

УДК 616.36-004-092.9-08

Генная терапия фактором роста гепатоцитов приводит к регрессии экспериментального фиброза печени

Н.А. Джояшвили¹, Н.И. Калинина¹, И.Б. Белоглазова², З.И. Цоколаева²,
П.И. Макаревич¹, Ю.Л. Перов¹, Е.В. Парфенова², В.А. Ткачук¹

¹Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, кафедра биологической и медицинской химии, лаборатория генных и клеточных технологий в медицине, кафедра общей и частной патологии,

²ФГУ РКНПК Минздравсоцразвития РФ, лаборатория ангиогенеза)

Gene therapy by hepatocyte growth factor results in regression of experimental liver fibrosis

N.A. Dzhoiyashvili, N.I. Kalinina, I.B. Beloglazova, Z.I. Tsokolayeva, P.I. Makarevich,
Yu.L. Perov, Ye.V. Parfenova, V.A. Tkachuk

Цель исследования. Изучение эффективности генной терапии фиброза печени у мышей фактором роста гепатоцитов (HGF) человека и оценка возможностей метода гидропорации для доставки генетических конструкций в печень.

Материал и методы. В ходе эксперимента мыши-самцы линии Balbc получали интраперитонеальные инъекции 30% масляного раствора четыреххлористого углерода (CCl₄) из расчета 1 мл/1 г массы тела 1 раз в неделю. Животных (n=4–6) выводили из эксперимента на 1, 2, 4 и 6-й неделе от его начала. После получения печеночной ткани проводили гистологическое исследование, а с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) выполняли анализ содержания мРНК генов, ассоциированных с развитием фиброза печени: трансформирующего ростового фактора $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), коллагена 1 $\alpha 1$ (Coll1 $\alpha 1$), матриксной металлопротеиназы-13 (MMP-13), тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы (TIMP-1) и гладкомышечного α -актина (α -SMA). Кровь забирали для измерения активности печеночных ферментов (АсАТ и АлАТ). HGF человека вводили в ткань печени методом гидропорации. Содержание в печеночной ткани мышей человеческого HGF определяли

Aim of investigation. Studying of efficacy of genetic therapy of liver fibrosis at mice by human *hepatocyte growth factor* (HGF) and evaluation of potentials of hydroporation method for delivery of genetic complexes to the liver.

Material and methods. During experiment male mice of Balbc line received intraperitoneal injections of 30% *perchloromethane* (CCl₄) diluted in oil in a dose of 1 ml/kg once per week. Animals (n=4–6) dropped from the experiment at the 1, 2, 4 and 6-th week from its onset. After obtaining liver tissue samples, histological study was carried out, and by *real time polymerase chain reaction* (RT-PCR) contents of mPNA of liver fibrosis-associated genes were analyzed: *transforming growth factor* $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), *collagen* 1 $\alpha 1$ (Coll1 $\alpha 1$), *matrix metalloproteinase*-13 (MMP-13), *tissue inhibitor of matrix metalloproteinase* (TIMP-1) and *smooth-muscle actin* α (α -SMA). A blood was extracted for assessment of liver enzymes activity (AST and ALT). Human HGF was injected into liver tissue by hydroporation method. Contents of human HGF in mice liver tissue was detected by PCR. For evaluation of stage of liver fibrosis Knodell index and morphometrical analysis was used.

Results. According to Knodell index development of CCl₄-induced liver fibrosis at the 4-th week of experi-

Джояшвили Нина Александровна — кафедра биологической и медицинской химии, лаборатория генных и клеточных технологий в медицине факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова. Контактная информация для переписки: n.dzhoiyashvili@gmail.com; 117192, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 31, к. 5

Парфенова Елена Викторовна — доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории ангиогенеза Института экспериментальной кардиологии ФГУ РКНПК Минздравсоцразвития РФ. Контактная информация для переписки: 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а

с помощью ПЦР. Для оценки степени развития фиброза печени использовали индекс Кноделя и морфометрический анализ.

Результаты. На основании расчета индекса Кноделя установлено формирование CCl_4 -индуцированного фиброза печени к 4-й неделе эксперимента. Цирроз печени формировался к 6-й неделе эксперимента. Эти данные согласовывались с результатами ПЦР-РВ и оценки активности печеночных ферментов. Морфометрический анализ показал, что после терапии HGF в исследуемой группе животных степень выраженности фиброза (%) была ниже по сравнению с контрольной группой. Эффективность трансфекции комплементарной ДНК HGF при использовании метода гидропорации была выше, чем при прямом способе введения в паренхиму органа.

