Artikel Penelitian

***Holothuria scabra* Memperbaiki Fibrosis Hepar pada Tikus yang Diinduksi Karbon Tetraklorida**

***Holothuria scabra* Improves Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in Rats**

Novrita Padauleng¹, Nurhidayati²

¹Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Mataram Mataram

²Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Mataram Mataram

ABSTRAK

Perkembangan agen antifibrotik belakangan ini mencakup berbagai mekanisme, diantaranya melalui jalur antioksidan. Salah satu bahan alam yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan adalah Teripang pasir (*Holothuria scabra*). Tujuan penelitian ini adalah menganalisa aktivitas antifibrotik Teripang pasir *in vivo* menggunakan tikus fibrosis hepar yang diinduksi CCl₄. Dua puluh delapan tikus Wistar jantan dibagi menjadi 4 kelompok penelitian, yang terdiri dari kelompok kontrol *vehicle* (injeksi minyak zaitun intraperitoneal), kelompok kontrol induksi CCl₄ (injeksi CCl₄ dalam minyak zaitun intraperitoneal), serta dua kelompok perlakuan (tikus diinduksi CCl₄ dan diberikan Teripang pasir 75 dan 100mg/200gBB). Fibrosis hepar diinduksi dengan injeksi CCl₄ 10% dalam minyak zaitun serial selama 5 minggu, diikuti 4 minggu pemberian Teripang pasir peroral (75 dan 100mg/200gBB) sekali sehari, sejak minggu ke-5. Fibrosis hepar dianalisa menggunakan sistem *scoring* METAVIR pada jaringan dengan pewarnaan Mallory. Hasil penelitian menunjukkan bahwa derajat fibrosis hepar pada kelompok kontrol induksi CCl₄ berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan yang diinduksi CCl₄ dan diberikan Teripang pasir ($p=0,000$), namun perbedaan antara kelompok perlakuan yang diberikan Teripang pasir 75 dan 100mg/200gBB tidak signifikan ($p=0,081$). Sebagai kesimpulan, pemberian ekstrak Teripang pasir dapat memperbaiki fibrosis hepar yang diinduksi CCl₄.

Kata Kunci: CCl₄, fibrosis hepar, teripang pasir (*Holothuria scabra*)

ABSTRACT

Recently, the development of antifibrotic agents has covered a variety of mechanisms, including through antioxidant pathway. One of the natural compounds known to have antioxidant activity is Sandfish (*Holothuria scabra*). The aim of this study is to analyze the antifibrotic activity of Sandfish *in vivo* on CCl₄-induced liver fibrosis in rats. Twenty eight male Wistar rats were divided into 4 experimental groups consisting of vehicle control (intraperitoneal injection of olive oil), CCl₄-induced control (intraperitoneal injection of CCl₄ in olive oil), and two treatment groups (CCl₄-induced rats with the administration of 75 and 100 mg/200gBW of Sandfish). Liver fibrosis were induced by serial injection of 10% CCl₄ in olive oil for 5 weeks, followed by 4 weeks of oral administration of Sandfish (75 and 100 mg/200gBW) once daily, began at 5th week. Liver fibrosis were analyzed using METAVIR scoring system in a Mallory-stained sections. The results show that the stage of liver fibrosis in CCl₄-induced control group was significantly different with treatment groups which were induced by CCl₄ and administered with Sandfish ($p=0,000$), but the difference between treatment groups administered with 75 and 100 mg/200gBW of Sandfish ($p=0,081$) was insignificant. In conclusion, administration of Sandfish is able to improve the CCl₄-induced liver fibrosis.

Keywords: CCl₄, liver fibrosis, sandfish (*Holothuria scabra*)

Korespondensi: Novrita Padauleng, Fakultas Kedokteran, Universitas Mataram, Jl. Pendidikan No. 37, Mataram, 83125, Nusa Tenggara Barat Tel. (0370) 640874 Email: novrita9888@yahoo.com

PENDAHULUAN

Fibrosis hepar merupakan salah satu karakteristik penyakit hepar kronis yang paling sering terjadi. Kelainan ini disebabkan oleh kerusakan kronis pada organ hepar yang ditandai dengan akumulasi protein matriks ekstraseluler. Penyebab fibrosis hepar antara lain infeksi virus hepatitis kronis (HCV & HBV), penyalahgunaan alkohol, obat dan toksin, serta *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) (1-5). Tingginya kasus hepatitis di Indonesia menjadi salah satu alasan pentingnya upaya identifikasi dan pengembangan terapi antifibrotik.

