

Aktivitas Antifibrotik Ekstrak Buah Delima Terstandar 40% Ellagic Acid pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) sebagai Hewan Model

*ANTIFIBROTIC ACTIVITY OF POMEGRANATE FRUIT EXTRACT STANDARDIZED 40%
ELLAGIC ACID ON RATS (RATTUS NORVEGICUS) AS ANIMAL MODEL*

Wiwik Misaco Yuniarti, Bambang Sektiari Lukiswanto

Departemen Klinik Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya
Kampus C Unair, Jln Mulyorejo, Surabaya.
(031) 5927832 / 081 134 037 49 / wiwikmisaco@yahoo.com

ABSTRAK

Jumlah penderita penyakit hati kronis (fibrosis atau sirosis hati) semakin meningkat dari waktu ke waktu. Namun, hingga saat ini belum ada terapi yang benar-benar efektif untuk mengatasi hal tersebut. Terapi terhadap fibrosis hati biasanya menggunakan bahan yang memiliki aktivitas antioksidan, antiinflamasi atau antifibrotik. Berbagai usaha terus dilakukan untuk mencari alternatif terapi terhadap fibrosis hati. Salah satu diantaranya adalah menggali potensi tanaman yang diduga memiliki aktivitas tersebut. Berbagai bagian tanaman delima telah terbukti memiliki berbagai aktivitas yang bermanfaat untuk kesehatan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak buah delima terstandar yang mengandung 40% *ellagic acid* terhadap perbaikan derajat fibrosis akibat kolestasis melalui pemeriksaan kadar *alkaline phosphatase* (ALP) dan *gamma-glutamyl transferase* (GGT) serum, sebagai indikator spesifik kerusakan hati akibat kolestasis. Penelitian ini dilakukan terhadap 32 tikus putih jantan, strain wistar, berumur 2,5 bulan dengan bobot badan berkisar antara 150-200 gram. Hewan model fibrosis hati diperoleh dengan teknik *bile duct ligation* (BDL) yang dilakukan pada seluruh subjek penelitian. Subjek penelitian terbagi atas kelompok kontrol (P0 = tanpa BDL dan tanpa pemberian ekstrak buah delima) dan kelompok perlakuan (P1 = BDL dengan pemberian *sodium carboxyl methyl cellulose* (CMC Na), P2 = BDL dengan pemberian *ellagic acid* 90% dan P3 = BDL dengan pemberian ekstrak buah delima terstandar 40% *ellagic acid*). Pemberian CMC, ekstrak (150 mg/Kg BB/ peroral) dan *ellagic acid* (60 mg/Kg BB/peroral) diberikan selama 21 hari dalam volume yang sama, yaitu 2 ml / perekor. Pemeriksaan dilakukan untuk mengukur kadar GGT dan ALP serum hewan percobaan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah delima (P3) dapat menurunkan kadar GGT ($10,5 \pm 9,2$ mg/dl) dan ALP ($509 \pm 4,2$ mg/dl) hingga mendekati kadar normal (P0, GGT : $2,8 \pm 1,4$; ALP : $449 \pm 62,3$). Kadar GGT dan ALP kelompok P3 lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok yang diberi *ellagic acid* (P2, GGT= $48,5 \pm 4,8$ dan ALP = $691 \pm 29,7$) dan kelompok yang hanya diberi CMC (P1, GGT $191 \pm 35,4$ dan ALP $890 \pm 5,7$) ($p < 0,05$). Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak buah delima terstandar 40% *ellagic acid* merupakan kandidat agen antifibrotik yang potensial untuk dikembangkan.

Kata kunci : Fibrosis hati, *bile duct ligation*, delima, GGT dan ALP.