Выводы. Полученные результаты позволяют рассматривать генную терапию фактором роста гепатоцитов в составе невирусных векторов как один из перспективных методов лечения хронических заболеваний печени.

Ключевые слова: фиброз печени, цирроз печени, генная терапия, трансфекция, фактор роста гепатоцитов, гидропорация.

Хронические заболевания печени (ХЗП) представляют серьезную проблему в современной медицине, так как длительно протекают бессимптомно и в отсутствие лечения приводят к развитию *цирроза печени* (ЦП) [1, 5]. В настоящее время только трансплантация печени считается методом выбора терапии конечной стадии ЦП. Однако в связи с нехваткой донорских органов цирроз и часто развивающийся на его основе рак оказываются причиной 90–95% летальных исходов ХЗП. В последние годы все чаще появляются экспериментальные работы, посвященные эффективности генной терапии фиброза и цирроза печени. Большой интерес представляет *фактор роста гепатоцитов* (HGF). Он оказывает антифибротическое действие за счет ингибирования фрагментации ДНК и апоптоза клеток печени, подавления активности *трансформирующего фактора роста $\beta 1$* (TGF- $\beta 1$) и ослабления экспрессии генов *коллагена 1 $\alpha 1$* (Coll1 $\alpha 1$), фибронектина, ингибитора активатора плазминогена 1-го типа, *тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 1-го типа* (TIMP-1), участвует в регенерации печеночной ткани [8, 14].

Одной из задач генной терапии заболеваний человека является поиск эффективных и безопасных способов доставки генетического материала в клетки. В этой связи в задачи настоящей работы входило, *во-первых*, изучение эффективности генной терапии на примере экспериментальной модели фиброза печени у мышей после введения генетических конструкций, содержащих *комплементарную ДНК* (кДНК) фактора роста гепато-

цитов человека, *во-вторых*, оценка возможностей метода гидродинамического введения плазмидных конструкций в печень. В последнем случае в хвостовую вену животного вводили большой объем раствора за 4–7 с в зависимости от массы мыши. Точный расчет вводимого объема выполнялся по формуле: $V(\text{мл}) = 0,057143 \times mcp + 0,5143$, где mcp – средняя масса животного [10].

Conclusions. Obtained results allow to consider gene therapy by hepatocyte growth factor in composition of non-viral vectors as one of perspective methods of treatment of chronic liver diseases.

Key words: liver fibrosis, liver cirrhosis, genetic therapy, transfection, hepatocyte growth factor, hydro-poration.

Материал и методы исследования

Для отработки модели фиброза печени использовали мышей-самцов линии Balb/c массой 18–22 г ($n=25$). Все животные были разбиты на 5 групп: *первая* (контрольная) – здоровые особи, *вторая* – мыши, у которых печень и кровь забирали через неделю после начала эксперимента, *третья* – через 2 нед, *четвертая* – через 4 нед и *пятая* – через 6 нед. 30% масляный раствор *четырёххлористого углерода* (CCl_4) вводили из расчета 1 мкл/1 г массы тела 1 раз в неделю. Перед инъекцией каждое животное взвешивали. У всех мышей ткань печени и кровь забирали через неделю после последней инъекции. Далее на основании полученной модели проводили анализ терапевтического воздействия HGF. Вся выборка животных была разбита на две группы: *первая* (контрольная) группа ($n=5$) – мыши, которым в хвостовую вену под давлением вводился физиологический раствор, и *вторая* группа ($n=5$) – животные, получавшие аналогичным способом плазмидную ДНК, содержащую кДНК HGF человека.