Agen antifibrotik yang sedang berkembang saat ini meliputi berbagai jalur mekanisme. Diantaranya inhibisi aktivasi dan fungsi *hepatic stellate cells* (HSCs), inhibisi respon inflamasi, inhibisi stres oksidatif, serta antioksidan (6-8). Terapi antioksidan terbukti bersifat efektif menghambat atau mengurangi kerusakan fibrosis hepar. Salah satu bahan dari alam yang diduga mengandung bahan aktif antioksidan adalah teripang. Teripang kaya akan kandungan zat gizi, diantaranya vitamin A, C dan E, senyawa polifenol dan flavonoid, kondroitin sulfat, asam lemak eikosapentanoat (EPA) serta dokosaheksanoat (DHA) yang bersifat antioksidan dan antiinflamasi (9-15).

Indonesia merupakan penghasil teripang terbesar di dunia, setidaknya terdapat 26 spesies teripang. Salah satu jenis teripang yang banyak terdapat di Provinsi Nusa Tenggara Barat adalah teripang pasir (*Holothuria scabra*). Senyawa yang terkandung dalam teripang diduga juga terkandung dalam teripang pasir, dengan demikian teripang pasir diharapkan mampu menghambat fibrosis hepar melalui jalur antioksidan. Penelitian sebelumnya oleh Nurhidayati (2009), membuktikan bahwa simplisia teripang pasir dosis 50mg/200gBB tikus, memiliki efek proteksi terhadap hepatotoksitas yang diinduksi karbon tetraklorida (CCl₄) dosis tunggal (16).

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa aktivitas antifibrotik Teripang pasir *in vivo* menggunakan tikus fibrosis hepar yang diinduksi CCl₄. Hasil penelitian ini diharapkan mendukung upaya penemuan obat baru khususnya untuk fibrosis hepar.

METODE

Teripang pasir yang digunakan pada penelitian ini adalah teripang pasir (*Holothuria scabra*) dewasa, berukuran 15cm x 6cm, dan berat 2000 gram, yang berasal dari perairan Bima, Nusa Tenggara Barat. Simplisia teripang pasir dibuat ekstrak dengan metode maserasi. Simplisia teripang pasir dosis 75 dan 100mg/200gBB dikonversi menjadi ekstrak dosis 11,25 dan 15mg/200gBB (1mg simplisia setara dengan 0,15mg ekstrak).

Uji potensi teripang pasir terhadap fibrosis hepar *in vivo* pada penelitian ini menggunakan 28 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*), strain *Wistar*, jenis kelamin jantan, umur 3-4 bulan dengan berat badan antara 200-250 gram. Jumlah sampel ditentukan berdasarkan rumus Federer dengan faktor koreksi 15%. Subyek dibagi dengan metode randomisasi sederhana menjadi empat kelompok, yaitu kelompok kontrol *vehicle* (injeksi minyak zaitun intraperitoneal), kontrol induksi CCl₄ (injeksi CCl₄ 10% dalam minyak zaitun), perlakuan 1 (diinduksi CCl₄ 10% dan diberikan teripang pasir 75mg/200gBB), dan perlakuan 2 (diinduksi CCl₄ 10% dan diberikan teripang pasir 100mg/200gBB).

