



УДК 577.12

РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ КАК МЕТОД ВАЛИДАЦИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ В ЛЕЧЕНИИ ФИБРОЗА¹

© 2025 г. А. С. Микаелян*, Н. Халимани**, В. В. Федорова**, Ю. В. Котелевцев**, #

* Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

** Сколковский институт науки и технологии, Россия, 121205 Москва, Большой бульвар, 30с1

Поступила в редакцию 20.05.2025 г.

После доработки 01.06.2025 г.

Принята к публикации 02.06.2025 г.

РНК-интерференция (RNAi) – эволюционно консервативный механизм подавления экспрессии генов, основанный на деградации мРНК под действием малых интерферирующих РНК (siRNA). Открытие этого механизма стало не только мощным инструментом для фундаментальных исследований в биологии, но и открыло новые перспективы для терапевтической медицины. С точки зрения эффективности и безопасности терапия с помощью siRNA представляет собой многообещающую альтернативу традиционным фармацевтическим подходам. В отличие от традиционных фармакологических методов, которые часто характеризуются системной токсичностью и низкой специфичностью, терапия на основе siRNA позволяет селективно подавлять гены, ассоциированные с патологиями, обеспечивая высокоточное воздействие и низкую токсичность. Особый интерес представляет применение siRNA для модуляции активности макрофагов – ключевых эффекторов врожденного иммунитета, играющих центральную роль в развитии фиброза печени. Благодаря высокой пластичности макрофаги способны поляризоваться в провоспалительный (M1) или противовоспалительный (M2) фенотипы, что определяет их вклад в прогрессирование или регресс фиброза. Эпигенетические модификации и подавление ключевых регуляторов поляризации (таких как EGR2, IRF5, IRF3, TLR4, HAS2) с помощью siRNA позволяют целенаправленно изменять их функциональное состояние. В данном обзоре систематизированы современные данные о роли макрофагов в патогенезе фиброза печени и перспективах использования siRNA-терапии для управления их активностью. Обсуждаются стратегии прецизионного воздействия на ключевые молекулярные мишени, что открывает новые возможности для разработки патогенетически обоснованных методов лечения.

Ключевые слова: РНК-интерференция, короткая интерферирующая РНК, липидные наночастицы, фиброз, макрофаги

DOI: 10.31857/S0132342325050037

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	759
2. СУЩЕСТВУЮЩИЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ RNAi	759
3. ФЕНОТИПЫ МАКРОФАГОВ И РЕГУЛЯЦИЯ ИХ ПОЛЯРИЗАЦИИ	760
4. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ МИШЕНИ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ: EGR2, IRF5, IRF3, TLR4, HAS2	761
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	764
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	765

¹ Нашим учителям, читавшим лекции на кафедре биоорганической химии и руководившим практиками студентов в ИБХ имени М. М. Шемякина в 70-е годы прошлого века.

Надеюсь, этот краткий обзор будет полезен студентам и молодым научным сотрудникам, поставившим своей целью создание новых лекарственных препаратов с применением знаний и технологий, полученных в области органической химии и молекулярной биологии. По сути, эту интерфазу, в которой создаются новые лекарства и терапевтические платформы, и составляет биоорганическая химия – наука, которой я занимаюсь на протяжении последних 50 лет.

Ю. В. Котелевцев

Сокращения: RNAi – РНК-интерференция; siRNA – короткая интерферирующая РНК; LNP – липидные наночастицы

Автор для связи: (тел.: +7 (916) 438-19-03; эл. почта: y.kotelevtsev@skoltech.ru).

1. ВВЕДЕНИЕ

В 1998 г. Эндрю Файр и Крейг К. Мелло впервые описали феномен RNAi, а в 2006 г. были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине за открытие РНК-интерференции (RNAi) и ее применение [1].

В основе механизма РНК-интерференции лежит противовирусный защитный путь, присутствующий практически во всех эукариотических клетках. Экзогенная для клетки вирусная двухцепочечная РНК (dsRNA) сначала процессируется в ядре рибонуклеазой III типа DROSHA, затем экспортируется в цитоплазму, где рибознуклеаза Dicer расщепляет ее на 21–25-членные двухцепочечные рибонуклеотиды. После этого одна из цепей – направляющая (guide strand) – связывается с РНК-индуцированным сайленсинг-комплексом (RISC), который осуществляет специфическую деградацию комплементарной мРНК с участием каталитического компонента Argonaute [2–4].

Выход на рынок первого препарата на основе RNAi (патисиран) в октябре 2018 г. ознаменовал новый этап в развитии РНК-фармацевтики. Препарат продемонстрировал феноменальные результаты в лечении редкого генетического заболевания – транстретинового амилоидоза. Одной инъекции синтетического модифицированного олигонуклеотида было достаточно для снижения экспрессии амилоидного белка ниже патологического уровня, вызывающего накопление амилоида в тканях, прежде всего в спинном мозге.

