

Hepatik fibrozda hücre dışı matriks oluşumunda karaciğer yıldız hücreleri ve moleküler mekanizmalar

Dr. Ethem Murat ARSAVA, Dr. Ayşegül AKBAY

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara



Dr. Ethem Murat ARSAVA



Dr. Ayşegül AKBAY

Karaciğer fibrozu intersitisyel kollajen ve hücre dışı matriks elemanlarının birikimi ile karakterize, karaciğerin paraziter, Hepatit B ve C gibi viral, otoimmün kronik aktif hepatit gibi immünolojik ve alkol, demir, bakır gibi toksik etkenlere maruz kalması sonrası meydana gelen patolojik bir olaydır. Göstermiş olduğu yüksek prevalans ve sebep olduğu yüksek morbidite ve mortalite nedeniyle olayın patofizyolojisi birçok araştırmacı tarafından açıklanmaya çalışılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda hepatic fibrozun oluşumunda karaciğer yıldız hücrelerinin (ito hücreleri, liposit, peri veya para sinüzoidal hücre, yağ-

depolayıcı hücre) merkezi bir rol oynadığı anlaşılmıştır (1). Çeşitli mekanizmalar sonucu yıldız hücreleri, inaktif retinoid depolayan fenotiplerinden, aktif myofibroblast benzeri hücre fenotipine dönüşmekte ve bu aktif hücre de artmış matriks sentezine sebep olmaktadır (2). Bu etkiyle beraber yıldız hücrelerinin matriks proteinlerinin yıkımında önemli rol oynayan matriks mettalloproteinazlarını inhibe edici faktörler ürettiği de gösterilmiştir (3). Matriks sentezinde artışın ve matriks yıkımında azalmanın net sonucu olarak karaciğerde fibroz ortaya çıkmakta ve bu da progresif olarak siroz oluşturmaktadır.

Normal karaciğerde hücre dışı matriks üretiminin büyük bir bölümü yıldız hücreleri, sinüzoidal endotelial hücreler ve safra kanalikülü epitel hücreleri tarafından gerçekleştirilir.

HÜCRE DİŞİ MATRİKS BİLEŞENLERİ VE HÜCRESEL KAYNAKLARI

Normal karaciğer dokusunda, hücre dışı matrix, karaciğer kapsülü, portal alan, Disse boşluğu ve santral ven çevresinde belirgin miktarda bulunmaktadır (4). Kollajenler (tip I, III, IV, V, VI), non kollajen glikoproteinler (fibronectin, laminin, entaktin, tenasin, undulin) ve proteoglikanlar (perlekan, syndekan, dekorin) hücre dışı matriksin ana bileşenlerini oluşturmaktadır (2) (Tablo 1). Hücre dışı matriks karaciğer dokusuna mekanik destek sağlamakla kalmayıp; hücre proliferasyonu, differansiasyonu ve gen ekspresyonu gibi pek çok biyolojik olayda etkin rol oynamaktadır. Teorik olarak karaciğerdeki her hücre, hücre dışı matriks üretebilse de yıldız hücreleri (1), sinüzoidal endotelial hücreler (5) ve safra kanalikülü epitel hücreleri (6-8) karaciğer hücre dışı matriksin öncül hücreleri olarak tanımlanmıştır. Hepatositlerin daha çok fetal karaciğerde, hücre dışı matriks yapımında etkin olduğu düşünülmektedir (9). İnsan ve rat karaciğerleri üzerinde yapılan in-situ hibridizasyon ve RNA ekspresyonu bulgulanması çalışmalarında perisinüzoidal alandaki hücre dışı matriks üretiminden büyük ölçüde yıldız hücrelerinin sorumlu olduğu anlaşılmıştır. Yapılan çalışmalarda yıldız hücrelerinden, kollajen tip I, III, IV, laminin, fibronectin, heparan sülfat, kondroitin sülfat, dermatan sülfat ve prolil hidroksilaz üretimi için gerekli olan mRNA'lar ayrıştırılabilmektedir (1). Safra kanalikülü

hücrelerinin prokollajen tip IV, laminin, prolil hidroksilaz, sindekan 1, sindekan 4, glycipan ve heparan sülfat ürettiği gösterilmiş, kollajen tip IV ve laminin üretimi için gerekli mRNA'lar bu hücrelerde tespit edilmiştir (6-8). Sinüzoidal endotelial hücreler ise tip I, III, IV kollajen, fibronectin, tenasin, perlekan, sindekan 1, undulin, kollajen XIV, laminin ve von Willebrand faktör eksprese etmektedir (5). mRNA düzeyinde fibrotik karaciğerde sinüzoidal endotelial hücrelerde kollajen tip I, III, IV ve fibronectin mRNA'sı artışı belirlenirken, normal karaciğerin endotelial hücrelerinde kollajen tip IV, entaktin ve von Willebrand faktör mRNA varlığı da gösterilmiştir (10,11).

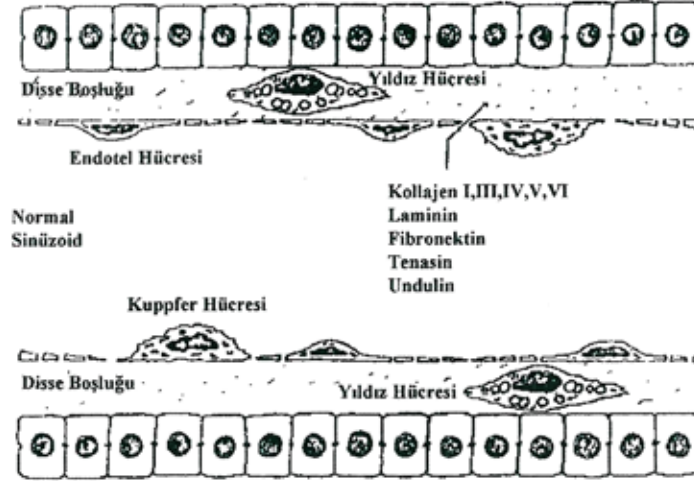
Karaciğer fibrozunda biriken hücre dışı matriks elemanları, etiolojiden bağımsız olarak normal karaciğer dokusundakilerle genelde aynıdır; ancak sirotik karaciğerde 6 kat daha fazla matriks birikimi vardır (1). Vücudun herhangi bir yerindeki yara iyileşme şemasına uygun olarak, hasarı takiben kollajen tip III artmakta ancak daha sonra sirotik karaciğerdeki kollajenlerin % 60-70'ni oluşturacak olan kollajen tip I, tip III'ün yerini almaktadır; bunlara paralel olarak tip IV ve VI kollajende de artış mevcuttur. Non kollajen glikoproteinler incelendiğinde fibronectin, laminin ve undulinde artış olduğu, tenasinin ise aktif fibrogenezin devam ettiği bölgelerde biriktiği görülmektedir. Proteoglikanlarda ise dermatan ve kondroitin sülfatta artış izlenirken, heparin ve heparan sülfatta azalma ortaya çıkmaktadır (1,5). Normal