Для анализа содержания мРНК из образцов печеночной ткани выделяли тотальную РНК с помощью набора «RNeasy Mini Kit» — «Qiagen» (США). Качественный и количественный анализ РНК проводили с помощью аналитической системы «Experion» (Automated Electrophoresis Station) и набора реактивов «RNA StdSens Kit» — «BioRad» (США). Для построения кДНК использовали тотальную РНК и набор реактивов «Fermentas» (Латвия). Для изучения экспрессии выбранных генов применялся метод полимеразной цепной реакции в реальном времени — ПЦР-РВ (Real-Time PCR), выполненной на амплификаторе «RotorGene 3000» («Corbett Reaserch», Австралия). Был использован набор реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I — «Синтол» (Россия). Дизайн праймеров выполняли с использованием программы DNASTAR. Специфичность отжига праймеров проверяли с помощью программы «Blast» (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/). Праймеры по предоставленным последовательностям были синтезированы фирмой ЗАО «Синтол» (Россия). В работе использовали следующие последовательности праймеров: HPD-for-mouse (GGC CGC CCC ATC TTC TTA CTA C) и HPD-rev-mouse (CCT GGT GGT TGT GAC GTT GAA TGA) длина ампликона 206; TIMP-1-for-mouse (GCA TGG ACA TTT ATT CTC CAC TGT) и TIMP-1-rev-mouse (TCT CTA GGA GCC CGA TCT G) длина продукта 66; aSMA-for-mouse (CAG CGC CTC CAG TTC CT) и aSMA-rev-mouse (AAA AAA AAC CAC GAG TAA CAA ATC AA) длина продукта 67; Coll1 α 1-for-mouse (GAA ACC CGA GGT ATG CTT GA) и Coll1 α 1-rev-mouse (GAC CAG GAG GAC CAG GAA GT) длина продукта 274; MMP-13-for-mouse (GCT GGT CAG TCG CCC TTT T) и MMP-13-rev-mouse (TAA GGA AAG CAG AGA GGG ATT AAC A) длина продукта 73; TGF β 1-for-mouse (TGA GTG GCT GTC TTT TGA CG) и TGF β 1-rev-mouse (ACT TCC AAC CCA GGT CCT TC) длина продукта 350; HGF-for-human (CAT GTC AGC GTT GGG ATT CTC AG) и HGF-rev-human (ATT TTT GCC ATT CCC ACG ATA AC) длина продукта 221. Для каждой матрицы кДНК одновременно ставилась ПЦР в 2 пробирках: с геном домашнего хозяйства и одним из исследуемых генов. Для анализа экспрессии гена *HGF* (hHGF) в составе мышинной кДНК животных использовали ПЦР. После ее окончания ампликоны детектировались с помощью электрофореза в 2% агарозном геле.

Для гистологического анализа ткань печени помещали в 4% раствор формалина на 24 ч. Затем образцы ткани обезживали в спиртах восходящей концентрации (3 смены 96° спирта по 30 мин и 30 мин в 100° спирте). На следующем этапе кусочки печени помещали в 3 смены ксилола по 20 мин. После этого ткань пропитывали в

3 сменах парафина по 1 ч и по окончании работы кусочки заливали расплавленным парафином. Срезы толщиной 6 мкм готовили на микротоме «Microm». Для изучения общей морфологической картины готовые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а для оценки накопления коллагена использовали краситель пикросириус красный. Перед окраской срезы депарафинировали в ксилоле и проводили по спиртам нисходящей концентрации. Срезы заключали с помощью синтетического средства — «BioOptica» (Италия). Степень повреждения печени после внутрибрюшинного введения CCl_4 оценивали с помощью полуколичественного индекса гистологической активности (ИГА), или системы Кноделя [9]. Степень регрессии фиброза печени на фоне генной терапии определяли методом морфометрии в программе «MetaMorph 7.1» (Molecular Devices).

Для изучения степени выраженности цитолиза клеток печени проводили сравнение активности печеночных ферментов — аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в плазме крови в каждой группе животных на базе клинической лаборатории ФГУ РКНПК Минздравсоцразвития РФ.

Для выбора оптимального способа введения генетического материала в клетки печени сравнивали эффективность трансфекции плазмидной конструкцией рс-DNA3- β -Gal при прямой инъекции и с помощью гидродинамического метода. Многие клетки млекопитающих имеют собственный ген Lac Z, продуцирующий эукариотическую β -галактозидазу. Поскольку она может давать фон, мешающий идентификации маркированных клеток, была выделена группа контрольных животных, которым путем прямого введения в паренхиму печени и методом гидропорации в хвостовую вену вводился физиологический раствор. Проверку функциональной активности плазмиды рс-DNA3- β -Gal выполняли на клетках линии HEK-293.

Трансфекцию клеток проводили с использованием коммерческого реагента *липофектамина* — Lipofectamine (Invitrogen, N11668-027) по предложенному протоколу, после чего подсчитывали процентное содержание клеток, экспрессирующих ген β -галактозидазы. Плазмидную ДНК рс-DNA3- β -Gal перед инъекцией в паренхиму органа смешивали с Lipofectamine в соотношении 1:1. Методом гидропорации вводили незащищенную плазмидную ДНК. Работу выполняли на разработанной ранее модели фиброза печени.