ABSTRACT

The number of patients with chronic liver disease (fibrosis or cirrhosis of the liver) is increasing from time to time. However, until now there is no therapy that really effective to overcome that disease. Therapy for liver fibrosis typically use substance that have antioxidant activity, anti-inflammatory or anti fibrotic. Various efforts always done to find alternative therapies for liver fibrosis. One of them is the use of potential plants that suspected having such activity. Various parts of pomegranate have been shown to have various activities that beneficial for health. This study was conducted to determine the effect of pomegranate fruit extract standardized 40% ellagic acid on the improvement degree of liver fibrosis caused by cholestasis by measuring of serum alkaline phosphatase levels (ALP) and gamma-glutamyl transferase (GGT), as a specific indicator of liver damage becaused of cholestasis. The research was conducted by using 32 male rats, wistar strain, 2.5 month old, weighing between 150-200 grams. Animal models of liver

fibrosis obtained by using BDL technique. Subjects were divided into a control group (P0 = without BDL and giving of pomegranate extract) and treatment groups (P1 = BDL with administration of CMC, P2 = BDL with ellagic acid 90% and P3 = BDL with pomegranate fruit extract standardized 40% ellagic acid). CMC, extract (150 mg / kg BW / PO) and ellagic acid (60 mg / kg BW / PO) administered for 21 consecutive days in the same volume. At the end of 21 days periods, biochemical evaluation was performed to measure serum levels of GGT and ALP. The result indicated that administration of pomegranate fruit extract (P3) significantly reduced GGT (10.5±9.2 mg/dl) and ALP level (509.0±4.2 mg/dl) close to normal level of GGT and ALP (P0, GGT : 2.8 ± 1.4; ALP : 449.0±62.3) ($p < 0.05$). The level of GGT and ALP in P3 group were lower compared to the group ellagic acid (P2, GGT=48.5±4.8 and ALP = 691.0± 29.7) and group which only be given CMC (P1, GGT 191.0±35.4 and ALP 890 ± 5.7) ($p < 0.05$). Extract of pomegranate fruit that standardized with 40% ellagic acid is potential as a antifibrotic agent.

Keywords: liver fibrosis, bile duct ligation, pomegranate, GGT, ALP.

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Jumlah penderita penyakit hati kronis selalu mengalami peningkatan dari waktu ke waktu. Fibrosis hati merupakan bagian dari berbagai penyakit hati kronis dan merupakan fase penting dalam perkembangan penyakit hati menjadi sirosis hati. Salah satu penyebab fibrosis hati adalah kolestasis. Hingga saat ini belum ditemukan terapi standar dan efektif untuk mencegah atau mengobati fibrosis hati sehingga tidak berkembang menjadi sirosis hati (Oh *et al.*, 2003). Sebagai alternatif, saat ini telah banyak penelitian yang dilakukan untuk menggali potensi tanaman yang memiliki khasiat untuk kesehatan.

Buah delima merupakan bagian tanaman delima yang memiliki komponen paling lengkap bila dibandingkan bagian tanaman yang lain. Kandungan terbanyak buah delima adalah *polyphenol* dengan bahan aktif utama *punicalagin* dan *ellagic acid* (EA). Ekstrak buah delima terstandar sebaiknya mengandung 40% atau lebih *ellagic acid*. Delima memiliki kemampuan terapi yang bervariasi melalui berbagai mekanisme yang berbeda. Berbagai penelitian terhadap aktivitas buah delima telah membuktikan bahwa buah delima memiliki kemampuan antibakteri, antioksidan, antiinflamasi dan antikanker, serta aktivitasnya dalam meregulasi proses fibrosis (Jurenka, 2008).

Ellagic acid yang terkandung dalam buah delima, adalah turunan polifenol yang juga banyak ditemukan dalam kacang-kacangan dan buah-buahan, misalnya raspberi, strawberi dan anggur. *Ellagic acid* memiliki aktivitas antifibrotik dengan cara menurunkan kadar kolagen, ekspresi TGF- α 1, dan jumlah α -SMA pada *stellate cell* pankreas teraktivasi pada tikus

putih yang menderita pankreatitis kronis. Pada penelitian tersebut juga terbukti bahwa EA memiliki aktivitas antiinflamasi dan mampu menurunkan produksi *reactive oxygen species* / ROS (Suzuki *et al.*, 2009).