Tablo 1. Karaciğer yıldız hücrelerinde sentezlenen hücre dışı matriks proteinleri

Kollajenler	Glikoproteinler	Proteoglikanlar	Glikozaminoglikanlar
Tip I+	Fibronectin +	Sindekan	Hyaluronik asit
Tip III	Tenasin +	Perlekan	Kondroitin sülfat
Tip IV	Entaktin +		Heparan sülfat
Tip V	Laminin +	Biglikan	Dermatan sülfat
Tip VI	TSP	Dekörin	
Undulin/kollajen XIV	Vibronectin, SPARC	Betaglikan	

+ Yıldız hücre aktiveşmeleriyle yapımı artan proteinler

Fibrotik karaciğerde atılmış hücre dışı matriks üretimi ve azalmış hücre dışı matriks yıkımı mevcuttur.



Şekil 1. Normal insan karaciğerindeki perisinüzoidal Disse boşluğunun şematik görünümü. Perisinüzoidal boşluk, hepatosit ve endotel arasında az miktarda hücre dışı matriks kapsamaktadır. Gerçek bir bazal membran olmamakla birlikte, bazal membran komponenti olan laminin ve kollojen tip IV birikimi vardır. Perisinüzoidal boşlukta yerleşmiş olan yıldız hücrenin buradaki hücre dışı matriks yapımının büyük bir kısmından olduğu düşünülmektedir.

teinazların doku inhibitörleri (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP) adı verilen proteinlerin görev aldığı gösterilmiştir (1).

METALLOPROTEİNAZ GEN EKSPRESYONUNUN REGÜLASYONU

Gen ekspresyonu fazında IL-1 (interlökin 1), TNF- α (tumour necrosis factor- α), PDGF (platelet derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor) ve EGF (epidermal growth factor) gibi pek çok sitokinin etkili olduğu ileri sürülmekteyse de karaciğer fibrozu açısından en önemli rol TGF- β_1 (transforming growth factor β_1) tarafından oynanmaktadır. Fibroblastlar üzerinde yapılan çalışmalarda TGF- β_1 'nin intersitisyel kollajenaz ekspresyonunu azalttığı ve aynı zamanda jelatinaz, TIMP-1 ve kollajen tip I sentezini arttırdığı saptanmıştır. Bu veriler göz önüne alındığında TGF- β_1 'nin karaciğer dokusu üzerindeki net etkisinin fibrozu artırıcı yönde olduğu görülmektedir (3).

METALLOPROTEİNAZ ENZİM AKTİVASYONU

Proenzimin aktif enzime dönüştürülmesinde propeptid bölgedeki sistein ile katalitik bölgedeki çinko arasındaki bağın kopması etkili olmaktadır. İn vivo ortamda prostromelizin ve prokollajenazın aktivasyonunda plasminin etkin olduğu ortaya konulmuştur (13). Aktifleşen stromelizin, prokollajenazın aktivasyonuna yardımcı olmaktadır. Yeni gösterilmiş olan bir diğer mekanizma da membran tipi metalloproteinaz adı verilen enzim grubunun jelatinazı aktifleştirmesidir (14). Hepatositlerin projelatinaz A aktivasyonunda bu mekanizma aracılığıyla etkili olduğu düşünülmektedir (15).

METALLOPROTEİNAZ DOKU İNHİBİTÖRLERİ

TIMP'ler (tissue inhibitors of metalloproteinases) gerek aktif enzim inhibisyonunda, gerekse proenzim aktivasyonunun engellenmesinde rol oynayarak matriksin yeniden şekil-

Sirotik karaciğerde normal karaciğere göre altı kat daha fazla hücre dışı matriks birikimi vardır. Bu birikimden büyük ölçüde yıldız hücreleri sorumludur.

karaciğerde çok az miktarda olan hyaluronanda ise 8 kat artış söz konusudur (12). Fibrotik değişiklikler viral hepatitlerde periportal alanda, alkolik karaciğer hastalığında ise perisantral bölgede başlamaktadır. Devam eden perisantral veya periportal fibroz panlobular fibroz ile sonuçlanmaktadır. İnflamasyon nereden başlarsa başlasın, fibrozun ortaya çıkması kronik karaciğer hasarını gerektirmekte, fulminan hepatitte olduğu gibi akut hadiselerde ise karaciğer kendini yenileyebilmektedir (5).

Karaciğerdeki matriks artışı fonksiyonel olarak karaciğerin tümünü etkilese de, Disse mesafesindeki değişikliklerin ayrı bir önemi vardır. Normal karaciğerde elektron yoğun olmayan bir bazal membran ile kaplı olan bu alanda kollajen (özellikle tip IV), laminin ve fibronektinden zengin bir matriks birikimi olmakta, bunu endotelial hücrelerin kendi aralarında sıkı bağlantı oluşturması takip etmektedir. Sinüzoidin kapillarizasyonu diye tariflenen bu olaylar sonucu hepatositlerin

fonksiyonu bozulmakta ve karaciğer hastalığının klinik belirtileri ortaya çıkmaktadır. Yıldız hücrelerinin sinüzoidler üzerinde kontraksiyon yaratarak kan akımını azaltması da klinik tablonun gelişiminde etkili olmaktadır (2).

MATRIKS YIKIMI

Normal karaciğer dokusunda matriks yıkımı, matriks metalloproteinazlar olarak adlandırılan bir grup enzim tarafından yapılmaktadır. Bu enzimler üç ana grup altında incelenmektedir: Kollajenazlar, Jelatinazlar ve Stromelizinler (Tablo 2). Çinko ve kalsiyum bağımlı olan bu enzimler Kupffer ve yıldız hücreleri tarafından üretilmektedir. Enzimlerin biyosentezi ve aktivasyonu dikkatli bir regülasyonu gerektirmekte ve bu regülasyon birkaç aşamada gerçekleştirilmektedir: gen ekspresyonunun kontrolü, prometalloproteinaz olarak üretilen bu enzimlerin aktive edilmesi, metalloproteinazların inhibe edilmesi. Bu inhibisyonda metallopro-

Tablo 2. Karaciğerdeki matriks metalloproteinazlar (MMP).