В эксперименте участвовали мыши после 4 нед от начала введения CCl_4 , т. е. на стадии развернутого фиброза. Печень для гистологического исследования забирали через сутки, 3 и 6 дней после введения генетического материала. Далее получали криосрезы печеночной ткани, которые окрашивали с помощью субстрата X-Gal для обна-

ружения активности β -галактозидазы в трансфицированных клетках и пикросирусом красным. Для этого криосрезы фиксировали раствором 2% формалина и инкубировали в растворе 1 мг/мл X-gal в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в присутствии 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ и 2 mM MgCl при комнатной температуре в течение 14 ч. Затем использовали стандартную методику окраски срезов тканей пикросирусом красным для выявления коллагена. Расчет эффективности трансфекции клеток печени проводили с помощью программы «MetaMorph». При этом вычисляли отношение всей площади окрашенных клеток к общей площади клеток среза.

Плазмидные конструкции, содержащие кДНК фактора роста гепатоцитов человека (hHGF), были созданы в ООО «МОНА» и ООО «Генная и клеточная терапия» и переданы для данной работы. Раствор плазмиды с кДНК HGF вводили гидродинамическим методом в хвостовую вену. Инъекция выполнялась 1 раз в неделю в течение 3 нед в дозе 75 мкг плазмидной ДНК на животное начиная с 4-й недели от начала эксперимента. Параллельно в течение 6 нед от начала опытов выполняли внутрибрюшинное введение CCl_4 . Через неделю после последней инъекции животных выводили из эксперимента, соблюдая «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Статистическую обработку проводили с использованием непараметрического метода Краскела—Уоллиса для множественного сравнения неза-

висимых групп и непараметрического критерия Манна—Уитни для сравнения двух независимых групп в статистическом пакете Statistica 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение

С помощью окрашивания срезов печени мышей, которым внутрибрюшинно вводился CCl_4 , пикросирусом красным — красителем, специфично окрашивающим коллаген в красный цвет, было обнаружено, что уже после 2 нед эксперимента в области портальных трактов начинается формирование фиброза печени (рис. 1).

На основании расчета полуколичественного ИГА, или системы Кноделя, было показано, что фиброз печени достигает наибольшего развития к 4–5-й неделе эксперимента, а к 6-й неделе у животных формируется цирроз (см. рис. 1). Так, через 1 нед после введения CCl_4 нормальное строение печени сохраняется только на периферии дольки, а в ее центре обнаруживаются участки ацидофильного некроза, признаки фиброза отсутствуют. Отмечаются умеренная интрадольная дистрофия и фокальный некроз: процесс затрагивает более $1/2$ дольки. ИГА равен 4.

Через 2 нед от начала эксперимента сохранность структуры долек наблюдается только на периферии, а в центральных отделах находятся участки ацидофильного некроза, занимающие от $1/2$ до $2/3$ дольки. Видно начало формирования

