

Artikel Penelitian

Ekspresi VEGF di Jaringan Hati Tikus Pasca Induksi 2AAF/CCI₄

Isabella K. Liem^{1*}, Radietya Alvarabie^{1,2,3}, Fanny Oktorina¹, Firda A Husna¹,
Puspita E. Wuyung^{4,5}, Ria Kodariah⁴

¹Departemen Anatomi, ²Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran,
Universitas Indonesia, Jakarta

³Departemen Anatomi, Fakultas Kedokteran Militer, Universitas Pertahanan, Bogor

⁴Departemen Patologi Anatomi, ⁵Animal Research Facilities IMERI,
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta

*Penulis korespondensi: bellajo04@gmail.com

Diterima 13 Juni 2022; Disetujui: 26 Mei 2023

doi.10.23886/ejki.11.406.33

Abstrak

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) merupakan sebuah faktor angiogenik poten yang terpicu ekspresinya jika jaringan hati mengalami cedera. Pada cedera hati kronis, VEGF diduga dapat berperan sebagai faktor pro-fibrotik atau anti-fibrotik. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui peningkatan ekspresi VEGF di jaringan hati tikus model dengan cedera hati kronis 2AAF/CCI₄ (2-acetylaminofluorene dan carbon tetrachloride). Penelitian menggunakan desain eksperimental dan dilakukan sejak Oktober 2019- April 2021 di laboratorium Patologi Anatomi dan Departemen Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Dua belas ekor tikus Wistar dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol (normal; n=6) dan kelompok perlakuan (diinduksi dengan 2AAF/CCI₄; n=6). Dilakukan pemeriksaan morfologi hati dengan pewarnaan hematoxylin eosin dan Masson's trichrome dengan skoring NAFLD activity score (NAS) dan pengukuran kadar VEGF menggunakan pewarnaan imunohistokimia. Semua tikus kelompok perlakuan mengalami kerusakan hati dan fibrosis, dengan kerusakan hati terbanyak mencapai derajat 5 (5 dari 6) dan fibrosis hati terbanyak mencapai derajat 2 (4 dari 6). Sedangkan pada kelompok kontrol, semua tikus menunjukkan morfologi hati dalam kondisi normal (derajat 0). Skor ekspresi VEGF pada kelompok perlakuan (median [min-max] = (115 [97-141]) tidak meningkat bermakna (uji Mann-Whitney U; p=0,688) dibandingkan kelompok kontrol (112 [94-129]). Disimpulkan bahwa pada jaringan hati tikus model cedera hati yang diinduksi oleh 2AAF/CCI₄ terdapat peningkatan VEGF namun tidak bermakna secara statistik.

Kata kunci: VEGF, 2AAF/CCI₄, cedera hati, kerusakan hati, fibrosis hati,

VEGF Expression of the Rat Liver Tissue After 2AAF/CCI₄ Induction**Abstract**

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is a potential angiogenic factor whose expression is triggered when liver tissue is injured. In chronic liver injury, VEGF is thought to act as a pro-fibrotic or anti-fibrotic factor. This study was conducted to determine the increase of VEGF expression in the liver tissue of a rat model with chronic liver injury 2AAF/CCI₄ (2-acetylaminofluorene and carbon tetrachloride). The research used experimental design and was carried out from October 2019 to April 2021 at the Anatomical Pathology Laboratory and The Anatomy Department of the Faculty of Medicine Universitas Indonesia. Twelve male Wistar rats were divided into two groups, i.e. control group (normal; n=6) and the treatment group (2AAF/CCI₄ induced; n=6). Examination of liver morphology by staining with hematoxylin eosin and Masson's trichrome by scoring using NAFLD activity score (NAS) and measuring VEGF levels using Immunohistochemical staining. All treatment groups had liver damage and fibrosis, with the most liver damage reaching grade 5 (5 of 6) and the most liver fibrosis reaching grade 2 (4 of 6). Whereas, in the control group, all rats showed normal liver morphology (degree 0). The VEGF expression score in the treatment group (median [min- max]= (115 [97-141]) did not increase significantly (Mann-Whitney U test; p= 0.688) compared to the control group (112 [94-129]). The liver of rat liver injury model induced by 2AAF/CCI₄ showed an increase in VEGF but not statistically significant.