Grup/İsmi	MMP Numarası	Karaciğerdeki substratı
Kollajenazlar		
İntersitisyel kollajenaz	MMP-1	Kollajen, I, III, X, tenascin
Nötrofil kollajenaz	MMP-8	Kollajen, I, III, X
Kollajenaz 3	MMP-13	Kollajen, I, III, X
Jelatinaz		
Jelatinaz A	MMP-2	Jelatin, kollajen IV, V, fibronektin, elastin, laminin, vibronektin, proteoglikan
Jelatinaz B	MMP-9	
Stromelizin		
Stromelizin I	MMP-3	Proteoglikanlar, kollajen IV, V, fibronektin, laminin, elastin, vibronektin, tenascin, dekorin,
Stromelizin 2	MMP-10	Proteoglikonlar, kollajen IV, V, fibronektin, laminin, elastin
<i>Membran tipi matriks metalloproteinazlar</i>		
MT-1-MMP	MMP-14	Projelatinaz A, kollajen I, III, proteoglikanlar,
laminin, fibronektin, vibronektin		

Yıldız hücreleri karaciğer hasarı ile beraber aktive olurlar. Sitoplazmalarındaki retinoid cisimciklerini kaybederek, myofibroblast berzeri bir fenotipe dönüşürler.

lendirilmesinde önemli bir yere sahiptirler. Şimdiye kadar TIMP-1,2,3,4 olmak üzere 4 tipi tanımlanan bu proteinlerin transkripsiyonel regülasyonunda çeşitli sitokin ve büyüme faktörleri etkin bulunmuştur. TGF- β_1 ' in TIMP-1 sentezini arttırırken, TIMP-2'nin sentezini azalttığı, TNF- α 'nın ise TIMP-1 sentezini arttırdığı saptanmıştır. TIMP-1 ve 2 in vivo ortamda fibrotik karaciğer dokusunda yıldız hücreleri tarafından üretilmektedir. TIMP-1 ve 2 tüm metalloproteinazların aktif formlarını inhibe ederler. TIMP-3 hakkındaki bilgiler kesin olmamakla birlikte aktivite spektrumunun benzer olduğu düşünülmektedir. Yönlendirilmiş mutagenез ve rekombine TIMP'ler ile yapılan çalışmalarda N-terminal bölgenin metalloproteinaz inhibisyonunda, C-terminal bölgenin prometalloproteinaz etkileşiminde etkili olduğu gösterilmiştir (3).

METALLOPROTEİNAZ/TIMP DENGESİ

In situ hibridizasyon tekniği ile yapılan çalışmalarda jelatinaz A ve stromelizin 1 mRNA seviyelerinin normal karaciğerde azken karaciğer hasarıyla beraber arttığı gözlenmiştir (16). Jelatinaz A seviyesi karaciğer fibrozu ilerledikçe artış gösterir; ancak bu bilgi karaciğer fibrozu arttıkça artan tip IV kollajen birikimi ile uyumlu bir bulgu değildir. Jelatinaz A'nın yıldız hücre proliferasyonunu arttırdığı yönündeki bilgiler bu paradoksa açıklama getirmeye çalışmaktadır (17,18). Fibrotik insan karaciğeri üzerinde yapılan çalışmalarda intersitisyel kollajenazda belirgin bir artış olmadan TIMP-1 ve 2 mRNA seviyelerinde 5 katlık bir artış saptanmıştır (19). Ratlarda CCl₄ ve safra kanalı ligasyonu ile yapılan çalışmalarda TIMP-1 mRNA'nın ilk 6 saatte artışa geçtiği, 72. saatte maksimum düzeye ulaştığı ve böyle kaldığı izlenmiştir (20). Aynı çalışmada intersitisyel kollajenaz seviyesinde artış saptanmamıştır. 4 haftalık hasar sonrası CCl₄ toksitisesi engellenildiği zaman 3-10. günlerde TIMP-1 ve prokollajen tip I mRNA seviyelerinde, intersitisyel kollajenazda değişiklik olmadan normal seviyeye

düşme belirlenmiştir (21). Bütün bu gözlemler protein veya enzimlerin tek tek seviyelerinden çok TIMP-1/kollajenaz oranının fibrozda önemli olduğunu birkez daha ortaya koymaktadır.

YILDIZ HÜCRELERİ VE MATRİKS YIKIMI

Normal karaciğer dokusunda yıldız hücreleri hepatositler ve sinüzoidal endotelial hücreler arasında bulunur (şekil 1). Vitamin A'dan zengin intrasitoplazmik cisimciklere sahip olan bu hücreler, sitoskeletal yapıları ve yerleşimleri nedeniyle vücudun diğer organlarında endoteli saran persitlere benzemektedirler(2). Yapılan çalışmalarda yıldız hücrelerinin bir intermedier filaman olan desmin eksprese ettiği gösterilmiştir(2). Karaciğer hasarıyla beraber aktifleşen bu hücrelerde,

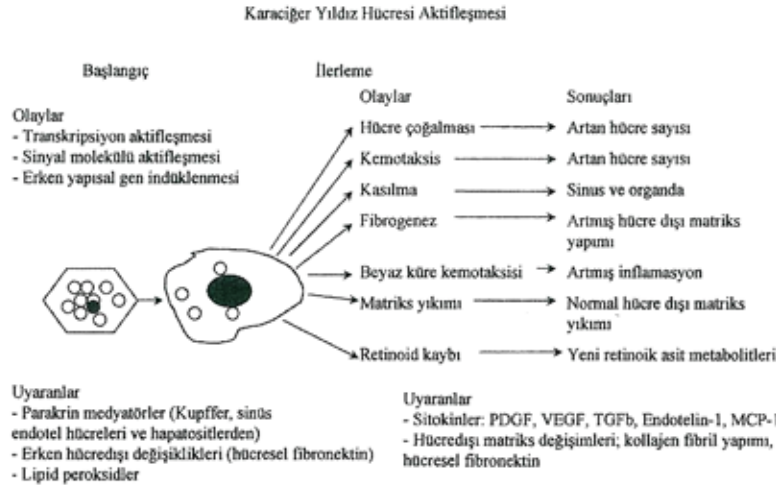
- Artmış pürüzlü endoplazmik retikulum ve azalan retinoid cisimcikleriyle beraber hücre genişlemesi (24),
- Artmış [³H]-timidine alımı ile ispatlanmış olan lokal proliferasyon (25),
- In-situ hibridizasyonla tespit edilmiş matriks bileşenleriyle karakterize fibrogenез,
- α -düz kas aktin ve ince filamanlar sentezlemekle karakterize olan düz kas benzeri özellikler (26) gösterilmiştir.

