



University Medical Center Groningen

University of Groningen

Osteoprotegerin in Fibrotic Disorders

Adhyatmika, A.

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2018

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Adhyatmika, A. (2018). Osteoprotegerin in Fibrotic Disorders. [Groningen]: University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Addendums

SUMMARY

SAMENVATTING

RINGKASAN

ACKNOWLEDGEMENTS

SUMMARY

Osteoprotegerin in Fibrotic Disorders

Fibrosis is a serious problem associated with tissue injury or chronic inflammation and is characterized by excessive deposition of scar tissue that will eventually impede tissue function. In the liver, fibrosis can be triggered by excessive consumption of alcohol or fatty foods, chronic exposure to drugs, and systemic infections with bacteria or viruses. Clinically, fibrosis is marked by having more cells producing scar tissue constituents such as collagens and fibronectin. These cells are called myofibroblasts and can be identified by the presence of smooth muscle actin (α SMA), which is upregulated by the master regulator of fibrosis, i.e. transforming growth factor beta (TGF β). The diagnosis of liver fibrosis is complicated by the fact that early stages of the disease are rarely noticed and patients are only identified when liver function is failing. In addition, reliable markers to diagnose the disease early or to evaluate treatment effects are not available.

Recently, serum levels of tumor necrosis factor receptor superfamily 11B (TNFRSF11B), also known as the decoy receptor osteoprotegerin (OPG), were added to a panel of serum markers that have some potential in diagnosing liver fibrosis (CoopScore[®]). Moreover, a few studies have shown possible profibrotic activities of OPG, especially through interaction with its ligands receptor activator of nuclear activator kappa-B ligand (RANKL) and tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). However, why OPG is produced during liver fibrosis and what its function could be in liver tissue is unknown. We therefore set out to elucidate why OPG is produced during fibrosis and by which tissues and what its biological activity is in human and mouse livers during the development and resolution of liver fibrosis.

In **chapter 2** we describe that in human cirrhotic livers, OPG is expressed locally at the site of fibrotic scars, colocalizing with cells that highly express α SMA, i.e. myofibroblasts. Cirrhotic liver tissue lysate contained more OPG when compared to control liver tissue lysate. These findings were also found in a mouse model of CCl₄-induced liver fibrosis, in which OPG levels were higher in serum and tissue lysate of fibrotic livers compared to control and were localized in the scar tissue areas of the liver. Interestingly, we also found that this higher OPG expression after CCl₄ treatment can decrease again after a wash out period of the CCl₄ treatment as well as after treatment with IFN γ , and this was accompanied by a reduction in the amount of scar tissue, confirming resolution

of fibrosis. This makes OPG a potential biomarker in studies investigating new drug candidates against liver fibrosis, which is of major interest as drug development is hampered by the lack of biomarkers to evaluate efficacy of potential treatments.

One of the most interesting findings described in **chapter 2** is a close relationship between OPG and master regulator of fibrosis, TGF β 1. We found that TGF β 1 is responsible for the higher expression of OPG in fibrotic processes and, interestingly, that incubation of liver slices with OPG induced higher expression of procollagen 1 α 1, α SMA, fibronectin 2, and TGF β 1 mRNA itself. We investigated the mechanism behind this effect and hypothesized that OPG may be influencing fibrosis development through neutralization of its ligands RANKL and TRAIL. However, using neutralizing antibodies against RANKL and TRAIL we could not replicate these profibrotic effects of OPG, suggesting other mechanisms may be at play. Interestingly, the profibrotic activity of OPG could be blocked fully by galunisertib, a TGF β receptor kinase inhibitor, indicating that TGF β is essential for this activity. Our studies did hint at a possible role for RANKL in liver tissue, namely promoting liver regeneration, though the exact target cells for this effect remain to be found. We hypothesize that in addition to being profibrotic, OPG may have further detrimental effects during fibrogenesis by neutralizing liver regeneration by RANKL.