Berdasarkan fakta tersebut, tidak menutup kemungkinan bahwa buah delima dengan komposisi paling lengkap bila dibandingkan dengan bagian tanaman yang lain serta mengandung EA, dapat dimanfaatkan sebagai bahan yang memiliki aktivitas antifibrotik pada hewan percobaan yang sedang dalam proses menderita fibrosis hati.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak buah delima terstandar yang mengandung 40% *ellagic acid* terhadap perbaikan derajat fibrosis akibat kolestasis melalui pemeriksaan kadar *alkaline phosphatase* (ALP) dan *gamma-glutamyl transferase* (GGT) serum, sebagai indikator spesifik kerusakan hati akibat kolestasis.

METODE PENELITIAN

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan sebanyak 32 ekor, berumur 2,5 bulan dengan bobot badan antara 150–180 gram yang telah disapih dari induknya diadaptasikan terlebih dahulu selama satu minggu sebelum digunakan sebagai sampel penelitian. Sebanyak 32 ekor tikus putih dibagi menjadi empat kelompok, di mana masing-masing kelompok terdiri dari delapan ekor tikus putih. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol tanpa *bile duct ligation* (P0) dengan perlakuan pemberian *sodium carboxy methyl cellulose* (CMC) 0,3% sebanyak 2 ml. Tiga kelompok yang lain adalah tikus putih yang seluruhnya mengalami *bile duct ligation* (Beaussier *et al.*, 2007; Brandoni dan Tores, 2009) dengan perlakuan pemberian CMC

0,3% (P1), *ellagic acid* (P2) dan ekstrak buah delima terstandar (P3) dalam pelarut CMC dengan volume yang sama.

Bile duct ligation dilakukan dengan cara tikus dianestesi dengan kombinasi ketamine HCl dan diazepam (100 mg : 5 mg, dengan dosis 1 ml / kg b.b. intra muskular). Insisi dilakukan pada *midline* abdomen sepanjang kurang lebih setengah dari jarak antara bagian abdomen posterior dengan *cartilago xyphoideus*. Pada saluran empedu yang terletak 0,5 – 1 cm dari dinding duodenum, dibuat 2 ligasi dengan jarak kurang lebih 0,3 cm menggunakan *prolene 7/0*. Bagian yang terletak diantara dua ligasi dipotong untuk mendapatkan kondisi obstruksi total pada saluran empedu. Selanjutnya saluran empedu yang telah terikat dan terpotong dikembalikan ke dalam rongga abdomen. Muskulus dan kulit abdomen yang telah diinsisi ditutup kembali dengan jahitan terputus menggunakan *catgut 4/0* dan *prolene 4/0* (Brandoni and Tores, 2009).

Dosis *ellagic acid* yang diberikan adalah 60 g/kgbb/po/hari, diberikan selama 28 hari. Berdasarkan kandungan 40% EA yang terdapat dalam ekstrak buah delima, maka dosis ekstrak buah delima yang diberikan adalah 150mg/kg bb/hari peroral, dengan volume pemberian maksimal 2 ml, selama 21 hari (Beaussier *et al.*, 2006 ; Devipriya *et al.*, 2007). Ekstrak buah delima terstandar yang mengandung 40% *ellagic acid* dan *ellagic acid* 90% yang dipakai dalam penelitian ini adalah produk komersial (Xi'an Biof Bio-Technology Co., Ltd. Gaoxin Distric of Xi'an, People Republic of China).

Pengambilan darah dilakukan 21 hari setelah perlakuan. Pengambilan darah dilakukan setelah hewan percobaan dianestesi dengan ether. Selanjutnya serum diperlakukan sebagaimana mestinya sebagai bahan pemeriksaan ALP dan GGT dan tikus dikorbankan.