Primer yıldız hücre kültürleriyle yapılan çalışmalarda yıldız hücrelerinin kollajen tip I ve III başta olmak üzere çeşitli matriks proteinleri (kollajen, heparan sülfat, dermatan sülfat, kondroitin sülfat, laminin, fibronektin, tenasin, dekorin, biglikan) sentezledikleri ispatlanmıştır(1).

Yıldız hücreleri, çeşitli metalloproteinazların ekspresyonu; prometalloproteinazların aktivasyonunda etkin metallo- ve serin proteinazların ekspresyonu; TIMP ekspresyonu gibi matriks degradasyonun her aşamasında da rol oynamaktadırlar(18);

Erken (1-3 günler) primer yıldız hücre kültürlerinde intersitisyel kollajenaz ve stromelizin 1 ekspresyonunda geçici bir artma olur. Bu artış gittikçe azalır (3-5 günler) ve yıldız hücrelerinin

Yıldız hücreleri aktivasyonlarının başlangıç safhasında sitokinlere duyarlı hale gelirler. İlerleme safhasında ortamdaki sitokinlerin etkisiyle hücre dışı matriks birikimine yol açarlar.



Şekil 2. Yıldız hücre aktivasyonunda başlangıç ve ilerleme evrelerinde meydana gelen bazı olaylar. Başlangıç evresi akut karaciğer harabiyetinde dakikalarla saatler arasında bir sürede ortaya çıkar ve hücreyi sitokinlere hassas fenotipe ulaştırır. İlerleme evresi ise sitokinler etkisiyle gelişir.

tam olarak aktivasyonunu takiben ortadan kaybolur (7-21 günler). Ancak jelatinaz A ekspresyonu erken kültürlerde yok denecek kadar azken 3-5. günlerde artar. Bu artışa bir jelatinaz A aktivatörü olan membran tipi metalloproteinaz eşlik eder (22). Erken hücre kültürlerindeki intersitisiyel kollajenaz ekspresyonu TIMP-1'in yokluğunda gerçekleşmektedir. Yıldız hücreleri aktive oldukça kollajenaz seviyesindeki azalmayla birlikte TIMP-1 ekspresyonunda belirgin bir artış olmaktadır (19). Bu değişim metalloproteinaz aktivitesinde yaklaşık 20 katlık bir artışla sonuçlanmaktadır (18). Erken kültürlerde TIMP-2 tespit edilemezken aktifleşmiş yıldız hücrelerinde TIMP-2 mRNA ve TIMP-2 aktivitesi izlenmiştir (23).

In situ immünlökalisasyon ve mRNA hibridizasyon çalışmalarıyla karaciğer fibrozunda tespit edilen myofibroblastların, desmin ekspres ettiği ve vitamin A içerdiği gösterilerek bu hücrelerin yıldız hücrelerinin aktive formu olduğu anlaşılmıştır (2). CCl₄ toksisitesi ile yapılan hayvan modellerinde, toksik etkiye maruz kalan karaciğerde yıldız hücre proliferasyonu

erasyonunun arttığı izlenmiştir. mRNA hibridizasyonu ile normal ve fibrotik karaciğer dokularından alınan hücreler incelendiğinde, yıldız hücrelerinde matriks genleri ekspresyonunda artma saptanırken, hepatositlerde bir fark görülmemiş ve sinüzoidal endotelial hücrelerde hafif bir matriks gen ekspresyon artışı izlenmiştir. Fibrotik karaciğer dokusunda bu hücrelerde kollajen ve laminin sentezi için gerekli mRNA, kollajen tip I, III, IV tespit edilmiş ancak parankimal hücrelerde, matriks sentezinde rol oynayabilecek bir mRNA saptanamamıştır. Sinüzoidal endotelial hücrelerin erken safhadaki matriks birikimine katkısı olup olmadığı konusu tartışmalıdır (3). Bütün bu patofizyolojik mekanizmanın tetiklenmesinde hangi maddenin rol oynadığı konusunda tam bir fikir birliğine henüz varılamasa da Kupffer hücrelerinden ve yıldız hücrelerinin kendisinden salgılanan TGF- β ₁ ve PDGF'in etkin olduğu gözlenmektedir. Karaciğerde hasar sonucu kollajen birikimi oluşmaya başladıktan sonra, kollajen tip I'den zengin bir matriksin de fibrozu pekiştirici rolü olduğu söylenmektedir.

TGF- β_1 (Transforming growth factor β_1) ve PDGF (platelet derived growth factor) karaciğer fibrozunda rol oynayan önemli sitokinlerdir.

Yıldız hücrelerinin aktivasyonu iki aşamada gerçekleşir: başlangıç ve ilerleme (27) (Şekil 2).

a. Başlangıç

Erken hücre dışı matriks değişimleri, parakrin mediatörler ve lipid peroksidlerin etkisiyle, karaciğer hasarının akut fazında yıldız hücrelerinde gen ekspresyonunda ve transkripsiyonel regulasyonda değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler yıldız hücrelerinde genişlemeye sebep olur ve ortamda bulunan sitokinlere karşı duyarlı hale getirir. Hücre dışı matriks elemanlarından özellikle hücresel fibronektinin in situ olarak aktivasyonda rol oynadığı izlenmiştir (28,29). Zarar gören hepatositlerden ve inflammatuar hücrelerden salgılanan reaktif oksijen radikalleri aktivasyonda etkin olan diğer bir faktördür. Deneysel karaciğer hasarı modellerinde makrofaj infiltrasyonunun liposit aktivasyonundan önce olduğu izlenmiştir (30). In vitro ortamda primer yıldız hücre kültürlerine, Kuppfer hücrelerinden elde edilmiş ortam eklendiğinde yıldız hücrelerinde aktivasyon olduğu gözlenmiş, fibrotik karaciğerden elde edilen Kuppfer hücrelerinde normal karaciğerden elde edilenlere göre bu stimülasyonun daha fazla olduğu ispatlanmıştır (31). İnflamasyonun yıldız hücre başlangıcında mutlaka gerektiği görüşü tartışmalıdır; morfolojik olarak inflammatuar belirtilere yol açmaksızın da Kuppfer hücrelerinin veya inflammatuar hücrelerin mediatörler aracılığıyla fibrozu başlatmaları mümkündür. Son yapılan çalışmalarda bir transkripsiyon faktörü olan c-myc'in başlangıç aşamasındaki gen ekspresyonundan sorumlu olabileceğine dair izlemler edinilmiştir (32). Bir zincir finger transkripsiyon faktörü olan Zf9'un da yıldız hücrelerinin aktivasyonun erken fazında rol oynadığı düşünülmektedir (27).