Успех в создании первого препарата на основе коротких интерферирующих РНК (siRNA) во многом был обусловлен применением набора химических модификаций, повышающих устойчивость олигонуклеотидов без снижения их каталитической активности в составе комплекса RISC. Наиболее часто используемые модификации в препаратах siRNA, допущенных к клиническому применению, – это тиофосфаты (PS), замещающие природные фосфаты в фосфодиэфирных связях, и модификации рибозы в положении 2': чаще всего -О-метил, -О-метоксиэтил и -фтор (2'-OMe, 2'-MOE и 2'-F соответственно). Помимо стандартных модификаций, существует множество вариантов изменения скелета, рибозы и нуклеотидов, каждый из которых специфически влияет на устойчивость и биологическую активность препаратов siRNA [5].

Эффективная доставка первых siRNA-препаратов была обеспечена формулировкой РНК в составе наночастиц, образованных комплексами с положительно заряженными синтетическими липидами (липидные наночастицы, LNP) [6].

Модификация олигонуклеотидов конъюгатами *N*-ацетилгалактозамина (GalNAc), лигандами асиалогликопротеинового рецептора (ASGPR), обеспечила возможность подкожного введения препаратов преимущественно гепатоцитарного действия (в отличие от препаратов на основе LNP, которые требуют внутривенного введения) [7].

Фенестрированный эндотелий печени, а также наличие ASGPR делают этот орган наиболее восприимчивым к доставке siRNA-препаратов как на основе LNP, так и модифицированных GalNAc.

Прогресс в создании лекарств на основе РНК определяется как достижениями в области химии олигонуклеотидов [8, 9], так и разработкой новых методов доставки – на основе модифицированных частиц и ковалентных конъюгатов олигонуклеотидов с лигандами, обеспечивающими внутриклеточную доставку в различные ткани. Несмотря на достигнутые успехи, остаются ключевые проблемы, такие как выбор мишени, эффективная доставка *in vivo*, стабильность молекул и возможные off-target эффекты.

2. СУЩЕСТВУЮЩИЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ RNAi

В настоящее время в разработке находятся несколько десятков лекарственных соединений на основе siRNA [9], и их число будет экспоненциально расти. При условии, что решена задача доставки siRNA в клетки-мишени и охарактеризована фармакологическая мишень, появляется возможность создания лекарственного препарата и проведения направленной терапии на основе унифицированного подхода. Препараты на основе siRNA, допущенные к медицинскому применению [10], представлены в табл. 1.

Системные заболевания печени, связанные с различными патологическими факторами, такими как вирусные инфекции (гепатиты В и С), неправильное питание и злоупотребление алкоголем, представляют угрозу здоровью и жизни миллионов людей. Распространенность неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) во всем мире составляет около 30% и продолжает расти [12].

Таблица 1. Препараты на основе siRNA допущенные к медицинскому применению

Препарат	Назначение
Patisiran	Полинейропатия при наследственном транстиретин-опосредованном амилоидозе
Givosiran	Острая гепатопорфирия
Lumasiran	Первичная гипоксалурия I типа
Inclisiran	Первичная гиперлипидемия, включая гетерозиготную семейную гиперхолестеринемию (HeFH)
Vutrisiran	Полинейропатия при наследственном транстиретин-опосредованном амилоидозе
Nedosiran	Первичная гипероксалурия I типа
Fitusiran	Гемофилия А (factor VIII deficiency) и гемофилия В (factor IX deficiency) [11]

При этом гарантированные медикаментозные методы лечения заболевания и остановки его прогрессирования – от фиброза до необратимой стадии цирроза печени – отсутствуют.

Тканеспецифичные резидентные макрофаги (клетки Купфера), а также макрофаги, происходящие из костного мозга (моноцитов), играют ключевую роль в развитии НАЖБП. Воспалительные фагоциты – макрофаги, ассоциированные с жировыми отложениями и рубцеванием, а также восстановительные макрофаги при стеатозе, стеатогепатите и переходе к фиброзу и гепатоцеллюлярной карциноме – могут изменять фенотип, поляризуясь и приобретая как полезные, так и дезадаптивные функции на разных стадиях заболевания [13].

RNAi как нельзя лучше подходит для направленной модификации макрофагов печени. На основании анализа обширных литературных данных нами были выбраны ключевые кандидаты гены, регулирующие поляризацию макрофагов, и проведен анализ фенотипа макрофагальной линии RAW 264.7, а также макрофагов, дифференцированных из моноцитов костного мозга (bone marrow-derived macrophages, BMDM) [14].

Современные методы на основе RNAi позволяют целенаправленно подавлять экспрессию ключевых генов циркулирующих и резидентных макрофагов, а также их эффекторных клеток. Успешное завершение клинических испытаний и вывод на рынок нескольких препаратов на основе siRNA показали принципиальную возможность их применения в практической медицине. На сегодняшний день несколько терапевтических препаратов на основе siRNA одобрены федеральным агентством

“Управление по контролю за продуктами и лекарствами США” (FDA) для лечения различных заболеваний. Это стимулировало научные изыскания в академических лабораториях, направленные на поиск и валидацию генов-мишеней, подавление экспрессии которых может иметь выраженный терапевтический эффект.

3. ФЕНОТИПЫ МАКРОФАГОВ И РЕГУЛЯЦИЯ ИХ ПОЛЯРИЗАЦИИ

Макрофаги играют важную роль в развитии фиброза благодаря своей высокой пластичности и способности модулировать воспалительные и репаративные процессы [15]. Под действием определенных стимулов и в зависимости от цитокинового окружения они могут поляризоваться по классическому пути в провоспалительные макрофаги (M1) или по альтернативному пути – в противовоспалительные макрофаги (M2).

