфоцитийн нэвчдэс бага зэрэг илэрсэн. Тосон улаан О будгаар будаж үзэхэд жижиг ба том дусалт өөхөн хувирал илрээгүй хэдий ч трихром массоноор будаж үзэхэд перивенул ба перипорталд холбогч эдэн таславч үүсч (Ishak grade 3/4) байна. (Зураг 2 А, В, С)



Зураг 3. Элэгний холбогч эдэн өөрчлөлтийн бичил бүтэц.
Жижиг ба том дусалт өөхөн хувирал илрээгүй /0/3/-В, Перипортал дунд зэргийн лимфоцитийн нэвчдэс-А, Перивенул ба перипортал бага хэмжээний фиброз (Ishak grade 3/4)-С, Жижиг ба том дусалт өөхөн хувирал /0/3/-Е, Перипортал дунд зэргийн лимфоцитийн нэвчдэс-D, Перивенул ба перипорталд холбогч эдэн таславч үүсч, их хэмжээний фиброз өөрчлөлт илэрсэн (Ishak grade 4/4)-F. А, D-Гематоксилин Эозин, х200 өсгөлт. В, Е-Тосон улаан О, х200. С, F-Трихром массон, х200

Мөн фиброз өөрчлөлтийн 4-р шатанд шилжихэд тосон улаан О будалтаар жижиг болон том дусалт өөхөн хувирал бага зэрэг нэмэгдэж байсан хэдий ч трихром массоноор будаж үзэхэд перивенул ба перипортал хэсгээр холбогч эдэн таславч ихэсч, холбогч эдэн гүүр үүссэн нь ажиглагдлаа (Ishak grade 4/4) байна. (зураг 4 D, E, F)

Хэлцэмж: АБШЭӨӨ Азид 1000 хүн амд 52.34, барууны орнуудад 1000 хүн амд 28 шинээр тохиолдсон байна.[2] АБШЭӨӨ (NAFLD) гэдэгт архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлт (АБШЭӨ) (NAFL/steatosis), АБШЭӨҮ (NASH), өөхлөлтийн шалтгаант фиброз, цирроз гэсэн бүлэг өвчин багтаж байна.[3]

Судлаач Cataldo I нар архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлтийн үед жижиг том өөхөн дусал нэмэгдэхийн хирээр түүний бүсийн ялгаа алга болж, бүх ацинар бүсүүдэд жигд тархдаг гэжээ. Бидний судалгааны ажлын үр дүнгээр архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлтийн бичил бүтцийг эрүүл бүлгийн элэгний бичил бүтэцтэй харьцуулахад элэгний эсийн баганан бүтэц алдагдсан, перипортал лимфоцитийн нэвчдэс бага зэрэг илэрсэн. Тосон улаан О будгаар будаж үзэхэд 34-66 хувийг жижиг ба том дусалт өөхөн хувирал илэрч элэг өөхлөлтийн 2-р шатнаас 3-р шат руу шилжихэд тосон улаан О будгаар будахад 70 хувиас дээш талбайг жижиг болон том дусалт өөхөн хувирал эзэлж, трихром массоноор будаж үзэхэд перивенул ба перипорталд холбогч эдэн өөрчлөлт 1-р шат илэрч (Ishak grade 1/4) байлаа.[7]

Судлаач Heyens LJM нарын судалгаанд элэгний эсүүд үрэвслээс үүдэлтэйгээр дархлааны эсийн нэвчилт, гепатоцитын гэмтлийн улмаас идэвхжиж, коллаген үйлдвэрлэдэг миофибробласт руу хувирах үйл явц явагддаг. Мөн миофибробластууд элэгний үүдэл эсийн хуваагдал, идэвхжилийг өдөөдөг. Дархлааны эсийн нэвчилт, гепатоцитын гэмтлийн өөр нэг үр дагавар нь гепатоцитын апоптоз болдог. DAMPs нь элэгний үүдэл эсийг идэвхжүүлдэг. Миофибробластууд болон элэгний үүдэл эсүүд нь коллаген үйлдвэрлэж эхэлдгийг тэмдэглэжээ. Бидний судалгаагаар элэгний холбогч эдэн өөрчлөлтийн бичил бүтцийг эрүүл бүлгийн элэгний бичил бүтэцтэй харьцуулахад элэгний эсийн баганан бүтэц алдагдсан, перипортал лимфоцитийн нэвчдэс бага зэрэг илэрсэн. Тосон улаан О будгаар будаж үзэхэд жижиг ба том дусалт өөхөн хувирал илрээгүй хэдий ч трихром массоноор будаж үзэхэд перивенул ба перипорталд холбогч эдэн таславч үүсч (Ishak grade 3/4) байна. Трихром массоноор будаж үзэхэд перивенул ба перипортал хэсгээр холбогч эдэн таславч ихсэж, холбогч эдэн гүүр үүсэж 4-р шатанд шилжихэд тосон улаан О будалтаар жижиг болон том дусалт өөхөн хувирал бага зэрэг нэмэгдэж байсан.[8]

Судлаач Brown GT, Kleiner DE (2005) нарын судалснаар өвчний эхний шатанд гистологийн өөрчлөлтүүд ихэнхдээ ацинарын 3-р бүсэд илүү тод илэрч үрэвсэл ажиглагдсан бөгөөд архины бус шалтгаант өөхлөлт нь фиброз руу шилжих бие даасан таамаглагч хүчин зүйл болж байна гэж дүгнэжээ.[9] Эдгээр үр дүн нь бидний судалгааны ажлын үр дүнтэй дүйж байлаа.