b. İlerleme

Yıldız hücreleri çeşitli mekanizmalar sonucu başlangıç sürecine girince, ortamdaki sitokinlere duyarlı hale gelirler. Bu süreçte oluşan olaylar şu şekilde gruplanabilir:

- PDGF (platelet derived growth factor)(31), FGF (fibroblast growth factor), trombin (33) ve VEGF (vascular endothelial growth factor)(34) yıldız hücrelerinde proliferasyona sebep olurlar. PDGF reseptörü, PI-3 kinaz (fosfatidil inositol 3 kinaz) mekanizması ile çalışmaktadır (35). VEGF'in yıldız hücrelerinde görülmesi, bu hücrelerin anjiojenik cevapta rol oynayabileceği konusunda düşünceler uyandırmıştır.

- PDGF mitojenik özelliğinin yanında yıldız hücreleri üzerinde kemotaktik bir etki yaratarak, hücre popülasyonunun belli bir bölgede artmasında etkili olmaktadır (35).

- Endotelin-1 etkisi ile olduğu düşünülen diğer bir mekanizmayla da yıldız hücreleri sinüzoidleri sıkılaştırmakta ve portal basıncın artmasına sebep olmaktadır (36).

- TGF- β_1 'nin (transforming growth factor β_1) yıldız hücreleri üzerindeki etkisiyle karaciğerde fibroz oluşmaktadır (37,38,39,40).

- Aktifleşen yıldız hücreleri ortama MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) gibi sitokinler salgılayarak inflammatuar hücrelerin birikimine de sebep olmaktadır (41).

- Ortama salınan metalloproteinazlar ile normal karaciğer matriksi yıkılmakta, hastalık ilerledikçe salgılanan TIMP'ler vasıtasıyla da aşırı matriks birikimi meydana gelmektedir(42).

- Yıldız hücrelerindeki vitamin A cisimciklerinin azalması fibrojenik aktiviteyle olan ilgisi tartışmalıdır. Karaciğer fibrozunun artmasıyla birlikte hücre retinoidlerde bir azalma söz konusu olsaydı da, vitamin A yüksek dozda karaciğer toksisitesine sebep olarak yıldız hücrelerinin retinoid cisimcikleriyle dolu olduğu bir ortamda fibroz yapmaktadır (43).

Bu mediatörlerin dışında alkolik karaciğer hasarında asetaldehid (2) ve etanol etkisi ile oluşan lipid peroksidlerin (44) de, ilerleme evresinde görev aldığı düşünülmektedir.

TGF- β_1 (TRANSFORMING GROWTH FACTOR β_1)

TGF- β_1 mezenkimal kökenli hücrelerin proliferasyonunu stimüle eden, epitelyal ve nöroektodermal kökenli hücrelerin proliferasyonunu inhibe eden ve apoptozda da rol oynayan bir polipeptid büyüme faktörüdür. TGF- β_1 'in karaciğer fibrozu ile ilişkisi gerek hayvan mod-

ellerinde yapılan çalışmalarda, gerekse insanlarda yapılan çalışmalarda ispatlanmıştır. Parsiyel hepatektomi sonrasında, TGF- β_1 , hücre dışı matriks proteinleri ve adhezyon moleküllerinin ekspresyonunda artış saptanmış ve rejenere olan karaciğer dokusunda TGF- β_1 sentezi için gerekli mRNA'nın 8 kat artmış olduğu tespit edilmiştir. Hayvan modellerinde CCl₄, demir ve alkol uygulaması, streptokokkal hücre duvarı uygulaması, safra kanalı ligasyonu ve şistozomiasis gibi çeşitli yöntemler kullanılarak oluşturulan karaciğer hastalığında TGF- β_1 için gerekli mRNA sentezinde artma olduğu saptanmıştır. Fibrotik karaciğer hastalığı olan insanların karaciğerlerinde yapılan incelemelerde artmış TGF- β_1 mRNA izlenmiştir (1).

Kuppfer hücreleri, aktive yıldız hücreleri, endotelial hücreler ve karaciğere gelen mononükleer hücrelerce üretildiği düşünülen TGF- β_1 , inaktif latent formda salgılanmaktadır. Asit, baz, ısı veya plasmin ile proteoliz sonucu latent formdan aktifleşmiş hale dönen TGF- β_1 , yıldız hücrelerinde kollajen tip I, III, IV, fibronektin ve proteoglikan sentezini artırmakla kalmamakta, aynı zamanda intersitisyel kollajenaz, stromelizin ve plazminojen sentezini azaltıp, TIMP-1 ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 üretimini arttırarak matriks depolanmasına sebep olmaktadır. TGF- β_1 'nin primer yıldız hücre kültürlerinde gösterilmiş olan bir diğer etkisi de aktive fenotipe transformasyonu hızlandırmasıdır. TGF- β_1 buna ek olarak yıldız hücresi ve matriks arasındaki etkileşimi arttırarak aşağıda bahsedilecek olan mekanizma üzerinde pozitif bir etki yaratmaktadır. TGF- β_1 ve hepatositlerle yapılan deneylerde exojen TGF- β_1 'nin primer hepatosit kültürlerinde hepatosit büyümesini inhibe ettiği ve tip I prokollajen sentezini arttırdığı gözlenmiştir. İn vivo ortamda TGF- β_1 'nin hangi hücreler aracılığıyla ve hangi mekanizmalar yoluyla aktifleştiği konusunda bir fikir birliğine varılamamıştır (1).