Pengumpulan data dilakukan dalam lingkungan yang terkontrol dan terkendali dengan asumsi semua kondisi diusahakan sama dan dapat dikendalikan. Tingkat kemaknaan uji statistika yang dipergunakan dalam penelitian ini sebesar 0,05. Data yang telah dikumpulkan diolah secara manual dan menggunakan perangkat lunak komputer program SPSS 18.00.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tikus putih yang dipersiapkan dengan metode *bile duct ligation* (BDL) merupakan hewan model yang paling cocok untuk menggambarkan fibrosis liver pada manusia. Berdasarkan pengamatan preparat histopatologi oleh Beaussier *et al.*, 2007, didapatkan bahwa pada hari kedua hingga dua minggu setelah BDL, hati hewan model mengalami proses inflamasi dengan skor fibrosis 1 (fibrosis ringan). Fase tersebut ditandai dengan fibrosis yang terdeteksi sebagai deposit pada area periduktuler. Memasuki minggu ketiga hingga empat minggu setelah BDL, hati mengalami fibrosis dengan skor 3 (fibrosis sedang – berat). Fibrosis berkembang lebih luas dan mulai terjadi pembentukan septa fibrosis hingga *bridging* fibrosis. Derajat fibrosis yang lebih berat dengan skor 4 (sirosis) terlihat lima hingga enam minggu setelah BDL. Pada minggu ke tujuh, proses fibrosis mulai berkembang menjadi sirosis hati yang ditandai dengan terbentuknya mikronodul pada hati (Beaussier *et al.*, 2007).

Hingga saat ini belum ditemukan obat yang benar-benar efektif untuk terapi fibrosis hati, baik yang disebabkan oleh kolestasis maupun yang lainnya. Oleh karena itu, strategi baru untuk mencegah kerusakan hati dan fibrosis karena kolestasis sangat diperlukan. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa stres oksidatif, inflamasi dan fibrogenesis yang terjadi selama kolestasis memiliki peran penting dalam proses fibrosis hati akibat kolestasis (Alptekin *et al.*, 1997; Pastor *et al.*, 1997). Dengan demikian, penggunaan bahan yang memiliki aktivitas antioksidan, antiinflamasi dan antifibrotik, merupakan strategi terapi yang potensial untuk mencegah fibrosis hati.

Tumbuhan dapat tumbuh dengan baik pada lingkungan yang mengandung prooksidan tinggi dan cahaya yang terang, dengan konsekuensi akan terbentuk singlet oksigen dan ROS. Tidak mengherankan bahwa tanaman seperti delima mengandung banyak *polyphenol* yang tinggi yang berperan sebagai *scavengers* yang sangat baik terhadap ROS (Hara, 1994; Frankel, 1999). *Polyphenol* memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi daripada vitamin C dan vitamin E (Zao *et al.*, 1989). Ekstrak delima yang kaya akan polifenol menghambat peroksidasi lipid baik in vitro, pada hewan percobaan maupun pada manusia (Hara, 1994, Katiyar *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995; Frankel, 1999).

Tabel 1. Rataan Kadar GGT dan ALP pada Setiap Kelompok Perlakuan

Kelompok (n=8)	GGT (mg/dl)(X ± SD)	ALP (mg/dl)(X ± SD)
P0 (Kontrol)	2,8 ± 1,4 ^a	449 ± 62,3 ^a
P1 (BDL+CMC))	191 ± 35,4 ^c	890 ± 5,7 ^c
P2 (BDL+Ellagic acid)	48,5 ± 14,8 ^b	691 ± 29,7 ^b
P3 (BDL+ Ekstrak buah delima)	10,5 ± 9,2 ^a	509 ± 4,2 ^a

*Notasi yang berbeda pada kolom yang sama adalah berbeda nyata ($p < 0,05$)

Keterangan : GGT = *gamma-glutamyl transferase*
ALP = *alkaline phosphatase*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah delima (P3) dapat menurunkan kadar GGT dan ALP dengan lebih baik bila dibandingkan dengan pemberian *ellagic acid* (P2). Hasil yang sama juga terlihat bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan P0 dan P1. Penurunan kadar GGT dan ALP pada semua kelompok perlakuan terlihat pada Tabel 1.