Keywords: VEGF, 2AAF/CCI₄, liver injury, liver damage, liver fibrosis.

Pendahuluan

Fibrosis merupakan suatu proses penyembuhan cedera hati yang meliputi inflamasi, deposisi molekul matriks ekstraseluler, dan neovaskularisasi patologis. Di tahap awal fibrosis bersifat reversibel. Jika kerusakan hati berlanjut dan tidak tertangani, proses akan masuk ke tahap akhir, yaitu sirosis hati yang bersifat irreversibel yang ditandai dengan perubahan nodular dan rekapilarisasi parenkim sinusoid hati.¹ Proses kerusakan hati yang berlanjut atau cedera hati kronis dapat pula berkembang menjadi suatu keganasan atau karsinoma hati.² Proses dalam jaringan hati akibat cedera, yaitu kerusakan hepatosit, perbaikan dan remodeling jaringan hati terkait erat dengan angiogenesis.¹

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) merupakan suatu faktor angiogenik yang poten dan pada awalnya dideskripsikan sebagai faktor pertumbuhan yang penting untuk sel endotel vaskular³ serta telah menjadi salah satu kandidat target protein untuk penanganan cedera hati.¹ Angiogenesis di hati yang mengalami cedera terjadi melalui kaskade sinyal *Epidermal Growth Factor* (EGF). Dalam tersebut VEGF mempunyai peran ganda, yaitu pembentukan dan resolusi fibrosis.⁴ Pada kondisi hipoksia persisten, pembuluh darah baru yang dibentuk oleh VEGF dapat mempertahankan kondisi peradangan kronis dengan mengirimkan sel-sel inflamatori, molekul-molekul pro-inflamatorik, dan angiogenik ke area yang mengalami cedera. Sitokin proinflamatori selanjutnya memicu sel stelata (*hepatic stellate cells*/HSC) untuk memproduksi sejumlah kemokin dan merekrut sel-sel inflamatori. Hal ini akan menstimulasi deposisi matriks ekstraseluler dan meningkatkan fibrosis. Namun demikian, VEGF sebenarnya juga berperan dalam pemulihan sel endotel sinusoid (*liver sinusoidal endothelial cells* /LSEC) yaitu normalisasi penetrasi dan fungsi, serta inaktivasi dan apoptosis HSC. Merujuk pada hal tersebut terapi anti-angiogenik dengan mentargetkan reseptor VEGF (VEGFR2 atau VEGFR1) dapat menjadi suatu strategi pengendalian fibrosis pada kasus cedera hati.¹

Proses fibrosis pada cedera hati melibatkan HSC dan sel-sel non-parenkim lain, misalnya sel Kupffer dan LSEC. HSC merupakan sel utama yang memproduksi VEGF dan reseptornya. Selain itu, VEGF juga diproduksi oleh hepatosit melalui jalur autokrin dan parakrin, terjadi kaskade sinyal VEGF dan reseptornya, terutama reseptor *tyrosine*

kinase VEGFR2 (*kinase insert domain receptor or fetal liver kinase; KDR/Flk-1*)^{1,4,5} yang memodulasi aktivitas pro-fibrogenik HSC dan LSEC. Selanjutnya, angiopoietin-1 (ANGPT) diproduksi dan mengaktifasi Tie-2 *tyrosine-protein kinase receptors* (*epidermal growth factor homology-2*) di membran sel LSEC sehingga terjadi stabilitas pembuluh darah dan proses angiogenesis. Peran LSEC dalam perkembangan penyakit hati berhubungan erat dengan VEGF yang disekresikan oleh hepatosit dan HSC.⁴

Peran ganda VEGF dalam proses fibrosis hati ini menimbulkan pertanyaan dalam pengembangan strategi penanganan fibrosis hati.¹ Apakah peningkatan ataukah penghambatan ekspresi VEGF yang merupakan penanda baik dalam proses regenerasi jaringan hati. Pada penelitian sebelumnya oleh Liem et al⁶ telah dikembangkan sebuah model hewan cedera hati kronis, yaitu tikus Wistar yang diinduksi dengan 2AAF/CCl₄. Kombinasi pemberian CCl₄ selama 12 minggu dan dosis tinggi 2AAF selama 2 minggu dapat menyebabkan kerusakan hati dan fibrosis luas, sehingga tikus 2AAF/CCl₄ ini dapat menjadi kandidat model tikus cedera hati kronis.⁶ Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah pada cedera hati kronis terjadi peningkatan ekspresi VEGF atau tidak, pada tikus model cedera hati kronis tersebut dilakukan observasi ekspresi VEGF pada jaringan hati dengan teknik imunohistokimia. Penelitian ini akan membawa manfaat pada penelitian selanjutnya terkait patogenesis cedera hati kronis dan dapat diaplikasikan dalam strategi penanganan kasus fibrosis hati.