PDGF (PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR)

PDGF mezenkimal hücreler için mitojenik olan, matriks metabolizmasının ve immün/inflammatuvar cevabın regülasyonunda etkin olan kemotaktik ve vazoaaktif özelliklere sahip multifonksiyonel bir polipeptiddir (45). A ve B zin-

cirlerinden oluşan bu peptidin AA, AB, BB olmak üzere üç dimerik formu vardır. Hücre zarında bulunan spesifik reseptörü, A ve B diye tanımlanan iki reseptör alt ünitesinin dimerizasyonu ile oluşur (46). Normal karaciğerde PDGF-AA ve PDGF-BB bazı arteiollerin mediasında ve portal stromadaki bazı mezenkimal hücrelerde tespit edilebilmiştir (45). Sirotik karaciğerde ise PDGF-AA sirotik nodüllerin sinüzoidal yapıları boyunca ve asidofilik dejenerasyona uğrayan hepatositlerin çevresinde, inflammatuar infiltratlarla beraber izlenmiştir. PDGF bu lokalizasyonlara ek olarak fibrotik septalarda da saptanmıştır. Bu artışlara paralel olarak PDGF-reseptörü A ve B subunit mRNA ekspresyonunda da artış izlenmiştir (45). Aktive yıldız hücreleri ve endotelial hücreler tarafından üretilen PDGF, güçlü bir yıldız hücre mitojenidir. Başlangıç fazında Kuppfer hücrelerinin etkisiyle yıldız hücre kültürlerinde PDGF reseptörü (özellikle B) sentezinin arttığı gösterilmiştir (31). PDGF reseptörünün ekspresyonu TGF- β_1 varlığında daha fazla olmaktadır.

MATRIKS-HÜCRE ETKİLEŞİMİNİN YILDIZ HÜCRE AKTİVASYONUNA ETKİSİ

Hücre kültürlerinde yapılan deneylerde yıldız hücrelerinin, normal karaciğer dokusuna benzer subendotelial matriks üzerinde yetiştirildiklerinde sessiz kaldıkları, kollajen tip I'den zengin ortamda hızlı bir şekilde aktive olduğu izlenmiştir (47). Bu izlemiden yola çıkılarak, fibrotik karaciğerde kollajenden zengin bir hücre dışı matriksin yıldız hücre aktivasyonunda veya aktivasyonun devamlılığının sağlanmasında rol oynadığı düşünülmüştür. Hücre-matriks etkileşiminin integrin ve non-integrin reseptörler aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir.

Yıldız hücre aktivasyonu ve proliferasyonun ortamdaki uyarıcı faktör etkisi ortadan kalktığı zaman nasıl durdurulduğu üzerinde uzun yıllardan beri bilinmeyen noktalar vardı. Son yapılan çalışmalarda akut karaciğer hasarında yıldız hücrelerindeki CD95 ve CD95L ekspresyonunda artış gösterilmiştir. Bu artışa paralel olarak hücrelerde artmış aktivasyon ve artmış apoptoz izlenmiştir. Ancak kronik karaciğer hasarında ortamdaki artmış büyüme faktörleri özellikle TGF- β_1 ve TNF- α apoptozu engellemektedirler (18,48).

FİBROZİSDE MOLEKÜLER YENİ TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

Hepatik fibrozun ilerlemesinin durdurulmasında en önemli aşama olayı tetikleyen faktörün ortadan kaldırılmasıdır. Alkol ve hepatotoksin toksisitesi için bu etkenlerin alınımının durdurulması, şistozomiasis için anti helmintik tedavi, bilier staz için bilier dekompresyon, metal toksisitesi için flebotomy veya şelasyon, viral hastalıklar için anti viral tedavi bu duruma örnek gösterilebilir (2). Bu yaklaşımların dışında anti-inflammatuvar etkileri nedeniyle kortikosteroidler, prostaglandinler ve kolşisin tedavide kullanılmış ancak beklenen etkiyi gösterememişlerdir.

Hepatik fibrozun tedavisindeki yaklaşımlar şimdiye kadar aydınlatılmış olan patofizyolojik mekanizmadaki spesifik aşamalar üzerinden etki etmeyi amaçlamaktadır.

Yıldız hücre aktivasyonunun kontrolü

Interferon α ve daha az potent olmak üzere Interferon α 'nın fibroblast kültürlerinde kollajen sentezini suprese ettiği gösterilmiştir(49). Rat yıldız hücre kültürleriyle yapılan deneylerde prokollajen ve fibronektin mRNA seviyelerinin, interferon α uygulamasından önceki seviyenin %3-24'üne düştüğü izlenmiştir. Ancak bu madde kronik karaciğer hastalığına sahip insanlarda çok toksik olabileceği için insan çalışmalarında interferon 2a kullanılmış ancak antifibrotik etkisi Hepatit B ve C nedenli fibrotik hastalıklarda gösterilse de tatmin edici olmamıştır(50). Retinodlerin de güçlü anti proliferatif ve anti fibrojenik özellikleri aktive yıldız hücre kültürleriyle yapılan deneylerde saptanmasına rağmen bu maddenin yukarıda bahsedilmiş olan paradoksik etkisi nedeniyle insanda kullanılıp kullanılmayacağı tartışmalıdır (51).

Matriks degradasyonunun artırılması

Bu tedavide yıkımı amaçlanan hücre dışı matriks bileşenleri normal karaciğerde çok bulunan kollajen tip IV'den çok kollajen tip I, III, fibronektin, kondroitin sülfat gibi fibrozda artış gösteren maddeler olmalıdır. Şu ana kadar eksojen bir proteaz bulunamamış olsa da, endojen proteolitik etkiyi stimule edici faktörler üzerindeki çalışmalar devam etmektedir (52). Ancak bu maddelerden hiçbirisi kollajen tip IV ve I'i birbirinden ayıracak spesifisiteye

ulaşmamıştır. Poliansature lesitin, 50% etanol ile beslenen babunlarda, yıldız hücre kollajenaz aktivitesini arttırdığı düşünülen bir mekanizmayla karaciğer fibrozu ve siroz gelişmesini engellemiştir(53).

Matriks sentezinin engellenmesi

Kollajen tip I ve III sentezindeki hücre içi ve dışındaki her aşama anti fibrotik tedavinin bir hedefi olabilir: Transkripsiyon faktör antagonistleri, prolil hidrosilaz inhibitörleri, feedback inhibitörü olarak kullanılan N/C propeptidleri, lizil oksidaz inhibitörleri, propeptidaz inhibitörleri ve matriks metalloproteinaz aktivatörleri in vitro ortamda fibrotik dokunun oluşmasını engelleyebilir. Ancak bu maddelerin in vivo toksisitesi veya hedef bölgeye ulaşmadaki zorlukları, bu maddelerin tedavide kullanılmalarını engellemektedir. Bir prolil hidrosilaz inhibitörü olan HOE 077, hayvan ve insan çalışmalarında iyi tolere edilmiş bir madde olarak daha ileri çalışma gerektirmektedir (54). Yeni tespit edilmiş olan bone morfojenetik faktör-1'in prokollajen C-proteinaz olarak görev yaptığı gerçeği bu maddenin inhibitörlerinin fibrozu engellemede önemli yararları olabileceği konusunda ümit vermektedir (55).