Berbagai penelitian sebelumnya (Trams dan Symons, 1957; Parola *et al.*, 1996; Sokol *et al.*, 1998) melaporkan bahwa BDL dapat menyebabkan peningkatan *alanine amino-transferase* (ALT), *aspartate aminotransferase* (AST), ALP dan GGT, nekrosis sel, proliferasi kolangiosit dan fibrosis hati. Pada penelitian ini, ekstrak buah delima secara signifikan menurunkan kerusakan hati sebagaimana yang tercermin dari penurunan ALP dan GGT. Pada penelitian yang lain, pemberian ekstrak kulit buah delima terbukti dapat menurunkan jumlah sel yang mengalami nekrosis dan secara signifikan pula menurunkan ALT, AST, LDH dan derajat fibrosis hati akibat BDL (Toklu *et al.*, 2007) (Yuniarti, 2011 dibilang Pustaka ndak jelas)

Kelompok perlakuan yang diberi ekstrak buah delima (P3) menyebabkan penurunan kadar GGT dan ALP yang tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol (P0). Hasil ini juga lebih baik bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang diberi *ellagic acid* (P2) ($p < 0,05$). Ekstrak buah delima dan jus delima memiliki aktivitas lebih kuat bila dibandingkan dengan bagian buah atau bahan aktif yang dikonsumsi terpisah. Hal tersebut diduga karena efek sinergistik atau aditif dari berbagai komponen fitokimia yang terdapat dalam keseluruhan buah. Ekstrak keseluruhan buah delima mengandung banyak sekali bahan aktif, terutama *polyphenol*. *Polyphenol* delima terdiri

dari *flavonoids* (*flavonols*, *flavonols* dan *anthocyanins*), *hydrolyzable tannins* (*ellagitannins* dan *gallotannins*) dan *condensed tannins* (*proanthocyanidins*). Fitokimia lain yang ditemukan pada delima adalah *organic acid*, *phenolic acid*, *sterols*, *triterpenoids*, *fatty acids*, *triglycerides* dan *alkaloids*. Keberadaan *polyphenol* juga meningkatkan kelarutan *ellagic acid* dalam usus, sehingga lebih mudah diabsorpsi. *Polyphenol* juga menghambat metabolisme *ellagic acid* oleh mikroba usus menjadi urothilin melalui aktivitas antimikroba yang dimiliki (Seeram *et al.*, 2006). Dengan demikian, absorpsi *ellagic acid* sebagai bahan aktif utama mengalami peningkatan jika dibandingkan dengan pemberian *ellagic acid* secara individual.

Ekstrak berbagai jenis tanaman dapat mengurangi derajat fibrosis melalui berbagai mekanisme. Namun, pemberian ekstrak beberapa jenis tanaman yang juga mengandung *polyphenol* tidak menurunkan kadar bilirubin serum pada tikus putih yang mengalami BDL. Dengan demikian diduga bahwa pemberian ekstrak yang mengandung *polyphenol* memberikan efek perbaikan terhadap proses fibrosis yang terjadi, tetapi tidak menurunkan derajat atau progresivitas kolestasis yang terjadi. Mekanisme alternatif lain dalam perlindungan terhadap fibrosis yang paling memungkinkan adalah melalui aktivitas ekstrak buah delima sebagai *scavenger* terhadap ROS yang dihasilkan akibat kolestasis (Ferrali *et al.*, 1980).