Metode

Subyek dan Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental dengan jaringan hati tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan. Tikus melalui proses adaptasi, induksi, perawatan, dan pembedahan di Klaster *Animal Research Facilities* (ARF) IMERI Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI) sesuai dengan metode yang dilakukan pada penelitian Liem et al.⁶ Sedangkan pembuatan blok parafin, pemotongan jaringan, pewarnaan hematoxylin eosin (HE) untuk observasi morfologi hati dan kerusakan jaringan hati, Masson's trichrome (MT) untuk observasi fibrosis, dan imunohistokimia (IHK) terhadap VEGF dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FKUI. Penelitian dilakukan pada bulan Oktober

2019 hingga April 2021. Penelitian telah lolos kaji etik dari Komite Etik FKUI dengan nomor 1040/UN2.F1/ETIK/2018.

Pembuatan Model Hewan Cedera Hati Kronis dan Pengelolaan Sediaan Histopatologi

Metode induksi 2AAF/CCl₄ dilakukan selama 12 minggu sesuai dengan metode Liem et al⁶

terhadap 12 ekor tikus yang dibagi menjadi dua kelompok penelitian, yaitu Kelompok Kontrol (1) dan Kelompok Perlakuan (2) (Tabel 1).⁶ Jumlah sampel yang digunakan merujuk pada persamaan “ E= total jumlah hewan- total jumlah kelompok” , dengan nilai E= 10 atau 20, sehingga diperoleh rentang sampel yang dapat digunakan untuk masing- masing kelompok yakni 6 sampai 11 sampel.⁷

Tabel 1. Perlakuan Subyek Penelitian

Kelompok	n	Usia awal (minggu)	Usia dekapitasi (minggu)	Perlakuan
1	6	8	20	Injeksi 2 ml minyak zaitun subkutan (s.c.) dan normal saline <i>intragastric</i> selama 12 minggu.
2	6	8	20	Injeksi CCl ₄ (dalam minyak zaitun 1:1) 2 mL/kgBB s.c., diberikan 2x seminggu (selama delapan minggu). CCl ₄ + minyak zaitun (3:7) s.c. (selama empat minggu). Awal minggu ke-9 diberi 2AAF 10 mg/kgBB dalam <i>polyethylene glycol</i> (PEG) <i>intragastric</i> setiap hari.

Observasi kerusakan dan fibrosis jaringan hati, serta ekspresi VEGF dilakukan dengan bantuan mikroskop cahaya (tipe Leica DM750) perbesaran 400x pada lima lapang pandang. Kriteria kerusakan dan fibrosis jaringan hati pada sediaan jaringan hati yang diwarnai HE dan ME merujuk pada kriteria NAFLD *activity score* (NAS), yang dikembangkan oleh *Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network* (NASH CRN) seperti pada Tabel 2 dan 3.⁸ Pengukuran ekspresi VEGF, melalui pulasan imunohistokimia menggunakan antibodi primer VEGF ([C-1]: sc-7269 Santa Cruz) dan mengikuti

protokol sesuai *data sheet*. Pengukuran ekspresi VEGF dengan menghitung jumlah sel positif yang mengekspresikan VEGF per 100 sel hepatosit setiap lapang pandang. Ekspresi VEGF pada sitoplasma hepatosit dan sinusoid ditunjukkan dengan warna coklat. Intensitas warnanya dibagi menjadi tiga kategori, yakni coklat tua untuk positif kuat, coklat untuk positif sedang, dan coklat muda untuk positif lemah. Rumus penilaian ekspresi VEGF mengikuti formulasi skor VEGF = (Jumlah sel positif kuat x 3) + (jumlah sel positif sedang x 2) + (jumlah sel positif lemah x 1) + (jumlah sel negatif x 0).⁹