Например, при остром повреждении ткани печени микроокружение существенно изменяется, заставляя макрофаги секретировать провоспалительные медиаторы. M1-макрофаги продуцируют большое количество оксида азота (NO) и цитокинов, таких как TNF- α , которые стимулируют синтез коллагена звездчатыми клетками печени. По мере стихания воспаления макрофаги переходят в фазу заживления ран, стимулируя выработку внеклеточного матрикса миофибробластами. Затем они вступают в фазу ремоделирования, необходимую для восстановления нормальной анатомической структуры ткани [16, 17].

Общепринято, что поляризация макрофагов происходит как минимум по двум направлениям – к фенотипам, подобным M1 и M2 [18]. Эти фенотипы аналогичны поляризации Т-хелперов 1 и 2,

наблюдаемой в популяции Т-клеток [19]. Поляризация макрофагов представляет собой процесс активации клеток в определенное время и в определенной микросреде. Их фенотип определяется двумя ключевыми факторами: сигналом, запускающим активацию, и соответствующим паттерном экспрессии генов, определяющим функциональные свойства макрофагов.

Фенотип М1 индуцируется под действием цитокина IFN- γ (ассоциированного с Th1-ответом), а также патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (РАМР), таких как липополисахариды (ЛПС) грамотрицательных бактерий. М1-макрофаги характеризуются повышенной экспрессией молекул главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС II), ко-стимулирующих молекул CD86 и CD80, что делает их высокоэффективными активаторами CD4⁺ Т-клеток и генераторами мощных провоспалительных ответов. Эти реакции включают усиленную продукцию реактивных форм азота и кислорода, синтез оксида азота с помощью фермента NOS2, секрецию провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α , а также выраженные микробицидные свойства [20].

Фенотип М2 активируется в ответ на цитокины Th2-типа, такие как IL-4 и IL-13, и чаще всего связан с иммунным ответом на гельминтозы, грибковые инфекции, апоптотические клетки, иммунные комплексы и компоненты системы комплемента. Ключевые поляризующие факторы включают M-CSF, IL-4, IL-13, IL-10 и TGF- β [21]. М2-макрофаги демонстрируют низкий уровень экспрессии CD86, но обладают повышенной экспрессией рецепторов маннозы и галактозы (лектины Е-и С-типа). Они слабо активируют CD4⁺ Т-клетки и играют важную роль в восстановлении тканей и разрешении воспаления [22].

С точки зрения метаболизма, макрофаги М1 и М2 конкурируют за аминокислоту аргинин, используя ее в разных биохимических путях. В зоне воспаления доступность аргинина ограничена, что делает его лимитирующим метаболитом. М1-макрофаги используют аргинин для синтеза NO через фермент NOS2, при этом также образуется цитруллин. Оксид азота инициирует каскад реактивных метаболитов, включая ROI, что формирует механизм уничтожения патогенов. В отличие от них, М2-макрофаги метаболизируют аргинин в орнитин и мочевину при участии аргиназы. Орнитин – непотеиногенная аминокислота –

необходим для процессов репарации, таких как синтез коллагена и пролиферация клеток [23].

Важно отметить, что дихотомия М1/М2 представляет собой упрощенную модель. Макрофаги обладают широкой фенотипической и функциональной гетерогенностью, которая не всегда укладывается в рамки этой классификации. Так, макрофаги, ассоциированные с опухолями (ТАМ), не соответствуют строго ни М1-, ни М2-фенотипу. Более того, были обнаружены макрофаги, экспрессирующие рецепторы Т-клеток (TCR) и CD169 на поверхности [24, 25]. Иммунологи также выделяют и другие фенотипы, такие как регуляторные макрофаги (Mreg), обладающие специализированными функциями, особенно в условиях *in vivo* [25, 26].

Таким образом, модель М1/М2 служит лишь концептуальной основой, предложенной для облегчения понимания функционального и фенотипического разнообразия макрофагов и моноцитов, но не отражает всей сложности их биологии.

4. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ МИШЕНИ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

Макрофаги представляют собой динамичную и перспективную терапевтическую мишень при фиброзе печени. Использование интерферирующих РНК для нокдауна ключевых регуляторных генов – таких как фактор раннего ответа на рост 2 (EGR2), интерферон-регуляторные факторы 5 (IRF5) и 3 (IRF3), а также Toll-подобный рецептор 4 (TLR4) – в макрофагах позволяет целенаправленно управлять их поляризацией и тем самым воздействовать на патологический процесс.

EGR2. Выбор гена *EGR2* в качестве терапевтической мишени в макрофагах обусловлен рядом причин. Этот транскрипционный фактор идентифицирован как маркер поляризации макрофагов по типу М2 [27]. Современные исследования показали, что EGR2 играет ключевую роль в устойчивом формировании эпигенетических и транскрипционных программ, преобразующих кратковременные сигналы поляризации в стабильный альтернативный фенотип. Экспрессия *EGR2* существенно усиливается под действием интерлейкина-4 (IL-4) в сочетании с IL-10, что было подтверждено в наших экспериментальных условиях.