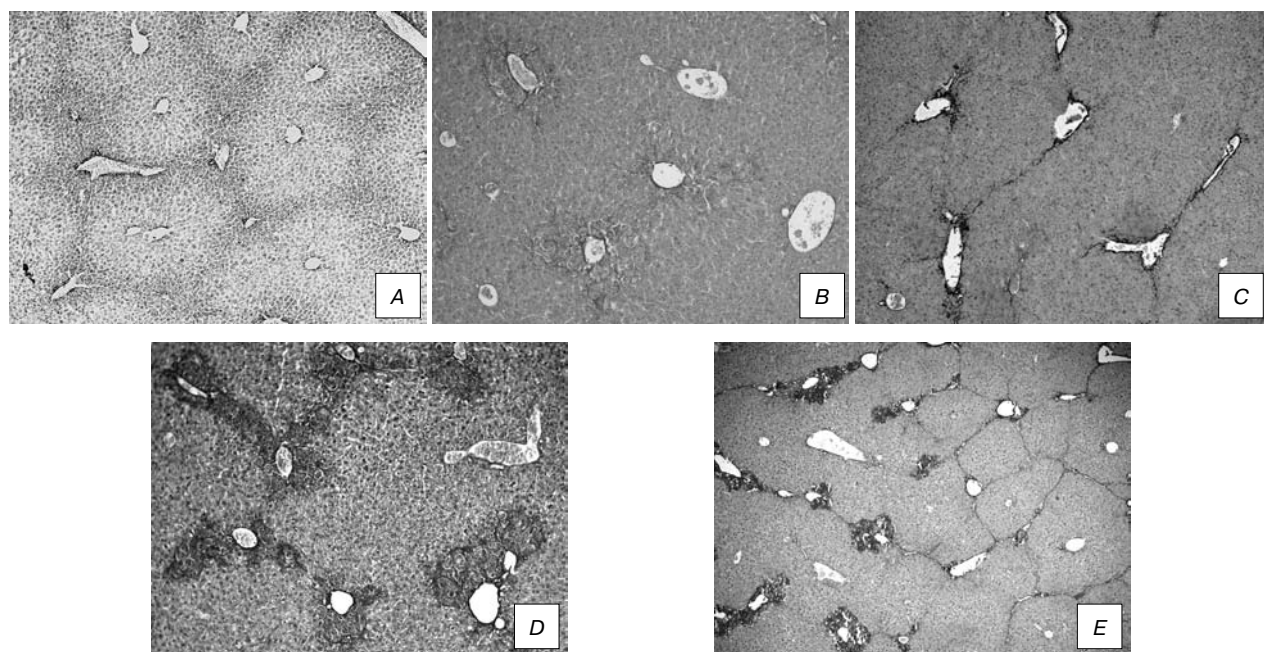


Рис. 1. Динамика развития фиброза и цирроза печени мышей после внутрибрюшинного введения четыреххлористого углерода

А — печень мыши контрольной группы, В — через 1 нед, С — через 2 нед, D — через 4 нед, E — через 6 нед. Окраска пикросирусом красным, увеличение $\times 10$

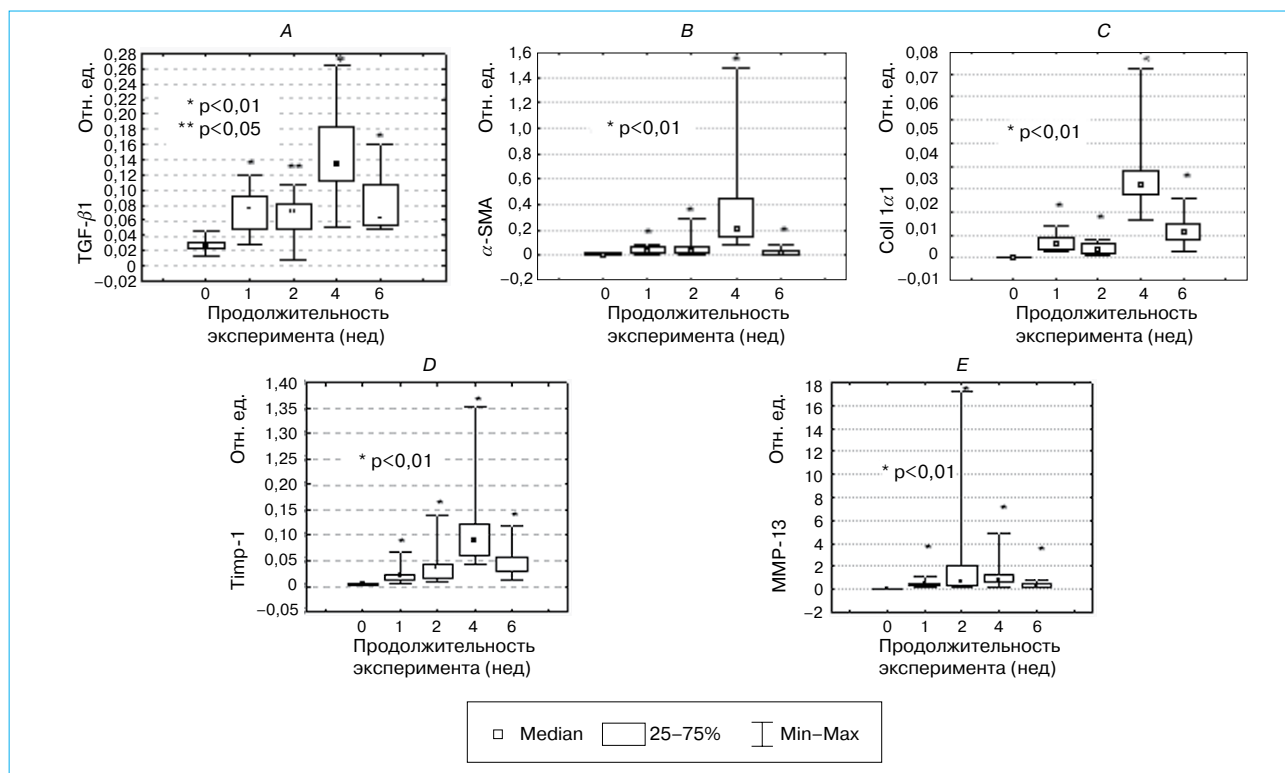


Рис. 2. Динамика экспрессии генов, участвующих в развитии фиброза печени
 А – TGF-β1; В – α-SMA; С – Coll1α1; D – TIMP-1; E – MMP-13

мостовидного фиброза: от портальных триад в глубь паренхимы дольки тянутся пучки волокон вновь синтезированного коллагена. В некоторых участках они формируют портопортальные септы. ИГА равен 8.