Proliferatif ve fibrojenik mediatörlerin nötralize edilmesi

Ratlarda yapılan deneylerde bir TGF- β 1 bağlayıcısı olarak görev yapabilen dekorinin intravenöz ve intramuskular enjeksiyonlarının antikor kaynaklı glomerular inflamasyondaki granülasyon dokusu oluşumunu engellediği gösterilmiştir (56). Benzer düşünceden hareket ederek PDGF ve TGF- β 1 reseptör antagonistleri üzerinde de çalışmalar sürmektedir (2).

Diğerleri

Silymarin, ratlarda sekonder bilier fibroz ile yapılan deneylerde hepatik kollajen brikimini azaltmış (57), ileri derecedeki fibrozdaki karaciğerlerde de olayın gelişimin yavaşlatmıştır. Silymarinin bu etkisinin membran düzeyindeki modülasyonlarla oluştuğu düşünülmektedir. Endotelin 1'in yıldız hücrelerinde kasılmaya sebep olarak sinüzoidlerdeki kan akımını bozduğunun ortaya çıkması üzerine endotelin reseptör ETA-R ve ETB-R antagonistleri ile deneyler yapılmış, ancak belirgin anti fibrotik etkiye karşın doza

bağımlı barsak kanaması tedavinin yan etkisi olarak ratlarda ortaya çıkmıştır(58).

SONUÇ

Hücre kültürleri çalışmaları ve sitokin biyolojisindeki gelişmeler karaciğer fibrozunun vücudun diğer yerlerindeki yara iyileşmesi modellerine benzer mekanizmalar yoluyla olduğunu düşündürmektedir. Gerek sitokinler

aracılığıyla olsun, gerekse hücre matriks etkileşimi ile olsun, aktive olmuş myofibroblast fenotipli yıldız hücreleri yüksek sentetik kapasiteleri ve yıkımı inhibe edici etkileri nedeniyle karaciğerde fibrozun oluşmasında merkezi rol oynamaktadır. Gelecekteki tedavi yöntemlerinin esas hedefinin yukarıda anlatılmış olan patofizyolojik mekanizma olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Alcolardo R, Arthur MJP, Irdale JP: Pathogenesis of liver fibrosis. *Clinical Science* 1997 ;92:103-12
2. Friedman SL: The cellular basis of Hepatic Fibrosis- Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828-35.
3. Irdale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem. Cell Biol* 1997; 29-1:43-54.
4. Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver. *Semin Liver Dis* 1992;1:1-10.
5. Ramadori G, Knittel T, Saile B: Fibrosis and Altered matrix synthesis. *Digestion* 1998; 59: 372-5.
6. Milani S, Herbst H, Schuppan D, Riecken EO, Stein H: Cellular localization of laminin gene transcripts in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 1989; 134:1175-82.
7. Milani S, Herbst H, Schuppan D, Riecken EO, Stein H: Procollagen expression by non parenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis. *Gastroenterology* 1990;98:175-84.
8. Soroka CJ, Farquhar MG: Characterization of a novel heparan sulphate proteoglycan found in extracellular matrix of liver sinusoids and basement membranes. *J Cell Biol* 1991;113: 1231-41.
9. Rescan PY, Clement B, Grimaud JA et al. Participation of hepatocytes in the production of basement membrane components in human and rat liver during perinatal period. *Cell Diff Develop.* 1989;126:131-44.
10. Knittel T, Neubauer K, Armbrust T, Ramadori G: Expression of von Willebrand factor in normal and diseased rat livers and in cultivated liver cells. *Hepatology* 1995;21:470-76.
11. Ramadori G, Schwogler S, Veit T, Rieder H, Chiquet-Ehrismann R, Mackie EF, Meyer zum Büschenfelde KH: Tenascin gene expression in rat liver and in rat liver cells. In vivo and in vitro studies. *Virchows Arch [B]* 1991; 60:145-53.
12. Gressner AM, Haarman R. Hyaluronic acid synthesis and secretion by rat liver fat storing cells (perisinusoidal lipocytes) in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;151:222-9.
13. Matisian LM. The matrix degrading metalloproteinases. *Bioessays* 1992;14:455-63.
14. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Selki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994;370:61-65
15. Theret N, Musso O, Lhelgoualch A, Clement B: Activation of matrix metalloproteinase 2 from hepatic stellate cells requires interactions with hepatocytes. *Am J Pathol* 1997;150:51-8.
16. Herbst H, Heinrichs O, Schuppan D, Milani S, Stein H: Temporal and spatial patterns of transin/stromelysin mRNA expression following toxic injury in rat liver: *Virchows Arch B Cell Pathol* 1991;60:295-300.
17. Benyon RC, Hovell CJ, Arthur MJP: Gelatinase A (72 kDa type IV collagenase) is an autocrine proliferation factor for rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1997;26:186 A
18. Arthur MJP: Fibrosis and altered matrix degradation: *Digestion* 1998;59:376-8.
19. Irdale JP, Murphy G, Hembry RM, Friedman SL, Arthur MJP: Human hepatic lipocytes synthesize TIMP-1: Implications for regulation of matrix degradation in liver. *J Clin Invest* 1992;90:282-7.
20. Irdale JP, Benyon RC, Arthur MJP, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, Clark N, Murphy G: TIMP-1 mRNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase mRNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 1996;24:176-84.
21. Irdale JP, Nortrop M, Vincent K, Mann DA, Arthur MJP: Possible role of apoptosis in regulating activated stellate cell numbers during liver injury. *J Hepatology* 1997; 26: 132.
22. Hovell CJ, Benyon RC, Baker JE, Arthur MJP: Membrane type matrix metalloproteinase is produced by hepatic stellate cells. *Hepatology* 1995; 22 suppl:369A.
23. Benyon RC, Irdale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJP: Expression of TIMP-1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 1996; 110: 821-31.
24. Takahara T, Kojima T, Miyabayashi C, et al. Collagen production in fat storing cells after carbon tetrachloride intoxication in the rat: immunoelectron microscopic observation of type I, type III collagens and prolyl hydroxylase. *Lab Invest* 1988; 59: 509-21.
25. Geerts A, Lazou JM, De Bleser P, Wisse E. Tissue distribution, quantitation and proliferation kinetics of fat storing cells in carbon tetrachloride injured rat liver. *Hepatology* 1991;12:1193-1202.
26. Rockey DC, Boyles JK, Gabbiani G, Friedman SL, Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture. *J Submicroscope Cytol Pathol* 1992;24:193-203
27. Friedman SL, Cellular Networks in Hepatic Fibrosis, *Digestion*;1998; 59: 368-1.
28. Jarnagin WR, Rockey DC, Kotliansky VE, Wang SS, Bisell DM: Expression of variant fibronectins in wound healing: Cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat fibrogenesis. *J Cell Biol* 1994;127:2037-48.
29. Martinez-Hernandez A. The hepatic extracellular matrix. II. Electron immunohistochemical studies in rats with CCl4 induced cirrhosis. *Lab Invest* 1985;53:166-86.
30. Johnson SJ, Hines JE, Burt AD. Macrophage and perisinusoidal cell kinetics in acute liver injury. *J Pathol* 1992;166:351-8.
31. Friedmann SL, Arthur MJP. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium: direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via