Induksi fibrosis hepar dilakukan dengan injeksi 1ml/kgBB senyawa CCl₄ 10% dalam pelarut minyak zaitun, intraperitoneal, 3 kali dalam seminggu selama 5 minggu (17). Selanjutnya tikus kelompok perlakuan diberikan teripang pasir sebanyak 75mg/200gBB dan 100mg/200gBB dalam pelarut CMC 1% (carboxymethyl cellulose), dengan volume 1cc/10 mg secara peroral menggunakan sonde, 1 kali sehari, selama 4 minggu sejak minggu ke-5. Misal berat tikus 350g, maka dosis ekstrak teripang pasir yang diberikan pada tikus kelompok perlakuan 1 adalah sebanyak 19,7mg (350g x 11,25mg/200g) dalam 1,9ml pelarut CMC 1%. Sementara untuk berat tikus yang sama pada kelompok perlakuan 2 diberikan ekstrak teripang pasir sebanyak 26,2 mg (350g x 15mg/200g) dalam 2,6 ml pelarut CMC 1%.

Tikus dikurbankan pada akhir minggu ke-8 penelitian untuk dinilai gambaran histopatologi fibrosis hepar tikus menggunakan sistem *scoring* METAVIR. Sistem ini menilai derajat fibrosis berdasarkan skala 1-4, terdiri dari F0 (tidak fibrosis atau tidak terdapat pembesaran traktus portal serta septa), F1 (Fibrosis portal tanpa septa), F2 (Fibrosis portal, dengan sedikit septa atau jaringan fibrosa disekitar traktus portal), F3 (Fibrosis portal dengan banyak septa atau jaringan fibrosa yang menghubungkan traktus portal dengan traktus portal atau dengan vena sentralis atau *bridging fibrosis*), dan F4 (sirosis) (18). Pengamatan derajat fibrosis dilakukan pada dua irisan jaringan hepar dengan ketebalan 5 µm yang diberi pewarnaan khusus *Trichrome mallory* dan diamati dengan mikroskop perbesaran total 100 X dan 400 X, di 5 lapang pandang. Analisa statistik data skor fibrosis dilakukan dengan uji Kruskal-Wallis yang dilanjutkan uji *post hoc* Mann-Whitney, dengan tingkat kemaknaan uji sebesar 0,05.

HASIL

Perbandingan mean skor derajat fibrosis pada keempat kelompok penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($p=0,000$) (Tabel 1).

Tabel 1. Perbandingan frekuensi derajat fibrosis pada kelompok penelitian

Kelompok penelitian	Skor derajat fibrosis	Median
	Mean $\pm$ SD	
Kontrol vehicle	0,00 ^a $\pm$ 0,000	0
Kontrol induksi CCl ₄	3,00 ^c $\pm$ 0,000	3
Perlakuan 1 (Induksi CCl ₄ +Teripang 75 mg)	2,00 ^b $\pm$ 0,577	2
Perlakuan 2 (Induksi CCl ₄ +Teripang 100 mg)	1,43 ^b $\pm$ 0,535	1

Keterangan: Superskrip dengan huruf yang berbeda menunjukkan $<0,05$

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa 100% tikus pada kelompok kontrol negatif memiliki gambaran hepar yang normal tanpa fibrosis (F0) dan 100% tikus kelompok kontrol positif (CCl₄) memiliki gambaran fibrosis derajat 3 (F3) atau fibrosis portal dengan banyak septa. Gambaran fibrosis pada kelompok tikus yang diberikan teripang pasir 75mg/200gBB, menunjukkan fibrosis derajat 1, 2, dan 3 masing-masing sebesar 14%, 72%, dan 14%. Analisa fibrosis pada kelompok tikus yang diberikan teripang pasir 100mg/200gBB, menunjukkan fibrosis derajat 1, dan 2, masing-masing sebesar 57% dan 43%, serta tidak dijumpai

fibrosis derajat 3. Uji Kruskal-Wallis menunjukkan perbedaan derajat fibrosis yang signifikan antar keempat kelompok penelitian ($p=0,000$). Uji *post hoc* Mann-whitney menunjukkan bahwa derajat fibrosis kelompok kontrol induksi CCl₄ berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan yang diberikan teripang pasir 75 dan 100mg/200gBB, namun perbedaan antara kedua kelompok perlakuan tidak signifikan ($p=0,081$).