Комплексное исследование продемонстрировало, что *EGR2* активируется по сигнальному

каскаду IL-4/STAT6, в котором транзиторная активация STAT6 вызывает длительные изменения транскрипционной активности. EGR2 действует как эффектор нижестоящего звена, способствуя экспрессии множества других транскрипционных факторов, связанных с поляризацией по типу M2. Данный сигнальный путь консервативен как в человеческих, так и в мышинных макрофагах, включая альвеолярные клетки, что делает EGR2 перспективной мишенью для терапии [28, 29].

Как показано в исследованиях Веремейко и подтверждено нашими данными [18], нокдаун EGR2 усиливает поляризацию по типу M1 за счет снижения экспрессии ARG1 и повышения уровней TNF- α и NOS2 как в макрофагах M0, так и M1. В макрофагах типа M2 влияние нокдауна EGR2 было минимальным при условии сильной стимуляции IL-4 и IL-10, что, возможно, обусловлено пределами эффективности РНК-интерференции в краткосрочной перспективе (48–72 ч). Эти данные согласуются с результатами [30], где показано, что подавление другого транскрипционного регулятора – SART1 – смягчает фиброз легких, вызванный блеомицином. Как и EGR2, SART1 функционирует в сигнальной оси STAT6/PPAR- γ , регулирующей альтернативную поляризацию макрофагов.

IRF5. Интерферон-регуляторный фактор 5 (IRF5) – важный транскрипционный фактор, участвующий в реализации врожденного иммунного ответа и формировании воспалительных реакций. Он играет центральную роль в сигнальном каскаде TLR4/липополисахарид (LPS), что делает его ключевым элементом в поляризации макрофагов по типу M1 [31–33]. IRF5 активно исследуется как потенциальная мишень для терапии воспалительных и аутоиммунных заболеваний, включая ревматоидный артрит, воспалительные заболевания кишечника и системную красную волчанку [34].

РНК-интерференция рассматривается как перспективный подход для ингибирования IRF5. В мышинных моделях было показано, что IRF5 усиливает экспрессию NOS2 и активацию Th1-ответа при инфекции *Leishmania donovani* [35]. У мышей с нокаутом IRF5 наблюдается сниженная индукция интерферонов I типа при инфицировании вирусом Ньюкасла [36]. Кроме того, IRF5 необходим для поляризации человеческих макрофагов по типу M1 при бактериальной инфекции. Он регулирует энергетический метаболизм: M1-макрофаги пре-

имущественно используют гликолиз, сопровождающийся накоплением микробицидных метаболитов – итаконата и сукцината, а также стабилизацией HIF1 α . В отличие от них, M2-макрофаги в большей степени зависят от окислительного фосфорилирования [37, 38].

Таким образом, подавление IRF5 представляет интерес для модуляции воспаления и фиброза. В экспериментальных моделях волчанки введение siRNA против IRF5 привело к значительному снижению активности нефрита [39]. В других работах показано, что дефицит IRF5 в миелоидных клетках уменьшает тяжесть фиброза печени в моделях CCl₄-индуцированной токсичности и неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) [40]. Эти эффекты ассоциируются с переходом макрофагов к иммуносупрессивному и антиапоптотическому фенотипу. Наши данные демонстрируют снижение маркеров M1-поляризации (NOS2, IL6, TNF- α) при подавлении IRF5, что подтверждает его значимость как терапевтической мишени. Неожиданно, нокдаун IRF5 также снижал экспрессию ARG1, характерного маркера M2, что противоречит ранее опубликованным данным [41] и требует дальнейших исследований.

IRF3. Интерферон-регуляторный фактор 3 (IRF3) представляет собой ключевой транскрипционный фактор, способный модулировать экспрессию *Irfb1* и ряда других целевых генов через взаимодействие с сигнальным каскадом NF- κ B. Активация IRF3 тесно связана с воздействием вирусных стимулов [42]. Он участвует в запуске синтеза интерферонов I типа и играет важную роль в противовирусных и противоопухолевых иммунных ответах. В физиологических условиях IRF3 экспрессируется в цитоплазме и после активации рецепторами распознавания паттернов (PRR) подвергается димеризации и транслокации в ядро. Там он индуцирует транскрипцию ключевых генов антивирусного ответа, включая IFN- β , IL-23, RANTES (CCL5), IP-10 (CXCL10) и другие. Кроме того, IRF3 способен индуцировать апоптоз, транслоцируясь в митохондрии, где он формирует комплекс с Bax [43].

Наш выбор в пользу исследования эффекта нокдауна IRF3 на поляризацию макрофагов был обусловлен рядом публикаций, указывающих на его защитную роль при печеночном фиброзе. В частности, было показано, что глобальный нокаут IRF3 снижает степень фиброза в моделях

этанол-индуцированного повреждения печени [44], а также в условиях острого и хронического воздействия CCl_4 [45].

В настоящем исследовании нами установлено, что нокдаун *IRF3* значительно влияет на экспрессию маркеров как M1-, так и M2-поляризации макрофагов. Он приводит к снижению экспрессии *NOS2*, *IL-6*, *TNF- α* и *EGR2*, при этом неожиданно усиливая экспрессию *ARG1* в M1-поляризованных макрофагах, где данный маркер обычно подавлен.