Дүгнэлт:

1. Элэгний холбогч эдэн өөрчлөлтийн үе шат ихсэхэд архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлт шууд нөлөө үзүүлэхгүй байгааг тодорхойллоо.
2. Архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлтийн зэрэг нэмэгдсэн хэдий ч холбогч эдэн өөрчлөлт илрэхгүй байгаа нь тодорхойлогдлоо.

Ном зүй:

1. *Эрүүл мэндийн сайдын 2021.11.05-ны А697-р тушаал*
2. *EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of nonalcoholic fatty liver disease. J Hepatol (2016).*
3. *Yi M, Chen R, Yang R, Chen H. Increased prevalence and risk of non-alcoholic fatty liver disease in overweight and obese patients with Type 2 diabetes in South China. Diabet Med. 2017; 34(4):505-513.*
4. *EASL-The Home of Hepatology.Obesity epidemic results in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) becoming the most common cause of liver disease in Europe". Archived from the original on 5 October 2019. Retrieved 5 October 2019.*
5. *Li L, Liu DW, Yan HY, Wang ZY, Zhao SH, Wang B. Obesity is an independent risk factor for non-alcoholic fatty liver disease: evidence from a meta-analysis of 21 cohort studies. Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity. 2016;17(6):510-519.*
6. *Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. J Hepatol. 2007 Oct;47(4):598-607. doi: 10.1016/j.jhep.2007.07.006. Ehub 2007 Jul 30. PMID:17692984*
7. *Cataldo I, Sarcognato S, Sacchi D, Cacciatore M, Baciorri F, Mangia A, Cazzagon N, Guido M. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. Pathologica. 2021 Jun;113(3):194-202. doi: 10.32074/1591-951X-242. PMID: 34294937; PMCID: PMC8299321.*
8. *Heyens LJM, Busschots D, Koek GH, Robaeys G, Francque S. Liver Fibrosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: From Liver Biopsy to Non-invasive Biomarkers in Diagnosis and Treatment. Front Med (Lausanne). 2021 Apr 14;8:615978. doi: 10.3389/fmed.2021.615978. PMID: 33937277; PMCID: PMC8079659.*
9. *Brown GT, Kleiner DE. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. Metabolism. 2016 Aug;65(8):1080-6. doi: 10.1016/j.metabol.2015.11.008. Epub 2015 Dec 2. PMID: 26775559; PMCID: PMC4889547.*

Results of a comparative study on Non-alcoholic fatty liver induced and microstructural fibrotic changes

Suvd M[1], Badrakh M[2], Enkhee O[4], Onon B[5], Gan-Erdene B[5], Nomiungerel R[1], Avirmed A[1], Khongorzul B[3]

[1]Department of Anatomy, School of Biomedicine, MNUMS
[2]Department of Pathophysiology, School of Biomedicine, MNUMS
[3]Biomedical Research Institute, MNUMS
[4]National Center for Pathology
[5]Department of General Surgery, Second State Central Hospital
E-mail: suvd.m@mnums.edu.mn, Tel: +976-89190703

Background: In recent years, the incidence of liver diseases due to complications of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has shown a significant upward trend in Southeast Asian countries. NAFLD is a hepatic disorder characterized by lipid accumulation in the microstructure of the liver in individuals who consume little to no alcohol. It is often associated with insulin resistance and is diagnosed when steatosis affects more than 5% of hepatocytes histologically, or when the fat signal intensity on MRI exceeds 5.6%, based on fat-to-water ratio measurements. In Mongolia, histological studies using frozen liver sections with routine and special staining techniques are limited, highlighting the necessity of this study.
Aim: To determine and compare the degree of steatosis and fibrosis in frozen liver tissue samples of patients with NAFLD through histological analysis.
Materials and Methods: This study was conducted at the the Department of Anatomy, School of Biomedicine and Biomedical Research Institute of MNUMS in collaboration with the Second State Central Hospital. Ethical approval was obtained from the Research Ethics Committee of MNUMS (Protocol No. 2024/3-06). All procedures adhered strictly to laboratory biosafety protocols. Participants were selected among patients undergoing elective laparoscopic cholecystectomy, from whom informed consent was obtained. Based on inclusion criteria, five participants were grouped as follows: healthy control (n=1), NAFLD without fibrosis (n=2), and NAFLD with fibrosis (n=2). Liver biopsies (approx. 1 cm in size) were obtained intraoperatively, immediately deep-frozen in liquid nitrogen, and prepared for histological evaluation.
Results: In patients with NAFLD compared to the healthy liver group, disruption of hepatocyte columnar architecture and mild periportal lymphocytic infiltration were observed. Oil Red O staining revealed 34–66% micro- and macrovesicular steatosis, corresponding to grade 2 steatosis. Masson's trichrome staining showed no fibrotic changes in perivenular or periportal areas (Ishak grade 0/4) at this stage. However, upon progression to grade 3 steatosis, early-stage fibrosis was observed in both perivenular and periportal regions (Ishak grade 1/4). Further progression to stage 4 fibrosis was characterized by the development of connective tissue septa, although no significant changes in droplet size were observed.
Conclusions:

1. Increasing stages of fibrosis are not directly influenced by the severity of hepatic steatosis in NAFLD.
2. Although the degree of steatosis increases, the absence of corresponding fibrotic changes in early stages indicates a complex progression pattern of NAFLD requiring further investigation.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease, Liver, frozen tissue, Fibrosis, histology