Спустя 4 нед в центральных отделах долек располагаются участки ацидофильного некроза и гепатоциты в состоянии жировой дистрофии. Портальная вена расширена. Имеются признаки значительного портального воспаления. Мостовидный фиброз выражен в большей степени, чем у мышей через 2 нед после начала эксперимента. ИГА равен 11.

Сравнивая морфологические изменения печеночной ткани животных трех рассмотренных групп можно заметить общие для них признаки: нарушение долькового и балочного строения вокруг центральных вен, выраженность портального воспаления, прогрессирование интралобулярной дистрофии. Разрастание соединительной ткани в области портальных трактов на фоне длительно существующего воспаления с переходом в мостовидный фиброз начинается после 2 нед эксперимента. Через 6 нед балочное строение долек полностью нарушено. Есть признаки цирроза печени в виде перестройки гистоархитектоники органа – ложные дольки. При окраске пикросириусом красным можно видеть выраженный ступенчатый некроз, который захватывает более $\frac{2}{3}$ портальных трактов. ИГА составляет 12 баллов.

Полученные выводы согласовываются с результатами изучения активности печеночных фермен-

тов: для АЛАТ получено статистически значимое отличие между группами при множественном сравнении, а также между контрольной группой и каждой из исследуемых групп, для АсАТ имеется статистически значимое отличие только между группой здоровых мышей и животными, которым CCl₄ вводился в течение 4 нед.

Для того чтобы выяснить, как изменяется экспрессия генов, участвующих в развитии фиброза, в ткани печени мышей, получавших CCl₄, мы проанализировали содержание мРНК этих генов с помощью ПЦР (рис. 2). Так, коллаген 1α1 является основным компонентом патологического внеклеточного матрикса [11]. TGF-β1 считают ключевым цитокином фиброгенеза. Под его влиянием происходит активация генов коллагена 1α1 и гладкомышечного α-актина (α-SMA) [2, 5]. Мы также оценили изменение экспрессии α-SMA, поскольку он является маркером активированных клеток Ито. В настоящее время эти клетки относятся к основным источникам избыточного внеклеточного матрикса [6, 12].

Вследствие того, что в активации клеток Ито участвует матриксная металлопротеиназа 13-го типа (MMP-13), мы изучили уровень ее экспрессии, а также тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 1-го типа [7, 13]. Согласно данным литературы, характер экспрессии гена MMP-13 в ходе развития фиброза печени имеет волнообразный характер. Первый пик активности приходится на начало фиброгенеза. Возможное

объяснение заключается в профиброгенном действии матриксной металлопротеиназы за счет разрушения нормального микроокружения клеток Ито с последующей их активацией. Затем следует спад уровня экспрессии гена MMP-13. Следующее повышение приходится на период репарации поврежденной ткани [13].

Таким образом, внутрибрюшинное введение четыреххлористого углерода вызывает статистически значимое повышение уровня экспрессии генов, участвующих в фиброгенезе. При этом пик экспрессии генов *Coll1 α 1*, *TGF- β 1*, *α -SMA* и *TIMP-1* приходится на 4-ю неделю эксперимента, а для MMP-13 — на 2-ю и 4-ю. Снижение экспрессии всех генов наблюдается к 6-й неделе эксперимента. Эти данные согласуются с результатами гистологического исследования печеночной ткани и свидетельствуют о том, что внутрибрюшинное введение CCl_4 приводит к развитию фиброза печени на сроке от 2 до 4 нед, а в период с 4-й по 6-ю неделю формируется цирроз. После анализа полученных результатов было решено вводить плазмидные конструкции начиная с 4-й недели эксперимента.