In **chapter 5** we further investigated this relationship between OPG and TGF β 1, because we hypothesized there must also be brakes in this feed-forward loop. We therefore investigated the potential involvement of microRNAs, biological brakes that cells can use to limit expression of certain factors. We found that contrary to what we found for fibroblasts, OPG expression was inhibited in myofibroblasts upon treatment with TGF β 1, while microRNA-145-5p (miR-145-5p) was concomitantly upregulated. We showed that transfection of miR-145-5p into liver myofibroblasts could partly lower OPG production by these cells, indicating that miR-145-5p is one of the brakes in this profibrotic feed-forward mechanism between TGF β 1 and OPG. However, we could not show that inhibition of miR-145-5p could increase OPG production. Therefore, we speculate that in our system, miR-145-5p can downregulate OPG production but that other miRNAs play a role as well.

TGF β appears to be the central regulator connected to OPG during liver fibrogenesis. In addition to the profibrotic activity of OPG being TGF β -dependent, in **chapter 4** we also show that OPG production can be induced by IL13 through TGF β upregulation/activation. IL13-induced OPG production was blocked by galunisertib, STAT6 inhibition, and AP1 inhibition indicating that

both IL13 receptors and TGF β are required for the induction of OPG by IL13. In contrast to IL13, other cytokines associated with fibrosis, such as IL1 β and PDGF-BB could not induce OPG expression. These findings also indicates that the higher OPG expression during liver fibrosis is not related to inflammation (IL1 β) or to induction of fibroblast proliferation (PDGF-BB), even though these cytokines are upregulated during fibrogenesis.

As TGF β and OPG expression are closely linked in liver tissue, we also investigated if OPG could be produced by other organs under the influence of TGF β . We used precision-cut tissue slices of mouse liver, lung, kidney, and colon, with treatment with TGF β 1 to induce fibrosis in vitro. As discussed in **chapter 3**, OPG protein expression by the organ slices was indeed also higher upon TGF β 1 treatment when compared to untreated controls. This was also accompanied by higher expression of fibrotic-associated markers in all organs although for colon this was not as convincing as for liver, lung, and kidney.

In conclusion, we propose OPG as a novel potential target for liver fibrosis treatment. A deeper and broader understanding of the possible profibrotic mechanisms of OPG will be essential to develop it further as a target for antifibrotic therapy. Its role in bone protection is unequivocal and must be taken into account when considering it as a target for therapy. Further research should also focus on the RANKL/OPG balance. The role of RANKL in liver tissue is understudied, but potentially interesting as it may stimulate regeneration of liver tissue. The work presented in these thesis has shown that the activity spectrum of OPG and RANKL is far wider than just modulating bone matrix and has also shown exciting new avenues to treat and diagnose liver fibrosis and possibly to stimulate liver regeneration.

SAMENVATTING

Osteoprotegerin in Fibrotische Aandoeningen

Fibrose is een ernstig bijkomend probleem bij schade aan weefsels of chronische ontstekingen, en kenmerkt zich door overmatige vorming van littekenweefsel waardoor uiteindelijk de functies van een weefsel belemmerd kunnen worden. In de lever kan fibrose ontstaan door overmatige consumptie van alcohol of vet voedsel, medicatie en infecties met bacteriën en virussen. Klinisch wordt fibrose gekenmerkt door de overmatige aanwezigheid van cellen die littekenweefsel, zoals collageen en fibronectine, kunnen produceren. Deze cellen worden myofibroblasten genoemd en kenmerken zich door de aanwezigheid van het eiwit alpha smooth muscle actin (α SMA). Dit eiwit wordt door deze cellen gevormd na blootstelling aan de belangrijkste aanjager van fibrose, namelijk het eiwit transforming growth factor beta (TGF β). De diagnose van leverfibrose is moeilijk, doordat vroege stadia van de ziekte zelden worden opgemerkt en de ziekte alleen wordt gevonden wanneer de leverfunctie faalt. Bovendien zijn er weinig tot geen betrouwbare merkers om vroege stadia van de ziekte op te sporen of om het effect van behandelingen te evalueren.