Tabel 2. Skoring Derajat Kerusakan Hati Berdasarkan Kriteria NAS⁸

Jenis Kerusakan	Kriteria	Skor*
Steatosis	<5% (minimal)	0
	5-33% (ringan)	1
	34-66% (sedang)	2
	>66% (berat)	3
Inflamasi	0 (tidak ada)	0
	<2 foci	1
	2-4 foci	2
	>4 foci	3
Ballooning	0 (tidak ada)	0
	Sedikit	1
	Banyak (nyata)	2

*Derajat kerusakan dihitung dengan menjumlahkan skor ketiga jenis kerusakan dengan rentang nilai 0-8. Derajat 0: tidak ada kerusakan, 1-3: kerusakan ringan, 4-5: kerusakan sedang, 6-8: kerusakan berat

Tabel 3. Derajat Fibrosis Jaringan Hati Berdasarkan NAS⁸

Derajat Fibrosis	Skor*
Tidak ada fibrosis	0
Fibrosis ringan pada zona 3	1a
Fibrosis sedang pada zona 3	1b
Fibrosis pada portal/periportal	1c
Fibrosis pada zona 3 dan portal/periportal	2
<i>Bridging</i> fibrosis	3
Sirosis	4

* Untuk kepentingan pengolahan data, skor 1a, 1b, 1c dikategorikan menjadi skor 1

Analisis statistik

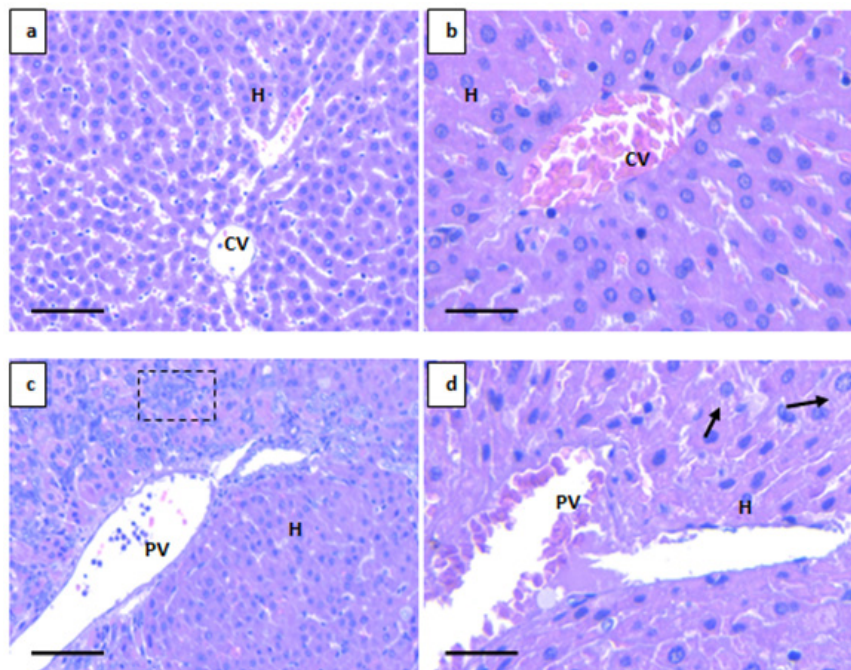
Derajat kerusakan dan fibrosis jaringan hati dilaporkan secara deskriptif sesuai dengan kriteria NAS (Tabel 2 dan 3). Apabila distribusi skor VEGF tidak normal, maka analisis perbedaan ekspresi VEGF antara kelompok 1 dan 2 diuji dengan uji Mann Whitney, menggunakan piranti lunak IBM SPSS 23.0. Hasil yang diperoleh dilanjutkan dengan uji korelasinya, antara ekspresi VEGF dengan derajat kerusakan hati dan fibrosis hati.