Gambar 1. Gambaran fibrosis jaringan hepar tikus pada keempat kelompok penelitian

Keterangan :

- dengan pewarnaan Mallory (100x) menunjukkan tidak ada pembesaran traktus portal dan septa pada jaringan hepar tikus kelompok kontrol *vehicle* (minyak zaitun) (F0)
- dengan pewarnaan Mallory (100x) menunjukkan fibrosis portal dengan banyak septa atau jaringan fibrosa yang menghubungkan traktus portal (*bridging fibrosis*) pada jaringan hepar tikus kelompok kontrol CCl₄ (CCl₄ 10% dalam minyak zaitun) (F3).
- dengan pewarnaan Mallory (100x) menunjukkan fibrosis portal dengan sedikit septa atau jaringan fibrosa di sekitar traktus portal pada jaringan hepar tikus kelompok perlakuan 1 (induksi CCl₄ dan Teripang pasir 75 mg/200gBB) (F2)
- dengan pewarnaan Mallory (100x) menunjukkan fibrosis portal pada jaringan hepar tikus kelompok perlakuan 2 (induksi CCl₄ dan Teripang pasir 100 mg/200gBB) (F1).

DISKUSI

Fibrosis hepar merupakan akumulasi matriks ekstraseluler sebagai respon terhadap berbagai stimulus dan menyebabkan berbagai kelainan fungsi hepar serta aliran darah. Pada penelitian ini, fibrosis hepar yang terjadi merupakan respon akibat induksi senyawa CCl₄, dimana metabolit senyawa ini, yaitu radikal bebas triklorometil (CCl₃) dan triklorometilperoksil (CCl₃O₂), menstimulasi nekrosis sel hepar dan fibrogenesis melalui aktivasi HSC (*Hepatic Stem Cell*). Analisa derajat fibrosis pada kelompok tikus yang diinduksi CCl₄ (kelompok kontrol positif) memberikan hasil fibrosis pada seluruh sampel tikus. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa fibrosis dapat dijumpai pada 4 hingga 6 minggu setelah induksi dengan CCl₄ 0,4-2ml/kgBB sebanyak 2-3 kali dalam seminggu (19).

Fibrosis derajat 3 (F3) yang dijumpai pada semua tikus kelompok kontrol positif, mengindikasikan bahwa kemungkinan bias karena resolusi spontan tidak terjadi, meski analisa dilakukan pada akhir minggu ke-8 atau 3 minggu setelah induksi CCl₄ dihentikan. Hal serupa juga

dibuktikan oleh Domitrovic, *et al* (20). Analisa fibrosis pada seluruh sampel tikus kelompok kontrol positif menunjukkan derajat 3 (F3) atau fibrosis portal dengan banyak septa. Hal serupa juga diamati pada penelitian lain yang menggunakan senyawa CCl₄ selama 4 minggu dan 6 minggu (20-22). Sementara itu, seratus persen tikus pada kelompok kontrol negatif tidak menunjukkan adanya gambaran fibrosis (F0). Hal ini membuktikan bahwa minyak zaitun sebagai pelarut CCl₄ tidak berpengaruh terhadap fibrogenesis.

Uji Kruskal-wallis yang membandingkan frekuensi derajat fibrosis pada keempat kelompok penelitian, menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p=0,000$). Uji Mann-whitney menunjukkan bahwa derajat fibrosis kelompok kontrol induksi CCl₄ berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan yang diberikan teripang pasir 75 dan 100mg/200gBB. Hal tersebut membuktikan bahwa ekstrak teripang pasir dapat memperbaiki fibrosis hepar yang diinduksi CCl₄. Mekanisme yang diduga mendasari proses ini adalah aktivitas antioksidan dan antiinflamasi dari senyawa yang terkandung dalam ekstrak teripang pasir. Diantaranya vitamin C, E, polifenol, karotenoid, flavonoid, khondroitin sulfat, DHA dan EPA (9-15). Hal tersebut didukung oleh penelitian Wafa *et al*, yang menunjukkan bahwa ekstrak teripang pasir memiliki aktivitas antioksidan sedang, yang ditunjukkan dengan kemampuan ekstrak dalam menghambat radikal bebas sebesar 79,82% (23). Senyawa antioksidan yang terkandung dalam ekstrak teripang pasir diduga menetralkan radikal bebas yang terbentuk dari metabolisme senyawa CCl₄. Akibatnya radikal bebas tidak menstimulasi aktivasi HSC, yang berperan sebagai kunci mekanisme fibrogenesis. Stimulus lain yang dapat mengaktifkan HSC adalah sitokin dan mediator inflamasi yang dilepaskan oleh sel hepar, sel endotel sinusoidal, sel T, sel sel NK (*Natural Killer*), serta sel Kupffer (24-25). Adanya kandungan senyawa antiinflamasi dalam teripang pasir dapat menghambat respon inflamasi yang bersifat fibrogenik.