- induction of PDGF receptors. *J Clin Invest* 1989; 84: 1780-5.
32. Lee KS, Buck M, Houghum K, Chokier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest* 1995; 96: 2461-8.
33. Marra F, Grandalioano G, Valente AJ, Abboud HE. Thombin stimulates proliferation of liver fat storing cells and expression of monocyte chemotactic protein-1: Potential role in liver injury. *Hepatology* 1995; 22: 780-7.
34. Ankoma-Sey V, Matli M, Chang KB, et al. Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing. *Oncogene* 1998; 17 (1):115-21.
35. Marra F, Gentilini A, Pinzani M et al. Phosphatidylinositol 3 kinase is required for PDGF's actions on hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997; 112: 1297-1306.
36. Rockey DC. The cellular pathogenesis of portal hypertension: Stellate cell contractility, endothelin and nitric oxide. *Hepatology* 1997; 25: 2-5.
37. Bachem MG, Meyer D, Melchior R, Sell KM, Gressner AM. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by TGF's derived from myofibroblast like cells. A potential mechanism for perpetuation in liver fibrogenesis. *J Clin Invest* 1992; 89: 19-27.
38. Okuno M, Moriaki H, Imai S, et al. Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the activation of latent TGF-beta in liver stellate cells. *Hepatology* 1997; 26: 913-21.
39. Imai S, Okuno M, Moriaki H, et al. 9,13-di-cis Retinoic acid induces the production of tPA and activation of latent TGF-beta via RAR alpha in a human liver stellate cell line L190. *FEBS Lett* 1997; 411: 102-6.
40. Friedman SL, Yamasaki G, Wong L. Modulation of TGF beta receptors of rat lipocytes during the hepatic wound healing response. Enhanced binding and reduced gene expression accompany cellular activation in culture and in vivo. *J Biol Chem* 1994; 269: 10551-8.
41. Marra F, Valente AJ, Pinzani M, Abboud HE. Cultured human liver fat storing cells produce monocyte chemotactic protein-1. Regulation by proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1993; 92: 1674-80.
42. Arthur MJ. Collagenases and liver fibrosis. *J Hepatology* 1995; 22: 43-8.
43. Geubel AP, De Galocsy C, Alves N, Rahier J, Drive C. Liver damage caused by therapeutic Vitamin A administration. Estimate of dose-related toxicity in 41 cases. *Gastroenterology* 1991; 100: 1701-9.
44. Casini A, Cunningham M, Rojkind M, Lieber CS. Acetaldehyde increases procollagen type I and fibronectin gene transcription in cultured rat fat storing cell through a protein synthesis dependent mechanism. *Hepatology* 1991; 13: 758-65.
45. Pinzani M, Milani S, Herbst H, DeFranco R, Grappone C, Gentilini A, Caligiuri A, Pellegrini G, Ngo DV, Romanelli RG, Gentilini P. Expression of PDGF and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis. *Am J Pathol* 1996; 148: 785-801.
46. Matsui T, Heidaran M, Miki T, Toru M, Popescu N, La Rochelle W, Kraus M, Pierce J, Aaronson SA: Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science* 1989; 243 :800-4.
47. Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Arenson DM, Bissel DM. Maintenance of differentiated phenotype of cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matrix. *J Biol Chem* 1989; 264: 10756-62.
48. Saile B, Knittel T, Matthes N, Schott P, Ramadori G: CD95/CD95L mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1997; 151: 1265-72.
49. Rockey DC, Maher JJ, Jarnagin WR, Gabbiani G, Friedman SL. Inhibition of rat lipocyte activation in culture by interferon-gamma. *Hepatology* 1992; 16: 776-84.
50. Schuppan D, Strobel D, Hahn EG. Hepatic fibrosis- therapeutic strategies. *Digestion* 1998; 59: 385-90.
51. Davis BH, Kramer RT, Davidson NO. Retinoic acid modulates rat liver cell proliferation, collagen and TGF beta production. *J Clin Invest* 1990; 86: 2062-70.
52. Friedmann SL. "Cut both ways": Collagenase, lipocyte activation and polyunsaturated lecithin. *Hepatology* 1992; 15: 549-551.
53. Lieber CS, Robins SJ, Li J, deCarli LM, Mak KM, Fasulo LJM, Lco MA. Phosphatidylcholine protects against fibrosis and cirrhosis in the baboon. *Gastroenterology* 1994; 106: 152-9.
54. Liver selective fibrosuppression: a new approach in therapy of liver fibrosis. *J Hepatology* 1991; 13: Suppl 3.
55. Kessler E, Takahara K, Binlaminov L, Brusel M, Greenspan DS: Bone morphogenetic protein-1: The type-1 procollagen C proteinase. *Science* 1996; 271: 360-2.
56. Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper J, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Natural inhibitor of TGF-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 1992; 360: 361-5.
57. Boigk G, Stroedter L, Herbst H, Waldschmidt J, Riecken EO, Schuppan D. Silymarin retards hepatic collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to bile duct obliteration in the rat. *Hepatology* 1997; 26: 643-9.
58. Rockey DC, Chung JJ. Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis: Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing. *J Clin Invest* 1996; 98: 1381-8.