Kematian sel yang diinduksi oleh oksidan juga dapat menyebabkan proses penyembuhan yang berlebihan sehingga berakhir dengan fibrosis. Oleh karena itu pencegahan kematian sel juga dapat menurunkan derajat fibrosis. Untuk mendukung hal tersebut, ekstrak buah delima telah terbukti menurunkan pelepasan

ALP, GGT, nekrosis sel, dan menurunkan derajat fibrosis. Kemungkinan lain adalah bahwa ekstrak buah delima mencegah aktivasi sel *Kupffer*, sehingga menurunkan pembentukan mediator inflamasi dan fibrogenik. Peran sel *Kupffer* dalam proses fibrosis hati hingga saat ini masih kontroversial. Destruksi sel *Kupffer* terbukti dapat menurunkan fibrosis hati akibat induksi *carbon tetrachloride* (Rivera *et al.*, 2001).

Kolangiosit mungkin memiliki peran penting dalam proses fibrosis dan sirosis hati yang disebabkan karena BDL. Kolangiosit mensintesis dan mensekresi sejumlah mediator proinflamasi dan mediator yang terkait dengan fibrosis termasuk *interleukin-6* (IL-6), *endothelin-1* (ET-1), *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1), *platelet derived growth factor* (PDGF), *tumour necrotic factor alpha* (TNF- α) dan spesies oksigen reaktif (Matsumoto *et al.*, 1994; Caligiuri *et al.*, 1998; Yasoshima *et al.*, 1998; Strazzobosco *et al.*, 2000). Mediator ini memungkinkan kolangiosit untuk berkomunikasi ekstensif dengan sel hati lainnya, termasuk *hepatic stellate cells* (HSCs), sel-sel inflamasi dan fibroblas portal. Reaksi duktuler pada hati yang mengalami jejas dianggap sebagai pemicu fibrosis pada area portal (Desmet *et al.*, 1995). Dalam berbagai sel, termasuk kolangiosit, ROS menstimulasi proliferasi sel (Aurora-Kuruganto *et al.*, 1999; LeSage *et al.*, 2001; Preston *et al.*, 2001; Svegliati-Baroni *et al.*, 2001). Dengan aktivitasnya sebagai *scavenger* terhadap ROS, *polyphenol* dapat menghambat proliferasi kolangiosit dan produksi mediator inflamasi dan fibrogenik oleh sel-sel tersebut. Untuk mendukung hipotesis ini, kolangiosit berkembang biak secara dramatis setelah BDL seperti yang diharapkan dan efek ini dilemahkan oleh aktivitas *polyphenol*.

SIMPULAN

Ekstrak buah delima terstandar memiliki aktivitas menurunkan kadar GGT dan ALP lebih baik daripada *ellagic acid* hingga mendekati kadar normal pada hewan model fibrosis hati. Ekstrak buah delima terstandar merupakan kandidat anti fibrotik yang potensial untuk dikembangkan.

SARAN

Untuk mendapatkan pemahaman yang lebih optimal tentang aktivitas antifibrotik ekstrak buah delima terstandar, maka diperlukan penelitian pada hewan percobaan dengan waktu pemberian yang lebih lama. Diperlukan penelitian lanjutan yang mengevaluasi perilaku sel penyusun hati secara lebih spesifik, misalnya hepatosit, *hepatic stellate cells*, sel *Kupffer*, netrofil, sel mast dan kolangiosit.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Prof. Retno Handajani, dr., MS., PhD, Prof. Dr. Hernomo O. K., dr., SpPD(K)-GEH, dan Dr. I Ketut Sudiana, MS. (Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya) atas saran dan nasehatnya dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alptekin N, Mehmetcik G, Uysal M, Aykac-toker G. 1997. Evidence for oxidative stress in the hepatic mitochondria of bile duct ligated rats. *Pharmacol Res* 36: 243–247.
- Arora-Kuruganti P, Lucchesi PA, Wurster RD. 1999. Proliferatio nof cultured human astrocytoma cells in response to an oxidant and antioxidant. *J Neurooncol* 44: 213–221.
- Bataller R, Brenner DA. 2005. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115(2): 209-218.
- Beaussier M, Wendum D, Schiffer E, Dumont S, Rey C, Lienhart A, Housset C. 2007. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestasis injury. *J of Lab Invest* 87:3-14.
- Boyer TD, Wright TL, Manns MP. 2006. *Hepatology : A textbook of liver disease*. 5th Ed. Elsevier inc, Canada, pp 3-21.
- Brandoni A, Tores AM. 2009. Extrahepatic cholestasis model. In : Rigalli A and Di Loreto VE, *Experimental surgical model in the laboratory rat*. 1st Ed, New York, Taylor and Francis Group, p 139-141.