Perbedaan derajat fibrosis antara kedua kelompok perlakuan tidak signifikan ($p= 0,081$), namun demikian, frekuensi fibrosis derajat 1 pada kelompok perlakuan 2 yang diberikan teripang pasir 100mg/200gBB, lebih banyak dibandingkan kelompok perlakuan 1 yang diberikan teripang pasir 75mg/200gBB (57% vs 14%). Hasil ini menandakan terjadinya proses regresi pada jaringan hepar yang diinduksi fibrosis, karena tidak dijumpai fibrosis derajat 3 pada tikus kelompok perlakuan 2 setelah pemberian ekstrak teripang pasir selama 4 minggu sejak minggu ke-5 hingga 8.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak teripang pasir dosis 75mg/kgBB dan 100mg/kgBB dapat memperbaiki fibrosis hepar pada tikus yang diinduksi senyawa CCl₄, dengan aktivitas antifibrotik dosis 100mg/kgBB lebih baik dari dosis 75mg/kgBB. Namun demikian hasil penelitian ini perlu dikonfirmasi dengan parameter lain, diantaranya fungsi hepar (SGOT, SGPT, ALP), indikator stress oksidatif (aktivitas SOD, GSH), sintesis kolagen (kadar hidroksiprolin), aktivasi sel HSC (ekspresi GFAP, α -SMA), serta aktivitas degradasi matriks ekstraseluler (konsentrasi MMP dan TIMP).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan penulis kepada Lembaga Penelitian Universitas Mataram yang telah mendanai

penelitian ini dari dana DIPA BLU (PNBP) 2015, dan Laboratorium Terpadu FK UNRAM, serta Laboratorium