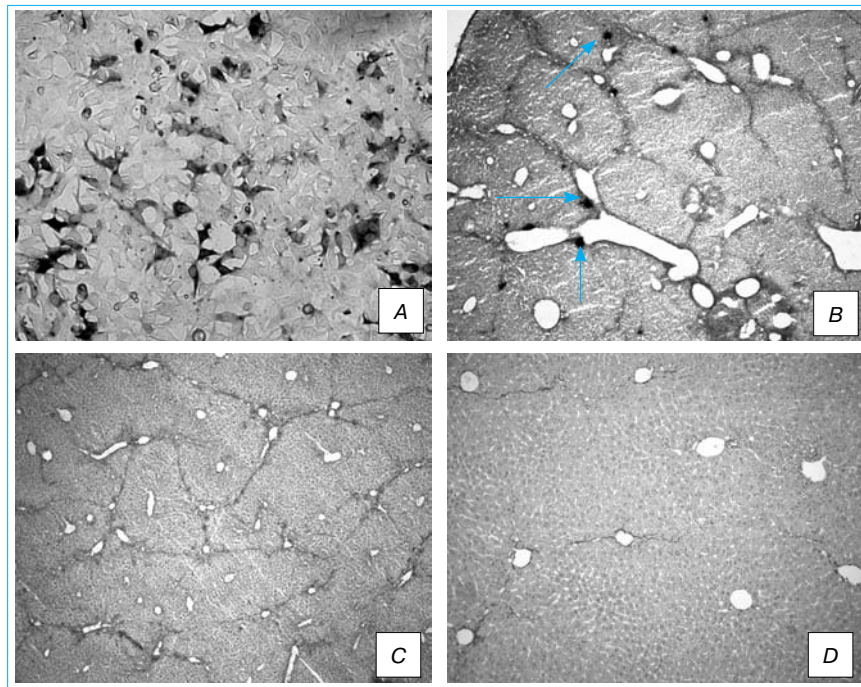


Рис. 4. Трансфекция клеток плазмидной ДНК. Клетки линии НЕК 293
 А — окраска субстратом X-Gal;
 В — срез печени на стадии фиброза через 6 дней после введения плазмидной ДНК, содержащей кДНК β -галактозидазы, методом гидропорации, окраска субстратом X-Gal и пикросириусом красным. Стрелками показаны участки печени, трансфицированные плазмидной ДНК, содержащей кДНК β -галактозидазы;
 С — срез печени на стадии фиброза после введения физиологического раствора методом гидропорации;
 D — после трансфекции плазмидной ДНК, содержащей кДНК фактора роста гепатоцитов человека, методом гидропорации, окраска пикросириусом красным.
 Увеличение $\times 10$

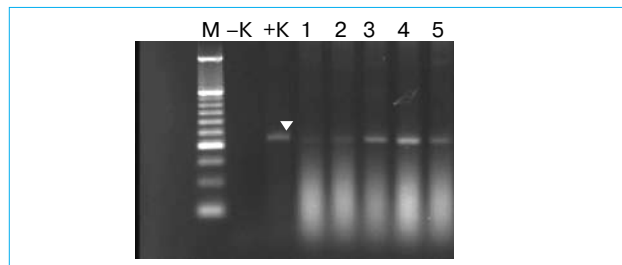


Рис. 3. Анализ экспрессии кДНК HGF человека в печени мышей.
 — К — контроль без cDNA; + К — контроль с hcDNA;
 М — маркер 50 bp; 1–5 — cDNA мышей, получавших терапию hHGF. Длина ампликона 221 bp

Для того чтобы подобрать оптимальные условия доставки плазмидных конструкций в ткань печени, вводили раствор кДНК β -галактозидазы с помощью локальных инъекций и методом гидропорации. Сохранность ткани оценивали после окраски срезов печени гематоксилином и эозином, эффективность трансфекции — морфометрическим методом. В случае обкалывания паренхимы печени на срезах отмечали значительную лейкоцитарную инфильтрацию и обширное повреждение печеночной ткани с последующим замещением жировой тканью. При этом эффективность трансфекции, подсчитанная морфометрическим методом, составила 0,05%. После введения раствора кДНК методом гидропорации признаков повреждения ткани не выявлено. Клетки, трансфицированные плазмидной ДНК, располагались преимущественно по ходу кровеносных сосудов. Эффективность трансфекции составила 1,4%. Содержание мРНК HGF человека в печени мышей оценивали через неделю после последней инъекции плазмиды с помощью ПЦР с праймерами, специфичными к кДНК HGF человека. Проведенный анализ подтвердил экспрессию кДНК HGF человека в печеночной ткани мышей, получавших внутривенные инъекции плазмидной конструкции (рис. 3).