- Caligiuri A, Glaser S, Rodgers RE, Phinizy JL, Robertson W, Papa E, Pinzani M, Alpini G. 1998. Endothelin-1 inhibits secretin-stimulated ductal secretion by interacting with ETA receptors on large cholangiocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 275: G835–G846.
- Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. 2003. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 83: 655-663.
- Desmet VJ, Roskams T, Van Eyken P. 1995. Ductular reaction in the liver. *Pathol Res Pract* 191: 513–524.
- Devipriya N, Srinivasan M, Sudheer AR, Menon V P. 2007. Effect of ellagic acid, a natural polyphenol on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance : a drug dose dependent study. *Singapore Med J*, 48 (4) : 311-318.
- Ferrali M, Fulceri R, Benedetti A, Comporti M. 1980. Effects of carbonyl compounds (4-hydroxyalkenals) originating from the peroxidation of liver microsomal lipids on various microsomal enzyme activities of the liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 30: 99–112.
- Frankel EN. 1999. Natural phenolic antioxidants and their impact on health. In: *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, edited by Lester P, Hiramastu M, Yoshikawa T. San Diego, CA: Academic, p. 385–392.
- Gutierrez-Ruiz C, Robles-Diaz G, Kershenovich D. 2002. Emerging concepts in inflammation and fibrosis. *Archives of medical research* 33: 595-599.
- Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Hoicraft DM, Kader AA. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem* 48(10): 10-15.
- Hara Y. 1994. Antioxidative action of tea polyphenols: part 1. *Am Biotechnol Lab* 12: 48.
- Hinz B. 2007. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 127:526-537.
- Jurenka J. 2008. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L.*): A Review. *Alternative Medicine Review*, 13(21) 128-144.
- Katiyar SK, Agarwal R, and Mukhtar H., 1994. Inhibition of spontaneous and photo-enhanced lipid peroxidation in mouse epidermal microsomes by epicatechin derivatives from green tea. *Cancer Lett* 79: 61–66.
- Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF, Brenner DA. 2006. Bone marrow-derived fibrocytes in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol* 45:429-438.
- Kisseleva T and Brenner DA. 2008. Fibrogenesis mechanism. *Exp Biol Med* 233(2) 109-122.
- Kumar V, Abbas AK and Pausto N, 2005. Tissue renewal and repair: regeneration, healing and fibrosis. Elsevier Saunders, Philadelphia, pp 87-118.
- Kuwano K, Hagimoto N, Nakanishi Y. 2004. The role of apoptosis in pulmonary fibrosis. *Histopathol* 19:867-881.
- Lama VN, Phan SH. 2006. The extrapulmonary origin of fibroblasts : stem/progenitor cells and beyond. *Proc Am Thorac Soc* 3:373-376.
- Lee KS, Buck M, Houglum K, Chojkier M. 1995. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression. *J Clin Invest*; 96(5): 2461-8.
- LeSage G, Glaser S, Ueno Y, Alvaro D, Baiocchi L, Kanno N, Phinizy JL, Francis H, Alpini G. 2001. Regression of cholangiocyte proliferation after cessation of ANIT feeding is coupled with increased apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G182–G190.
- Matsumoto K, Fujii H, Michalopoulos G, Fung JJ, Demetris AJ. 1994. Human biliary epithelial cells secrete and respond to cytokines and hepatocyte growth factors in vitro: interleukin-6, hepatocyte growth factor and epidermal growth factor promote DNA synthesis in vitro. *Hepatology* 20: 376–382.
- Oh WY, Pyo S, Lee KR, Lee BK, Shin DH, Cho SI, Lee SM. 2003. Effect of *Holotrichia diomphalia* larvae on liver fibrosis and hepatotoxicity in rats. *J of Ethnophar.* 87: 175-180.
- Parola M, Leonarduzzi G, Robino G, Albano E, Poli G, Dianzani MU. 1996. On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Radic Biol Med* 20: 351–359.