Hasil

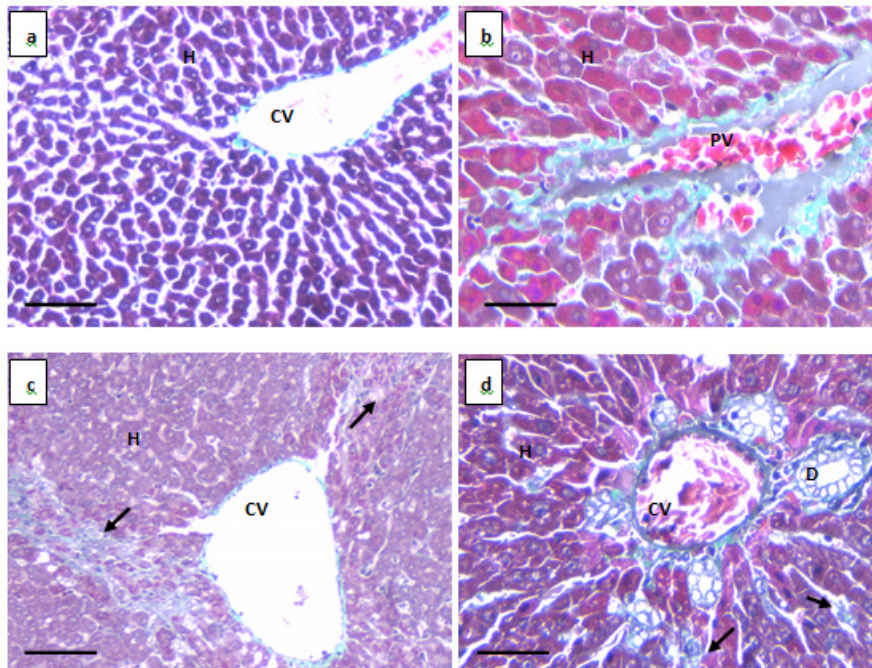
Kerusakan dan Fibrosis Hati

Seluruh kelompok kontrol memperlihatkan morfologi jaringan hati normal, yakni pola lobular klasik. Hepatosit terdistribusi radial mengelilingi vena sentral dipisahkan oleh sinusoid-sinusoid

(Gambar 1). Trias porta juga tampak di perifer lobulus hati (tidak diperlihatkan). Sedangkan kelompok perlakuan memperlihatkan tanda-tanda kerusakan hati yaitu pola lobulus tidak teratur dengan hepatosit tampak mengecil berinti piknotik. Tampak pula gambaran inflamasi, steatosis dan *ballooning* (Gambar 1). Gambaran kerusakan hati ini tampak di seluruh sampel kelompok 2, terdiri atas derajat 4 (5 dari 6 sampel) dan 6 (1 dari 6 sampel) dengan cakupan area (*coverage area*) mencapai 70% dari seluruh lapangan pandang yang diperiksa. Fibrosis tampak di seluruh sampel kelompok 2 (Gambar 2), mencapai derajat fibrosis 2 atau fibrosis pada zona 3 dan porta/periportal pada sebagian besar sampel (4 dari 6), dengan cakupan area sebesar 30% dan 2 sampel dengan derajat fibrosis 1. Semua sampel kelompok 1 tidak mengalami fibrosis.



Gambar 1. Jaringan hati tikus dengan pulasan HE. a dan b adalah Kelompok 1 (Kontrol). a. Morfologi hati normal. Hepatosit (H) terdistribusi radial di sekeliling vena sentral (CV), b. Hepatosit (H) berjajar erat menghadap lumen sinusoid. c dan d adalah Kelompok 2 (Perlakuan). c. Tampak sel radang sebagai tanda suatu reaksi inflamasi (kotak dengan garis putus-putus). d. *ballooning* (panah hitam). PV: vena porta, garis skala: 200 μ m.