Onlangs werd gesuggereerd dat het eiwit tumor necrosis factor receptor superfamily 11B (TNFRSF11B), ook wel bekend als osteoprotegerin (OPG) een merker voor leverfibrose zou kunnen zijn. Er was namelijk gevonden dat de hoeveelheid van dit eiwit in bloed in combinatie met een aantal andere bloedmerkers, de mate van gevorderde leverfibrose bij iemand kan voorspellen.. Daarbij hebben enkele andere onderzoeken aangetoond dat OPG betrokken zou kunnen zijn bij het stimuleren van de aanmaak van littekenweefsel, mogelijk omdat het kan binden aan de receptor-activator of nuclear activator kappa-B ligand (RANKL) en tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Waarom OPG wordt aangemaakt tijdens leverfibrose en wat de functie ervan zou kunnen zijn in de lever is echter onbekend. Daarom hebben we in dit proefschrift onderzocht door welke (fibrotische) weefsels OPG wordt gemaakt, onder invloed van welke factoren, en wat het eigenlijk doet in mensen- en muizenlevers tijdens het ontstaan en het oplossen van fibrose.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we dat in menselijke cirrhotische levers OPG wordt aangemaakt daar waar zich fibrotische littekens bevinden. Deze aanmaak valt samen met cellen die veel α SMA hebben, te weten de myofibroblasten. Cirrhotische levers bleken meer OPG aan te maken dan gezonde controlelevers.

Dit werd ook gevonden in een muismodel voor leverfibrose. De levers en het bloedserum van muizen met leverfibrose hadden meer OPG dan levers en bloedserum van gezonde controlemuizen. Wederom werd OPG voornamelijk gevonden in littekenweefsel. Interessant genoeg bleek dat wanneer de muizen herstelden van leverfibrose de hoeveelheid OPG in de lever en in het bloedserum ook gelijk minder werd. Deze bevindingen laten zien dat OPG een potentiële biomarker zou kunnen zijn voor het inschatten of een geneesmiddel werkt of niet. Dit is van groot belang omdat de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen fibrose ernstig last heeft van een gebrek aan biomarkers die de werkzaamheid van mogelijke behandelingen kunnen volgen.

Een van de meest interessante resultaten, beschreven in **hoofdstuk 2**, is de nauwe relatie tussen OPG en de belangrijkste regelaar van fibrose, TGF β 1. We vonden dat TGF β 1 verantwoordelijk is voor de hogere expressie van OPG in fibrose en dat, interessant genoeg, OPG zelf ook bijdraagt aan de aanmaak van littekenweefsel en TGF β 1. We hebben het mechanisme achter dit effect onderzocht met de hypothese dat OPG de ontwikkeling van fibrose kan beïnvloeden doordat het RANKL en/of TRAIL aan zich kan binden. Het profibrotische effect van OPG bleek echter niet via het binden van RANKL en/of TRAIL te gaan, maar hoe wel is nog een openstaande vraag. Het is in ieder geval duidelijk geworden dat TGF β 1 heel belangrijk is voor het profibrotische effect van OPG, want als TGF β 1 werd geremd was OPG niet meer profibrotisch. Onze studies met RANKL hebben wel laten zien dat RANKL in de lever wellicht belangrijk is voor de aanmaak van nieuwe levercellen. En omdat OPG, RANKL aan zich kan binden en zo onwerkzaam kan maken, heeft OPG wellicht op die manier een negatieve invloed op herstel van leverweefsel.

In **hoofdstuk 5** hebben we dit verband tussen OPG en TGF β 1 verder onderzocht, omdat wij vermoedden dat er ook een rem ergens in het systeem zou moeten zitten. We onderzochten daarom de mogelijke betrokkenheid van microRNA's, een soort van biologische rem die cellen kunnen gebruiken om de aanmaak van bepaalde factoren te beperken. We vonden dat de OPG-aanmaak werd geremd in myofibroblasten na behandeling met TGF β 1, terwijl de aanmaak van microRNA-145-5p (miR-145-5p) gelijktijdig omhoog ging; dit in tegenstelling tot wat we vonden voor fibroblasten waar blootstelling aan TGF β 1 leidde tot meer OPG productie. Verder onderzoek liet zien dat we de OPG-productie in myofibroblasten gedeeltelijk konden remmen met een kunstmatig toegevoegde miR-145-5p. Dit geeft aan dat miR-145-5p één mogelijke rem is op de OPG-productie, maar niet de enige. We hebben ook geprobeerd miR-145-5p te remmen om te zien of we dan OPG-productie weer konden herstellen, maar dit bleek niet te werken. Daarom denken we dat miR-145-5p

weliswaar OPG-productie kan remmen, maar dat andere miRNA's ook een rol spelen.