Эффективность генной терапии фактором роста гепатоцитов изучали с помощью морфометрического анализа срезов печеночной ткани, окрашенных пикросириусом красным. Установлено статистически

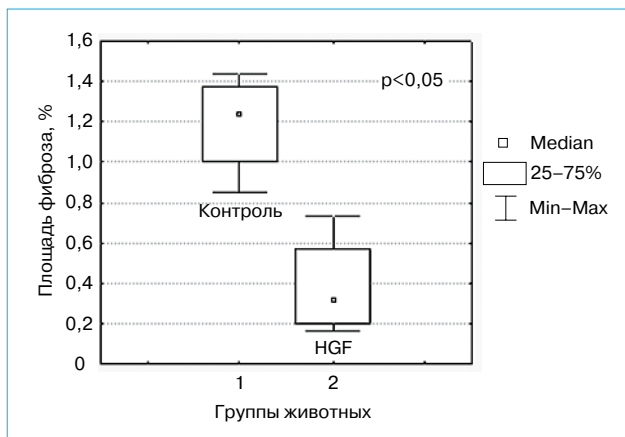


Рис. 5. Динамика регрессии фиброза печени после введения плазмидной ДНК

значимое снижение площади фиброза печени в группе животных с индуцированным фиброзом, получавших генную терапию HGF, начиная с 4-й недели от начала введения четыреххлористого углерода (рис. 4).

Список литературы

1. Внутренние болезни по Тинсли Р.Харрисону: В 7 т: Кн. 5: Болезни пищеварительной системы; Болезни иммунной системы, соединительной ткани и суставов: Учебное пособие для вузов / Под ред. Фаучи Э., Браунвальда Ю., Иссельбахера К. и др.: пер. с англ. под общ. ред. Алипова Н.Н., Тимофеевой Е.Р. — Изд. 14-е — М.: Практика, 2005. — Т. 5. — 445 с.
2. Arias M. et al. Adenoviral delivery of an antisense RNA complementary to the 3 coding sequence of transforming growth factor- β 1 inhibits fibrogenic activities of hepatic stellate cells // *Cell Growth Differ.* — 2002. — Vol. 13. — P. 265–273.
3. Eastman S.J. et al. Development of catheter-based procedures for transducing the isolated rabbit liver with plasmid DNA // *Hum. Gene Ther.* — 2002. — Vol. 13. — P. 2065–2077.
4. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells // *Semin. Liver Dis.* — 2001. — Vol. 21. — P. 311–335.
5. Gines P., Cardenas A., Arroyo V., Rodes J. Management of cirrhosis and ascites // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — Vol. 350. — P. 1646–1654.
6. Gressner A.M. et al. Roles of TGF- β in hepatic fibrosis // *Front. Biosci.* — 2002. — Vol. 7. — P. 793–807.
7. Iredale J. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis // *Hepatology.* — 1996. — Vol. 24. — P. 176–184.
8. Jing-Lin Xia et al. Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation // *Am. J. Pathol.* — 2006. — Vol. 168. — P. 1500–1511.
9. Knodell R.G. et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis // *Hepatology.* — 1981. — Vol. 1. — P. 431–435.
10. Liu F., Song Y.K., Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA // *Gene Ther.* — 1999. — Vol. 6. — P. 1258–1266.
11. Pinzani M. Liver fibrosis // *Springer Semin. Immunopathol.* — 1999. — Vol. 21. — P. 475–490.
12. Ramadori G., Saile B. Mesenchymal cells in the liver — one cell type or two? // *Liver.* — 2002. — Vol. 22. — P. 283–294.
13. Watanabe T. et al. Gene expression of interstitial collagenase in both progressive and recovery phase of rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride // *J. Hepatol.* — 2000. — Vol. 33. — P. 224–235.
14. Xue F. et al. Hepatocyte growth factor gene therapy accelerates regeneration in cirrhotic mouse livers after hepatectomy // *Gut.* — 2003. — Vol. 52. — P. 694–700.

Выражаем глубокую благодарность сотрудникам ООО «МОНА» Татьяне Николаевне Власик, Александру Ясеновичу Шевелеву, сотруднику ООО «Генная и клеточная терапия» Ксении Андреевне Рубиной за предоставленные для работы плазмидные конструкции, а также сотрудникам клинико-диагностической лаборатории Владимиру Николаевичу Титову и Татьяне Ивановне Коткиной за помощь в проведении биохимических исследований.

Также выражаем благодарность лаборанту-гистологу патологоанатомического отделения ЦКБ УДП РФ Ольге Николаевне Барковой за неоценимую помощь в освоении методов гистологического исследования. Благодарим сотрудника кафедры биологической и медицинской химии ФФМ МГУ Татьяну Владимировну Лопатину за обучение методам ПЦР и ПЦР-РВ.