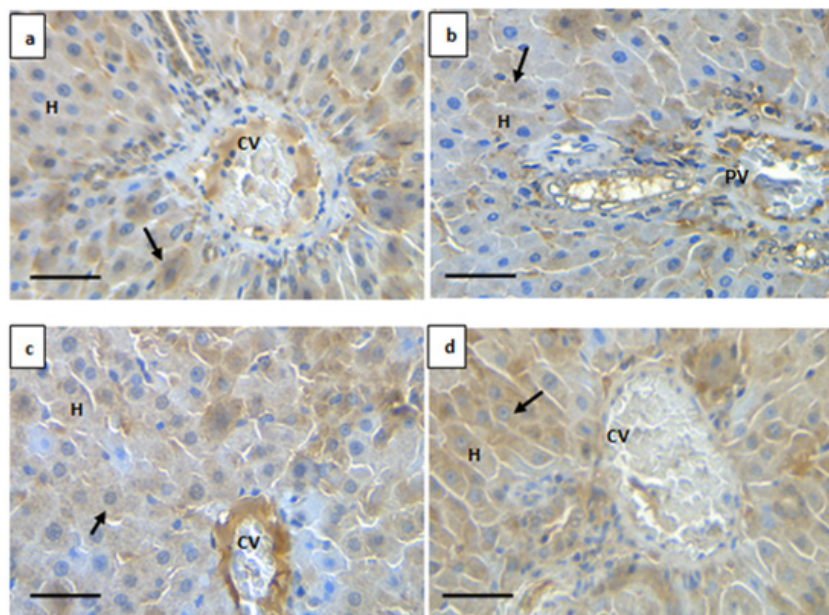


Gambar 2. Jaringan hati tikus dengan pulasan MT. a dan b adalah Kelompok 1 (Kontrol). Serat kolagen tampak di sekitar vena porta (PV). c dan d adalah Kelompok 2 (perlakuan). c. Tampak fibrosis (panah) di sekitar vena sentral (CV), dan d. Tampak reaksi duktular (D) di antara serat-serat kolagen (fibrosis; panah) dalam parenkim hati. Garis skala bar: 10 μ m.

Eksresi VEGF

VEGF tampak terekspresi pada hepatosit, endotel, dan lumen sinusoid sampel di kelompok 1 dan 2 namun ekspresi dengan densitas lebih tinggi tampak di kelompok 1 (Gambar 3). Median

skor VEGF kelompok 1 sebesar 112 (94-129) sedangkan kelompok 2 sebesar 115 ((min-max: 97-141). Namun demikian, skor ekspresi kedua kelompok tersebut tidak berbeda secara signifikan (uji Mann-Whitney U; $p=0,688$).



Gambar 3. Jaringan hati tikus dengan pulasan IHK VEGF. a dan b adalah Kelompok 1 (Kontrol). Tampak hepatosit (H), endotel dan sinusoid positif lemah hingga sedang (panah). c dan d. adalah Kelompok 2. Tampak densitas warna coklat lebih nyata dan terdistribusi lebih luas dan merata pada hepatosit, endotel dan lumen sinusoid (panah). CV: vena sentral (CV), garis skala bar: 10 μ m.

Uji Korelasi Ekspresi VEGF dengan Kerusakan Hati dan Derajat Fibrosis

Hasil yang telah diperoleh dilanjutkan pengujiannya untuk mengetahui hubungan antara ekspresi VEGF dengan kerusakan hati dan derajat fibrosis. Setelah dilakukan uji korelasi Pearson diperoleh bahwa tidak terdapat hubungan korelasi antara ekspresi VEGF dengan skor kerusakan hati ($p= 0,809$; $r= 0,078$) dan derajat fibrosis hati ($p= 0,847$; $r= 0,063$)

Diskusi

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa seluruh jaringan hati kelompok 2 yang diinduksi dengan 2AAF/ CCl_4 mengalami kerusakan dan fibrosis dibandingkan dengan kelompok 1 yang memperlihatkan morfologi jaringan hati normal. Pada kelompok 2, sebagian besar sampel mengalami kerusakan derajat 5 (sedang) dengan cakupan luas, yaitu mencapai 70%. Kerusakan hati ini diikuti dengan reaksi duktular yang mengimplikasikan terjadinya aktivasi sel progenitor hati endogen (sel oval). Kondisi ini khas untuk model tikus cedera hati 2AAF/ CCl_4 , karena pada model cedera hati ini proliferasi hepatosit dihambat oleh 2AAF.^{6,10-12} Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa kelompok yang diinduksi oleh senyawa hepatotoksik menunjukkan karakteristik kerusakan hati yang ditandai dengan adanya inflamasi, steatosis, dan *ballooning*.^{13,14} Fibrosis pada kelompok perlakuan sebagian besar mencapai derajat 2 (fibrosis pada zona 3 dan porta/periporta) dengan cakupan area 30%, artinya proses cedera hati belum mencapai tahap akhir (*end state*) atau sirosis hati.⁸ Fibrosis pada model 2AAF/ CCl_4 juga mengindikasikan bahwa kerusakan hepatosit terjadi berkelanjutan dan sedang berlangsung, yang kemudian diikuti oleh fibrosis. Dengan demikian, model hewan pada penelitian ini dapat mewakili kondisi cedera hati kronis luas.