TGF β 1 lijkt de centrale spil te zijn die verbonden is met OPG tijdens leverfibrogenese. Naast de profibrotische activiteit van OPG die TGF β -afhankelijk is, laten we in **hoofdstuk 4** zien dat OPG-aanmaak ook optreedt na blootstelling aan IL13. We hebben verschillende soorten eiwitten bekeken die allemaal of bij fibrose of bij ontsteking betrokken zijn. Alleen TGF β 1 en IL-13, beide belangrijk tijdens fibrose, konden OPG-aanmaak stimuleren. Via een aantal ingewikkelde signaalroutes in de cel, zet IL-13 cellen aan tot de aanmaak van TGF β 1, waardoor de aanmaak van OPG weer wordt aangezet. Dus ook hier is TGF β 1 indirect weer heel belangrijk bij OPG-aanmaak.

Omdat TGF β -en OPG-aanmaak nauw verbonden zijn in leverweefsel, hebben we ook onderzocht of OPG in andere organen wordt aangemaakt onder invloed van TGF β . Hiervoor gebruikten we weefselplakjes van muizenlever, long, nier en dikke darm, en behandelden deze met TGF β 1 om fibrose te veroorzaken. Zoals besproken in **hoofdstuk 3**, was de OPG-aanmaak in alle organen inderdaad hoger na TGF β 1-behandeling in vergelijking met onbehandelde controles, hoewel dit voor de dikke darm niet zo overtuigend was als voor lever, long en nier.

Tot slot willen wij voorstellen dat OPG een nieuw potentieel aangrijpingspunt voor de behandeling van leverfibrose zou kunnen zijn. Een dieper en breder begrip van hoe OPG bijdraagt aan fibrose is belangrijk om het verder te kunnen ontwikkelen als een aangrijpingspunt voor antifibrotische medicijnen. Verder onderzoek zou zich ook moeten richten op de balans tussen RANKL en OPG in de lever. De rol van RANKL in leverweefsel is weinig onderzocht, maar potentieel interessant omdat het herstel van leverweefsel kan stimuleren. Het werk gepresenteerd in dit proefschrift laat zien dat er nieuwe interessante mogelijkheden zijn om leverfibrose aan te tonen en te behandelen en mogelijk leverherstel te stimuleren.

RINGKASAN

Osteoprotegerin pada Penyakit Fibrosis

Fibrosis merupakan masalah serius berkaitan dengan kerusakan jaringan atau inflamasi kronis, yang ditandai dengan deposisi jaringan parut yang berlebihan yang kemudian dapat mempengaruhi fungsi jaringan tersebut. Di hati, fibrosis dapat diinisiasi oleh konsumsi alkohol dan lemak yang berlebihan, penggunaan obat jangka panjang, dan infeksi sistemik oleh bakteri atau virus. Secara klinis, fibrosis ditandai dengan berlebuhnya pembentukan sel yang memproduksi komposisi jaringan parut seperti kolagen dan fibronektin. Sel-sel ini disebut dengan myofibroblas dan dapat diidentifikasi dari keberadaan *smooth muscle actin alpha* (α SMA), yang dapat di-upregulasi oleh regulator utama dari fibrosis, seperti *transforming growth factor beta* (TGF β). Diagnosa dari fibrosis liver sangat sulit karena kesadaran akan timbulnya penyakit pada tahap awal sangat jarang terjadi, dan akhirnya disadari saat pasien sudah mengalami kegagalan hati. Parameter terpercaya yang dapat digunakan sebagai penanda awal terjadinya penyakit untuk kemudian dilakukan pengobatan sedini mungkin belum tersedia.