Системное влияние нокаута *IRF3* на поляризационные маркеры макрофагов пока недостаточно изучено. В литературе представлены разрозненные данные. Например, не было выявлено значимых различий в уровнях экспрессии *NOS2* в M1- и *ARG1* в M2-макрофагах, полученных из костного мозга диких мышей и *IRF3*-КО мышей [46]. Однако эти данные затрудняют прямое сопоставление с нашими результатами, полученными методом siRNA-опосредованного нокдауна в BMDM, поскольку макрофаги *IRF3*-КО могли развить компенсаторные механизмы. Так, при инфицировании макрофагов, полученных от мышей *IRF3*-КО, *Listeria monocytogenes* не вызывала индукцию *NOS2*, характерную для клеток дикого типа, что, однако, восстанавливалось при добавлении IFN- β [47].

Кроме того, подавление *IRF3* с помощью shRNA предотвращало продукцию активных форм азота в клетках Raw 264.7 в ответ на IL-6. Аналогично, стимуляция TLR3 лигандом поли I:C в макрофагах *IRF3*-/- не вызывала продукцию NO [48]. Механистические исследования показали, что *IRF3* и путь ERK координировано регулируют продукцию NO в ответ на TLR3-стимуляцию [49].

Эти данные подтверждают наше наблюдение о центральной роли *IRF3* в активации ключевых маркеров макрофагальной поляризации. Хотя классические сайты связывания *IRF3* располагаются в промоторах генов интерферонов I типа и *RANTES*, установлено, что в составе комплекса CBP/p300 он также участвует в транскрипции генов, регулируемых NF- κ B. Предполагается, что взаимодействие комплекса ISGF3 и NF- κ B способствует ацетилированию гистона H4 в промоторных зонах *NOS2* и других генов, что опосредует эпигенетическую регуляцию [47]. Это может объяснять снижение экспрессии сразу нескольких маркеров – *NOS2*, *IL-6*, *TNF- α* , *EGR2* – при по-

давлении *IRF3*, которое мы наблюдали в ходе экспериментов.

TLR4. Толл-подобные рецепторы (TLR) представляют собой семейство рецепторов распознавания паттернов (PRR), играющих ключевую роль в инициации врожденного иммунного ответа. Они получили свое название из-за структурного сходства с белком *Toll*, впервые описанным у *Drosophila melanogaster*. TLR способны распознавать как патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP) микробного происхождения, так и эндогенные сигналы опасности (DAMP). Эти рецепторы экспрессируются различными клетками врожденного иммунитета, а также эпителиальными и другими немиелоидными клетками. У человека идентифицировано 10 функциональных TLR, тогда как у мышей – 13 [50].

Сигнальные пути, активируемые TLR, ведут к активации транскрипционного фактора NF κ B и экспрессии провоспалительных цитокинов. В частности, TLR4 может быть активирован различными PAMP, включая липополисахарид (LPS) грамотрицательных бактерий, F-белок респираторно-синцитиального вируса (RSV) и оболочечный белок вируса рака молочной железы у мышей (MMTV). Кроме того, TLR4 способен распознавать эндогенные лиганды, такие как белки теплового шока, низкомолекулярная гиалуроновая кислота и β -дефензин 2.

Сигнальный каскад TLR4 реализуется двумя основными путями:

— *MyD88-зависимый путь*: универсален для всех TLR, за исключением TLR3. Адапторный белок *MyD88*, содержащий TIR-домен, инициирует каскад фосфорилирования, вовлекающий киназы семейства IRAK. В частности, IRAK-4 активирует IRAK-1, который рекрутирует *TRAF6*, активирующий TAK1, далее – ИКК-комплекс (IKK α/β). Это приводит к деградации ингибитора I κ B и активации NF κ B, транслоцирующегося в ядро, где он стимулирует транскрипцию провоспалительных генов [50–52].

— *MyD88-независимый (TRIF-зависимый) путь*: характерен для TLR3 и TLR4. Адаптор *TRIF* активирует NF κ B альтернативным образом, а также взаимодействует с киназами TBK1 и IKK ϵ , которые фосфорилируют транскрипционные факторы *IRF3* и *IRF7*. Последние индуцируют экспрессию

интерферонов I типа и ко-стимулирующих молекул [53, 54].

TLR4 играет ключевую роль в поляризации макрофагов, способствуя формированию провоспалительного M1-фенотипа через активацию NF κ B и индукцию *NOS2*, необходимой для антимикробной активности. Несмотря на то что TLR4 – наиболее изученный среди всех PRR, сложность и контекст-зависимость его сигнальных путей затрудняют точное прогнозирование эффектов его модуляции *in vivo*, будь то супрессия экспрессии (например, RNAi), сверхэкспрессия или стимуляция природными лигандами [51, 53].