- Pastor A, Collado PS, Almar M, Gonzalez-Gallego J. 1997. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of *N*-acetylcysteine. *J Hepatol* 27: 363–370.
- Preston TJ, Muller WJ, Singh G. 2001. Scavenging of extracellular H₂O₂ by catalase inhibits the proliferation of HER-2/Neu-transformed rat-1 fibroblasts through the induction of a stress response. *J Biol Chem* 276: 9558–9564.
- Reeves HL, Friedman SL. 2002. Activation of HSC- A key issue in liver fibrosis. *Bioscience* 7: d808-826.
- Rivera CA, Bradford BU, Hunt KJ, Adachi Y, Schrum LW, Koop DR, Burchardt ER, Rippe RA, Thurman RG. 2001. Attenuation of CCl₄-induced hepatic fibrosis by GdCl₃ treatment or dietary glycine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G200–G207.
- Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, Bou-Ghanios G, Jeffery R, Iredale JP, Forbes SJ. 2006. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 130:1807-1821.
- Seeram N, Lee R, Hardy M and Heber D. 2005. Rapid large scale of ellagitannin pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. Separation and purification technology (41); 49 – 55.
- Seeram NP, Schulman RN, Heber D. 2006. Pomegranate Ancient Roots to Modern Medicine. 1st Ed. Taylor and Francis Group, New York, 2-99.
- Sokol RJ, Devereaux MW, Khandwala R. 1998. Effect of oxypurinol, a xanthine oxidase inhibitor, on hepatic injury in the bile duct-ligated rat. *Pediatr Res* 44: 397–401.
- Strazzabosco M, Spirli C, Okolicsanyi L. 2000. Pathophysiology of the intrahepatic biliary epithelium. *J Gastroenterol Hepatol* 15: 244–253.
- Svegliati-Baroni G, Saccomanno S, van Goor H, Jansen P, Benedetti A, Moshage H. 2001. Involvement of reactive oxygenspecies and nitric oxide radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells. *Liver* 21: 1–12.
- Steen V. 2006. Targeted therapy for systemic sclerosis. *Autoimmun rev* 5:122-124.
- Suzuki N, Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K and Shimosegawa T. 2009. Ellagic acid inhibits pancreatic fibrosis in male wistar Bonn/Kobori rats. *Dig Dis Sci* 54:802-810.
- Toklu HZ, Dumlu MU, Sehirli O, Ercan F, Gedik N, Gokmen V, Sener G. 2007. Pomegranate peel extract prevent liver fibrosis in biliary-obstructive rats. *J Pharm Pharmacol*, 59 (2): 1287-1295.
- Trams EG, Symons AM. 1957. Morphological and functional changes in the livers of rats after ligation or excision of the common bile duct. *Am J Pathol* 33: 13–25, 1957.
- Xia JL, Dai C, Michalopoulos GK, Liu Y. 2006. Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Am J Pathol* 168:1500-15 12.
- Yasoshima M, Kono N, Sugawara H, Katayanagi K, Harada K, Nakanuma Y. 1998. Increased expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in pathologic biliary epithelial cells: in situ and culture study. *Lab Invest* 78: 89–100.
- Zhang Y, wang D, Lee R, Henning SM, Heber D. 2009. Absence of pomegranate Ellagitannins in the majority of commercial pomegranate extract : implication for standardization and quality control. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7395-7400.
- Zhao BL, Li XJ, He RG, Cheng SJ, Xin WJ. 1989. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophys* 14: 175–185.