Terkini, level dari *tumor necrosis factor receptor superfamily 11B* (TNFRSF11B), atau lebih dikenal dengan osteoprotegerin (OPG), dilaporkan memiliki potensi dalam meningkatkan akurasi diagnosa fibrosis hati bila dimasukkan ke dalam panel bersama parameter lain yang telah diketahui (Coopscore[®]). Selain itu, beberapa studi menunjukkan potensi aktivitas profibrotik dari OPG, khususnya melalui interaksinya dengan ligan-ligan yang telah diketahui, yaitu *receptor activator of nuclear activator kappa-B ligand* (RANKL) dan *tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL). Namun, pengetahuan tentang mengapa OPG diproduksi dan fungsinya pada jaringan hati belum diketahui. Oleh karena itu, pada penelitian ini, kami mempelajari bagaimana OPG diproduksi saat fibrosis dan pada jaringan mana serta apakah fungsi biologisnya pada hati manusia dan mencit pada fase perburukan dan penyembuhan fibrosis.

Pada **bab 2** kami menjelaskan bahwa pada hati manusia yang mengalami sirosis, OPG diekspresikan secara lokal pada jaringan parut, berdampingan dengan sel-sel yang memproduksi α SMA pada kadar yang tinggi, misalnya myofibroblas. Pada lisat dari jaringan hati yang mengalami sirosis terkandung OPG yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan lisat dari jaringan kontrol. Hasil yang sama juga diperoleh dari eksperimen pada mencit dengan menggunakan model fibrosis

hati terinduksi karbon tetraklorida, dimana level OPG lebih tinggi pada serum dan lisat hati bila dibandingkan dengan mencit kontrol, serta juga terlokalisasi pada area jaringan parut. Menariknya, kami juga menemukan bahwa level ekspresi OPG yang tinggi ini dapat menurun lagi setelah melalui masa wash out (tanpa perlakuan karbon tetraklorida) serta perlakuan bersama dengan IFN γ , bersamaan dengan berkurangnya jaringan parut yang mengkonfirmasi proses perbaikan jaringan. Dengan hasil ini, maka OPG merupakan biomarker baru yang potensial untuk digunakan sebagai parameter dalam pengembangan kandidat obat baru, yang merupakan topik menarik disebabkan belum adanya marker yang potensial untuk mengisi fungsi tersebut.

Satu hal lain yang paling menarik yang dijelaskan pada **bab 2** adalah hubungan yang dekat antara OPG dengan regulator utama dari fibrosis hati, TGF β 1. Kami menemukan bahwa TGF β 1 bertanggung jawab pada peningkatan ekspresi OPG pada keadaan fibrosis, dan menariknya, inkubasi jaringan hati dengan OPG menginduksi ekspresi mRNA dari procollagen 1 α 1, α SMA, fibronectin 2, dan TGF β 1 itu sendiri. Kami melakukan investigasi pada mekanisme dibalik efek ini dan berhipotesis bahwa OPG mungkin mempengaruhi perkembangan fibrosis melalui netralisasi dari ligan-ligannya, yaitu RANKL dan TRAIL. Namun, dengan menggunakan netralisasi antibodi RANKL dan TRAIL, kami tidak dapat meniru aktivitas profibrotik dari OPG, menunjukkan bahwa mekanisme lain lebih berpengaruh. Menariknya, aktivitas profibrotik dari OPG dapat dihambat sepenuhnya oleh galunisertib, sebuah inhibitor dari TGF β receptor kinase, mengindikasikan bahwa TGF β esensial dalam aktivitas ini. Studi kami juga menunjukkan aktivitas RANKL pada jaringan hati yaitu meningkatkan regenerasi hati, namun sel mana yang secara langsung terpengaruh masih perlu diteliti lebih lanjut. Kami berhipotesis bahwa selain bersifat profibrotik, OPG juga dapat menghambat regenerasi hati dengan menghambat aktivitas RANKL.