HAS2. Гиалуронан-синтаза 2 типа (*HAS2*) – ключевой фермент синтеза гиалуроновой кислоты (гиалуронана, ГК) – важного компонента внеклеточного матрикса (ECM) взрослого организма. В нормальных условиях гиалуронан обеспечивает тканевый гомеостаз, однако при хроническом повреждении печени – алкогольной болезни, вирусных гепатитах или неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) – его метаболизм нарушается. Повышенный синтез ГК, преимущественно звездчатыми клетками печени (HSC) и активированными фибробластами, способствует прогрессированию фиброза [55].

HAS2 – перспективная мишень для фармакологического вмешательства при фиброзе печени и легких, диабете 2 типа и ряде онкологических заболеваний [56]. Избыточная продукция гиалуроновой кислоты в результате нарушенной регуляции *HAS2* оказывает прямое влияние на формирование фиброгенного, пролиферативного и инвазивного фенотипа HSC, действуя через активацию рецептора *CD44* и *TLR4* по аутокринному механизму [57].

Наши данные показывают, что как фармакологическое ингибирование синтеза ГК с использованием 4-метилумбеллиферона, так и *siRNA*-опосредованный нокдаун гена *HAS2* замедляют активацию и дифференцировку HSC в миофибробласты, снижая выраженность фиброзных изменений печени. Кроме того, нокдаун *HAS2 in vivo* вызывает масштабные изменения в транскриптоме, затрагивая сигнальные пути, регулирующие гомеостаз ECM и врожденный иммунитет [58].

Связь *Egr2*, *Fstl1* и *Has2* с *CCL4*-индуцированным фиброзом печени была впервые установлена с использованием *siRNA*-модели нокдауна *in vivo* у

мышей [59]. На первом этапе было отобрано 169 генов, активированных как при фиброзе печени, вызванном *CCL4*, так и при фиброзе почек в модели односторонней обструкции мочеточника. После исключения генов с известной ролью в фиброзе, без человеческих гомологов или без аннотированной функции, оставшиеся 24 гена подверглись нокдауну. Установлено, что снижение экспрессии *Egr2*, *Atp1a2*, *Fkbp10*, *Fstl1* и *Has2* приводит к достоверному снижению экспрессии фиброзных маркеров, в частности, уменьшению площади окрашивания на основной маркер фиброзной ткани – коллаген I типа (*Colla1*).

Таким образом, активация макрофагов и внеклеточные сигнальные механизмы, включая *HAS2*-зависимую продукцию гиалуронана, играют центральную роль в патогенезе фиброза. Эти молекулы представляют собой перспективные терапевтические мишени. Будущие исследования должны быть направлены на разработку методов селективной модуляции их активности с целью замедления или предотвращения прогрессирования фиброзных заболеваний.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спустя более двух десятилетий академических исследований и разработок, антисмысловые олигонуклеотиды (ASO) и малые интерферирующие РНК (*siRNA*) стремительно переходят из экспериментальной стадии в клиническую практику. С 2018 г. одобрено более 13 препаратов, основанных на механизмах RNAi, что дало мощный импульс развитию технологий химического синтеза, конъюгирования и доставки РНК-препаратов в форме наночастиц. Эти достижения значительно расширили спектр потенциальных мишеней и тканей, доступных для терапии [60].

На сегодняшний день проводится около 100 клинических исследований РНК-препаратов, направленных на лечение широкого круга заболеваний – от патологий печени, центральной нервной системы, скелетных мышц, кожи, легких и глаз до онкологических и репродуктивных заболеваний [9]. Особенно активное развитие наблюдается в области терапии редких (орфанных) заболеваний, где традиционные подходы оказываются неэффективными или отсутствуют вовсе.

Помимо орфанных заболеваний, появляются примеры использования *siRNA* в качестве средств долговременной терапии и профилактики рас-

пространенных хронических состояний, таких как гипертония и гиперлипидемия – основных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний. Также разрабатываются siRNA-препараты для терапии фиброза печени; в частности, в качестве терапевтической мишени рассматривается дегидрогеназа стероидов *HSD17B13* (Alnylam, Regeneron, [61]).

Биоорганическая химия играет фундаментальную роль в развитии РНК-терапии, охватывая такие направления, как синтез модифицированных нуклеотидов, химия углеводов для создания целевых конъюгатов, а также липидная химия, необходимая для разработки эффективных систем доставки. Основным вызов на текущем этапе – масштабирование синтеза, оптимизация производственных процессов и переход к крупным клиническим исследованиям как для редких, так и для широко распространенных заболеваний, не имеющих эффективных методов лечения.