Patologi Anatomi FK UGM yang telah membantu kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Butt AA, Yan P, Lo RV, et al. *Liver Fibrosis Progression in Hepatitis C Virus Infection after Seroconversion*. Journal of the American Medical Association Internal Medicine. 2015; 175(2): 178-185.
2. Wong GL, Chan HL, Yu Z, Chan HY, Tse CH, and Wong VW. *Liver Fibrosis Progression in Chronic Hepatitis B Patients Positive for Hepatitis B eAntigen: A Prospective Cohort Study with Paired Transient Elastography Examination*. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2013; 28(11): 1762-1769.
3. Ponomarenko Y, Leo MA, Kroll W, and Lieber CS. *Effects of Alcohol Consumption on Eight Circulating Markers of Liver Fibrosis*. Alcohol and Alcoholism. 2002; 37(3): 252-255.
4. Pandit A, Sachdeva T, and Bafna P. *Drug-Induced Hepatotoxicity : A Review*. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2012; 2(5): 233-243.
5. Angulo P, Keach JC, Batts KP, and Lindor KD. *Independent Predictors of Liver Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis*. Hepatology. 1999; 30(6): 1356-1362.
6. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, et al. *Hepatic Stellate Cell Apoptosis and Reduced Hepatic Expression of Metalloproteinase Inhibitors*. The Journal of Clinical Investigation. 1998; 102(3): 538-549.
7. Nikolaidis N, Kountouras J, Gioulema O, et al. *Colchicine Treatment of Liver Fibrosis*. Hepatogastroenterology. 2006; 53(68): 281-285.
8. Ezhilarasan D, Sokal E, Karthikeyan S, and Najimi M. *Plant Derived Antioxidants and Antifibrotic Drugs: Past, Present and Future*. Journal of Coastal Life Medicine. 2014; 2(9): 738-745.
9. Bordbar S, Anwar F, and Saari N. *High-Value Components and Bioactives from Sea Cucumbers for Functional Foods- A Review*. Marine Drugs. 2011; 9(10): 1761-1805.
10. Okorie OE, Ko SH, Go S, et al. *Preliminary Study of the Optimum Dietary Ascorbic Acid Level in Sea Cucumber, Apostichopus japonicus (Selenka)*. Journal of the World Aquaculture Society. 2008; 39(6): 758-765.
11. Mamelona J, Pelletier E, Girard-Lalancete K, Legault J, Karboune S, and Kermasha S. *Quantification of Phenolic Contents and Antioxidant Capacity of Atlantic Sea Cucumber, Cucumaria frondosa*. Food Chemistry. 2007; 104(3): 1040-1047.
12. Althunibat OY, Hashim RB, Taher M, Daud JM, Ikeda MA, and Zali B. *In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Three Malaysian Sea Cucumber Species*. European Journal of Scientific Research. 2009; 37(3): 376-387.
13. Ha BJ and Lee JY. *The Effect of Chondroitin Sulfate against CCl4-Induced Hepatotoxicity*. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2003; 26(5): 622-626.
14. Fredalina BD, Ridwan BH, Abidin AA, et al. *Fatty Acid Compositions in Local Sea Cucumber, Stichopus chloronotus, for Wound Healing*. General Pharmacology: The Vascular System. 1999; 33(4): 337-340.
15. Wang J, Wang Y, Tang Q, et al. *Antioxidant Activities of Low Molecular Weight Gelatin Hydrolysate Isolated from the Sea Cucumber Stichopus japonicus*. Journal of Ocean University of China. 2010; 9(1): 94-98.
16. Nurhidayati. *Efek Protektif Teripang Pasir (Holothuria scabra) terhadap Hepatotoksistas yang Diinduksi Karbon Tetraklorida (CCl4)*. [Tesis]. Universitas Airlangga, Surabaya. 2009.
17. Jang JH, Kang KJ, Kim YH, Kang YN and Lee IS. *Reevaluation of Experimental Model of Hepatic Fibrosis Induced by Hepatotoxic Drugs: An Easy, Applicable, and Reproducible Model*. Transplantation Proceedings. 2008; 40(8): 2700-2703.
18. Bedossa P. *Intraobserver & Interobserver Variations in Liver Biopsy Interpretation in Patients with Chronic Hepatitis C*. Hepatology. 1994; 20(1): 15-20.
19. Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, et al. *Experimental Liver Fibrosis Research: Update on Animal Models, Legal Issues and Translational Aspects*. Fibrogenesis Tissue Repair. 2013; 6(1): 1-25.
20. Domitrovic R, Jakovac H, Tomac J, and Sain I. *Liver Fibrosis in Mice Induced by Carbon Tetrachloride and its Reversion by Luteolin*. Toxicology and Applied Pharmacology. 2009; 241(3): 311-321.
21. Lee GP, Jeong WI, Jeong DH, Do SH, Kim TH, and Jeong KS. *Diagnostic Evaluation of Carbon Tetrachloride-induced Rat Hepatic Cirrhosis Model*. Anticancer Research. 2005; 25(2A): 1029-1038.
22. Mogler C, Wieland M, Konig C, et al. *Hepatic Stellate Cell-Expressed Endosialin Balances Fibrogenesis and Hepatocyte Proliferation during Liver Damage*. EMBO Molecular Medicine. 2015; 7(3): 332-338.
23. Wafa JA, Adi TK, Hanapi A, dan Fasya AG *Penentuan Kapasitas Antioksidan dan Kandungan Fenolik Total Ekstrak Kasar Teripang pasir (Holothuria scabra) dari Pantai Kenjeran Surabaya*. ALCHEMY. 2014; 3(1): 76-83.
24. Bataller R and Brenner DA. *Liver Fibrosis*. The journal of Clinical Investigation. 2005; 115(2): 209-218.
25. Casini A, Ceni E, Salzano R, et al. *Neutrophil-Derived Superoxide Anion Induces Lipid Peroxidation and Stimulates Collagen Synthesis in Human Hepatic Stellate Cells: Role of Nitric Oxide*. Hepatology. 1997; 25(2): 361-367.