Penelitian-penelitian pada pasien cedera hati, yakni kasus-kasus hepatitis akut, hepatitis kronis, sirosis, dengan atau tanpa HCC, dan dengan atau tanpa hipertensi porta menunjukkan kadar VEGF yang berbeda, bergantung pada proses yang sedang berlangsung. Pada penelitian ini, telah dilakukan penelusuran proses angiogenesis melalui penanda VEGF^{1,3,15} dan diketahui bahwa produksi VEGF pada Kelompok Perlakuan tidak berbeda dengan Kelompok Kontrol. Walaupun demikian, tampak adanya tendensi peningkatan produksinya pada Kelompok Perlakuan. Jika data penelitian

dilanjutkan dengan analisis korelasi juga tidak memperlihatkan adanya korelasi antara kadar VEGF dengan derajat kerusakan hati. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kadar VEGF pada kasus cedera hati berbeda signifikan dibandingkan dengan kondisi normal (kontrol). Penelitian Atta et al² pada 90 subyek dengan hepatitis C kronis tanpa karsinoma hepatoseluler (non-HCC) dan dengan HCC memperlihatkan bahwa rerata kadar VEGF plasma pada kedua kasus lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kontrol (pasien tanpa hepatitis). Kadar VEGF pada hepatitis C kronis non-HCC 1,4 kali dan hepatitis C kronis dengan HCC 3,6 kali lebih tinggi dibandingkan kontrol.² Sejalan dengan penelitian ini, Kwon et al¹⁶ yang melakukan penelitian pada 168 orang pasien mendapati bahwa pasien hepatitis kronis memang memiliki kadar VEGF lebih rendah dibandingkan dengan pasien sirosis hati dan HCC.¹⁶ Sedikit berbeda, Assy et al¹⁷ pada penelitiannya terhadap 53 pasien dengan hepatitis C, hepatitis B dan sirosis hati mendapati bahwa kadar VEGF lebih tinggi secara signifikan pada kasus hepatitis akut dan lebih rendah pada kondisi sirosis. Selain itu, didapati juga bahwa pada kondisi tanpa hipertensi porta kadar VEGF akan lebih tinggi dibandingkan kondisi dengan hipertensi porta.¹⁷ Berbeda dari penelitian-penelitian di atas, Husen et al¹⁸ mendapati bahwa kadar VEGF serum tidak berkorelasi dengan derajat fibrosis, walaupun ada kecenderungan peningkatan kadar VEGF serum pada fibrosis berat (F3; pemeriksaan dengan teknik elastografi).¹⁸ Walaupun tidak ada korelasi kadar VEGF serum, Franchitto et al,¹⁹ menunjukkan hasil adanya peningkatan ekspresi VEGF dari biopsi hati pada kondisi sakit serta menyebutkan peran penting VEGF yang mendukung perluasan relung HPC melalui efek autokrin dan parakrin sel tetangga yang merangsang proliferasi HPC dan sel endotel. Aspek-aspek ini dapat memiliki implikasi penting dalam proses fibrogenik dan karsinogenesis.¹⁹ Kesimpulan sementara yang dapat diambil adalah kadar VEGF tidak berhubungan dengan kerusakan hati dan derajat fibrosis. Ekspresi VEGF di jaringan tampaknya merefleksikan peningkatan hipertensi porta, penurunan aktivitas regenerasi atau kombinasi keduanya, juga ada tidaknya perkembangan kerusakan hati menuju ke arah keganasan.²

Kesimpulan

Tikus yang diinduksi dengan 2AAF/ CCl_4 selama 12 minggu mengalami kerusakan hati luas derajat sedang, serta fibrosis sedang derajat 2. Sehingga dapat digunakan sebagai model hewan

coba cedera hati kronis. Pada jaringan hati tikus model cedera hati 2AAF/CCl₄ terdapat peningkatan ekspresi VEGF namun tidak berbeda bermakna.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Departemen Anatomi FKUI, Departemen Patologi Anatomi FKUI, *Animal Research Facilities* IMERI FKUI, dan Kepala Program Magister Ilmu Biomedik FKUI. Penelitian dilaksanakan atas dukungan hibah Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT).