За последние полвека в России сформировалась мощная школа биоорганической химии, обеспечивающая необходимые знания и инфраструктуру для активного участия в разработке РНК-препаратов. Это создает прочную основу для включения отечественных научных коллективов в международные исследования и промышленную реализацию RNAi-терапии.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа частично поддержана госзаданием ИБР РАН № 0088-2024-0014.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. // *Nature*. 1998. V. 391. P. 806–811.
<https://doi.org/10.1038/35888>
2. Hannon G.J. // *Nature*. 2002. V. 418. P. 244–251.
<https://doi.org/10.1038/418244a>
3. Zhu Y., Zhu L., Wang X., Jin H. // *Cell Death Dis.* 2022. V. 13. P. 644.
<https://doi.org/10.1038/s41419-022-05075-2>
4. Jadhav V., Vaishnav A., Fitzgerald K., Maier M.A. // *Nat Biotechnol.* 2024. V. 42. P. 394–405.
<https://doi.org/10.1038/s41587-023-02105-y>
5. Egli M., Manoharan M. // *Nucleic Acids Res.* 2023. V. 51. P. 2529–2573.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkad067>
6. Whitehead K.A., Dorkin J.R., Vegas A.J., Chang P.H., Veisheh O., Matthews J., Fenton O.S., Zhang Y., Olejnik K.T., Yesilyurt V., Chen D., Barros S., Klebanov B., Novobrantseva T., Langer R., Anderson D.G. // *Nat Commun.* 2014. V. 5. P. 4277.
<https://doi.org/10.1038/ncomms5277>
7. Nair J.K., Willoughby J.L., Chan A., Charisse K., Alam M.R., Wang Q., Hoekstra M., Kandasamy P., Kel'in A.V., Milstein S., Taneja N., O'Shea J., Shaikh S., Zhang L., van der Sluis R.J., Jung M.E., Akinc A., Hutabarat R., Kuchimanchi S., Fitzgerald K., Zimmermann T., van Berkel T.J., Maier M.A., Rajeev K.G., Manoharan M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. V. 136. P. 16958–16961.
<https://doi.org/10.1021/ja505986a>
8. Hu B., Zhong L., Weng Y., Peng L., Huang Y., Zhao Y., Liang X.J. // *Signal Transduct Target Ther.* 2020. V. 5. P. 101.
<https://doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x>
9. Belgrad J., Fakih H.H., Khvorova A. // *Nucleic Acid Ther.* 2024. V. 34. P. 52–72.
<https://doi.org/10.1089/nat.2023.0068>
10. Padda I.S., Mahtani A.U., Patel P., Parmar M. // *Small Interfering RNA (siRNA) Therapy* / In: StatPearls Publishing. 2025.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK580472/>
11. Lu D., Dou F., Gao J. // *Drug. Discov. Ther.* 2025. V. 19. P. 131–132.
<https://doi.org/10.5582/ddt.2025.01031>
12. Younossi Z.M., Golabi P., Paik J.M., Henry A., Van Dongen C., Henry L. // *Hepatology*. 2023. V. 77. P. 1335–1347.
<https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000004>
13. Vonderlin J., Chavakis T., Sieweke M., Tacke F. // *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2023. V. 15. P. 1311–1324.
<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2023.03.002>
14. Halimani N., Nesterchuk M., Andreichenko I.N., Tsitrina A.A., Elchaninov A., Lokhonina A., Fatkhudinov T., Dashenkova N.O., Brezgina V., Zatsypin T.S., Mikaelyan A.S., Kotelevtsev Y.V. // *Cells*. 2022. V. 11. P. 2498.
<https://doi.org/10.3390/cells11162498>