Pada **bab 5** kami meneliti lebih lanjut hubungan antara OPG dengan TGF β 1, karena kami menghipotesiskan bahwa seharusnya ada mekanisme penahan untuk hubungan saling menginduksi antara OPG dan TGF β 1 ini. Oleh karena itu, kami meneliti kemungkinan keterlibatan mikroRNA, kontrol biologis oleh sel yang banya digunakan untuk membatasi ekspresi dari faktor-faktor tertentu. Kami menemukan bahwa berlawanan dari apa yang telah kami temukan sebelumnya pada fibroblast, ekspresi OPG ternyata justru dihambat pada myofibroblas dengan adanya adanya perlakuan TGF β 1, dimana mikroRNA mir-145-5p ternyata mengalami upregulasi. Selanjutnya kami menemukan bahwa paparan miR-145-5p ini pada myofibroblas juga dapat menghambat produksi OPG oleh sel-sel ini, mengindikasikan bahwa miR-145-5p merupakan salah satu kontrol rem pada mekanisme saling menginduksinya OPG dan TGF β 1. Namun,

kami tidak berhasil menunjukkan bahwa menghambat miR-145-5p dapat meningkatkan ekspresi OPG. Oleh karena itu, kami berspekulasi bahwa pada sistem ini, miR-145-5p dapat menghambat produksi OPG namun masih ada mikroRNA lain yang memiliki peran yang sama.

TGF β terbukti sebagai regulator utama yang berhubungan dengan OPG pada fibrogenesis hati. Tidak hanya bahwa aktivitas profibrotik OPG yang bergantung pada TGF β , pada **bab 4** kami menunjukkan bahwa produksi OPG dapat diinduksi oleh IL13 melalui upregulasi/aktivasi TGF β . OPG yang terinduksi IL13 juga dapat dihambat oleh galunisertib, serta blokade pada STAT6 dan AP1, mengindikasikan bahwa kedua reseptor IL13 dan TGF β dibutuhkan dalam induksi OPG oleh IL13. Sebaliknya, untuk sitokin-sitokin lain yang berhubungan dengan fibrosis, seperti IL1 β dan PDGF-BB tidak dapat menginduksi ekspresi OPG. Temuan ini juga mengindikasikan bahwa peningkatan produksi OPG tidak terkait dengan inflamasi (IL1 β) atau peningkatan proliferasi fibroblast (PDGF-BB), meskipun sitokin-sitokin ini juga mengalami upregulasi pada saat fibrogenesis.

Karena ekspresi dari TGF β dan OPG berhubungan erat pada jaringan hati, kami juga meneliti apakah OPG dapat diproduksi oleh organ yang lain dengan paparan TGF β 1. Kami menggunakan irisan presisi jaringan dari hati, paru, ginjal, dan colon mencit dengan paparan TGF β 1 untuk menginduksi fibrosis *in vitro*. Seperti didiskusikan pada **bab 3**, ekspresi protein OPG oleh irisan organ-organ tersebut lebih tinggi pada paparan TGF β 1 dibandingkan dengan kontrol tanpa paparan. Hal ini juga diikuti oleh lebih tingginya ekspresi dari parameter-parameter fibrosis lain pada semua organ, meskipun untuk colon tidak sekuat pada hati, paru, dan ginjal.

Pada kesimpulannya, kami mengusulkan OPG sebagai target potensial baru untuk pengobatan fibrosis hati. Pemahaman yang lebih mendalam dan luas akan kemungkinan mekanisme profibrotik dari OPG sangat diperlukan untuk mengembangkan lebih lanjut sebagai target pada terapi fibrosis. Peran OPG pada perlindungan tulang tetap merupakan hal yang penting dan harus diperhatikan dalam pertimbangannya sebagai target terapi. Penelitian lebih lanjut sebaiknya difokuskan pada keseimbangan antara OPG dan RANKL. Peran RANKL pada jaringan hati saat ini sedang dalam penelitian, namun berpotensi menjadi topik yang menarik berkaitan perannya dalam regenerasi jaringan hati. Hasil yang dipresentasikan dalam thesis ini telah menunjukkan bahwa lingkup aktivitas dari OPG maupun RANKL lebih luas dari hanya pada modulasi matriks tulang dan telah menunjukkan bukti-bukti baru dalam kaitannya pada usaha pengobatan dan diagnosa fibrosis hati dan kemungkinan dalam regenerasi hati.