Daftar Pustaka

1. Park S, Kim JW, Kim JH, Lim CW, Kim B. Differential roles of angiogenesis in the induction of fibrogenesis and resolution of fibrosis in liver. *Biol Pharm Bull.* 2015;38:980-5. doi:10.1248/bpb.b15-00325
2. Atta MMEA, Atta HM, Gad MAM, Rashed LA, Said EM, Hassanien SESA, and Kaseb AO. Clinical significance of vascular endothelial growth factor in hepatitis C related hepatocellular carcinoma in Egyptian patients. *J Hepatocell Carcinoma.* 2016;6:19-24. doi:10.2147/JHC.S86708
3. Duffy AM, Bouchier-Hayes DJ, and Hermey JH. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its roles in non-endothelial cells: autocrine signalling by VEGF. In: *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2013 [cited 2021 May 29]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6482/>
4. Ramirez-Pedraza M and Fernandez M. Interplay between macrophages and angiogenesis: a double-edged sword in liver disease. *Front Immunol.* 2019;10:1-12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02882/full>
5. Shibuya M. VEGF-VEGFR signals in health and disease. *Biomol Ther.* 2014;22:1-9. doi:10.4062/biomolther.2013.113
6. Liem IK, Zakiyah Z, Oktavina R, Deraya IE, Kodariah R, Krisnuhoni E, Wuyung PE. Comparison of two methods of 2AAF/CCl₄ exposure to induce severe liver injury. *eJKI.* 2020;8:164171. <https://doi.org/10.23886/ejki.8.12368>.
7. Charan, J., & Kantharia, N. How to calculate sample size in animal studies?. *J Pharmacol Pharmacother.* 2013;4:303-6. doi:10.4103/0976-500X.119726
8. Kleiner DE, Brunt EM, Natta MV, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41:1313-21. doi:10.1002/hep.20701
9. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One.* 2014;9:1-10. doi:10.1371/journal.pone.0096801
10. Petersen BE, Zajac VF, Michalopoulos GK. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. *J Hepatol.* 1998;27:1030-38. doi:10.1002/hep.510270419
11. Pritchard MT, Apte U. Models to study liver regeneration. *Liver regeneration.* Cambridge: Elsevier Inc. 2015:15-40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420128-6.00002-6>
12. Tan EK, Shuh M, and Cohen AJ. Liver injury models for induction of hepatic oval cells in rodents. *J Liver Res Disord Ther.* 2015;1:15-27. doi: 10.15406/jlrtd.2015.01.00005
13. Tanaka M, Miyajima A. Liver regeneration and fibrosis after inflammation. *Inflamm Regen.* 2016;36:1-6. doi:10.1186/s41232-016-0025-2
14. Bria A, Marda J, Zhou J, Sun X, Cao Q, Petersen BE, et al. Hepatic progenitor cell activation in liver repair. *Liver Res.* 2017;1:81-7. doi:10.1016/j.livres.2017.08.002
15. Elpek GO. Angiogenesis and Liver Fibrosis. *World J Hepatol.* 2015;7:377-91. doi:10.4254/wjh.v7.i3.377
16. Kwon SH, Jeong SW, Jang JY, Lee JE, Lee SH, Kim SG et al. Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Clin Mol Hepatol.* 2012;18:287-94. doi:10.3350/cmh.2012.18.3.287
17. Assy N, Paizi M, Gaitini D, Baruch Y and Spira G. Clinical implication of VEGF serum levels in cirrhotic patients with or without portal hypertension. *World J Gastroenterol.* 1999;5:296-300. doi: 10.3748/wjg.v5.i4.296
18. Husen L, Siregar GA, dan Lubis M. The difference of hypoxic inducible factor-1, vascular endothelial growth factor, and transforming growth factor-β1 based on liver fibrosis severity in patients with chronic hepatitis B. *Open Access Maced J Med Sci.* 2021;9:91-5. doi: <https://doi.org/10.3889/oamjms.2021.5639>
19. Franchitto A, Onori P, Renzi A, Carpino G, Mancinelli R, Alvaro D, Gaudio E, Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors by hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2013;2:68-77. doi: 10.3978/j.issn.2304-3881.2012.10.11