15. Wynn T.A., Vannella K.M. // *Immunity*. 2016. V. 44. P. 450–462.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>
16. Pakshir P., Hinz B. // *Matrix Biol.* 2018. V. 68–69. P. 81–93.
<https://doi.org/10.1016/J.MATBIO.2018.01.019>
17. Wen Y., Lambrecht J., Ju C., Tacke F. // *Cell. Mol. Immunol.* 2021. V. 18. P. 45–56.
<https://doi.org/10.1038/s41423-020-00558-8>
18. Veremeyko T., Yung A.W.Y., Anthony D.C., Strekalova T., Ponomarev E.D. // *Front Immunol.* 2018. V. 9. P. 2515.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02515>
19. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. // *J. Immunol.* 2000. V. 164. P. 6166–6173.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
20. Murray P.J. // *Annu. Rev. Physiol.* 2017. V. 79. P. 541–566.
21. Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., Taghadosi M., Esmaeili S.-A., Mardani F., Seifi B., Mohammadi A., Afshari J.T., Sahebkar A. // *J. Cell. Physiol.* 2018. V. 233. P. 6425–6440.
<https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
22. Ajay C. // *Circ. Res.* 2010. V. 106. P. 1559–1569.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.216523>
23. Rath M., Müller I., Kropf P., Closs E.I., Munder M. // *Front Immunol.* 2014. V. 5. P. 532.
24. Macrophage Polarization - Mini-Review // *Bio-Rad*.
<https://www.bio-rad-antibodies.com/macrophage-polarization-minireview.html>
25. Orecchioni M., Ghosheh Y., Pramod A.B., Ley K. // *Front Immunol.* 2019. V. 10. P. 1084.
26. Murray P.J., Allen J.E., Biswas S.K., Fisher E.A., Gilroy D.W., Goerdt S., Gordon S., Hamilton J.A., Ivashkiv L.B., Lawrence T., Locati M., Mantovani A., Martinez F., Mege J., Mosser D., Natoli G., Saeij J., Schultze J., Shirley K.A., Sica A., Suttles J., Udalova I., van Ginderachter J.A., Vogel S., Wynn T. // *Immunity*. 2014. V. 41. P. 14–20.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
27. Jablonski K.A., Amici S.A., Webb L.M., Ruiz-Rosado J. de D., Popovich P.G., Partida-Sanchez S., Gueraude-Arellano M. // *PLoS One*. 2015. V. 10. e0145342.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145342>
28. Daniel B., Czimmerer Z., Halasz L., Boto P., Kolostyak Z., Poliska S., Berger W.K., Tzerpos P., Nagy G., Horvath A., Hajas G., Cseh T., Nagy A., Sauer S., Francois-Deleuze J., Szatmari I., Bacsai A., Nagy L. // *Genes Dev.* 2020. V. 34. P. 1474–1492.
<https://doi.org/10.1101/gad.343038.120>
29. Liao J., Hargreaves D.C. // *Genes Dev.* 2020. V. 34. P. 1407–1409.
<https://doi.org/10.1101/gad.345140.120>
30. Pan T., Zhou Q., Miao K., Zhang L., Wu G., Yu J., Xu Y., Xiong W., Li Y., Wang Y. // *Theranostics*. 2021. V. 11. P. 1192–1206.
<https://doi.org/10.7150/thno.48152>
31. Krausgruber T., Blazek K., Smallie T., Alzabin S., Lockstone H., Sahgal N., Hussell T., Feldmann M., Udalova I.A. // *Nat. Immunol.* 2011. V. 12. P. 231–238.
<https://doi.org/10.1038/ni.1990>
32. Weiss M., Blazek K., Byrne A.J., Perocheau D.P., Udalova I.A. // *Mediators Inflamm.* 2013. V. 2013. P. 245804.
<https://doi.org/10.1155/2013/245804>
33. Saliba D.G., Heger A., Eames H.L., Oikonomopoulos S., Teixeira A., Blazek K., Androulidaki A., Wong D., Goh F.G., Weiss M., Byrne A., Pasparakis M., Ragoussis J., Udalova I.A. // *Cell Rep.* 2014. V. 8. P. 1308–1317.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.034>
34. Almuttaqi H., Udalova I.A. // *FEBS J.* 2019. V. 286. P. 1624–1637.
<https://doi.org/10.1111/FEBS.14654>
35. Paun A., Bankoti R., Joshi T., Pitha P.M., Stäger S. // *PLoS Pathog.* 2011. V. 7.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001246>
36. Paun A., Reinert J.T., Jiang Z., Medin C., Balkhi M.Y., Fitzgerald K.A., Pitha P.M. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 14295–14308.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M800501200>
37. Hedl M., Yan J., Witt H., Abraham C. // *J. Immunol.* 2019. V. 202. P. 920–930.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800226>
38. Viola A., Munari F., Sánchez-Rodríguez R., Scolaro T., Castegna A. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. 1462.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01462>
39. Guiteras J., Ripoll É., Bolaños N., De Ramon L., Fontova P., Lloberas N., Cruzado J.M., Aràn J.M., Aviñó A., Eritja R., Gomà M., Taco R., Grinyó J.M., Torras J. // *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2021. V. 24. P. 807–821.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.03.019>
40. Alzaid F., Lagadec F., Albuquerque M., Ballaire R., Orliaguet L., Hainault I., Blugeon C., Lemoine S., Lehuen A., Saliba D.G., Udalova I.A., Paradis V., Foufelle F., Venteclef N. // *JCI Insight*. 2016. V. 1.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.88689>
41. Sun K., Qu J., Chen J., Dang S., He S., Zhang J., Xie R., Wang Y., Zhang J. // *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2017. V. 33. P. 168–173.
42. Günthner R., Anders H.J. // *Mediators Inflamm.* 2013. V. 2013. P. 731023.
<https://doi.org/10.1155/2013/731023>
43. Petro T.M. // *J. Immunol.* 2020. V. 205. P. 1981–1989.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000462>
44. Petrasek J., Dolganiuc A., Csak T., Nath B., Hritz I., Kodys K., Catalano D., Kurt-Jones E., Mandrekar P., Szabo G. // *Hepatology*. 2011. V. 53. P. 649–660.
<https://doi.org/10.1002/hep.24059>
45. Iracheta-Vellve A., Petrasek J., Gyongyosi B., Satishchandran A., Lowe P., Kodys K., Catalano D., Calenda C.D., Kurt-Jones E.A., Fitzgerald K.A., Szabo G. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. P. 26794–26805.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.736991>

46. Yanai H., Chiba S., Hangai S., Kometani K., Inoue A., Kimura Y., Abe T., Kiyonari H., Nishio J., Taguchi-Atarashi N., Mizushima Y., Negishi H., Grosschedl R., Taniguchi T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. P. 5253–5258.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1803936115>
47. Farlik M., Reutterer B., Schindler C., Greten F., Vogl C., Müller M., Decker T. // *Immunity*. 2010. V. 33. P. 25–34.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.07.001>
48. Moore T.C., Petro T.M. // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. P. 3014–3020.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.025>
49. Freed S.M., Baldi D.S., Snow J.A., Athen S.R., Guinn Z.P., Pinkerton T.S., Petro T.M., Moore T.C. // *FEBS Lett.* 2021. V. 595. P. 2665–2674.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.14200>
50. Lu Y.C., Yeh W.C., Ohashi P.S. // *Cytokine*. 2008. V. 42. P. 145–151.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
51. Fitzgerald K.A., Kagan J.C. // *Cell*. 2020. V. 180. P. 1044–1066.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>
52. Leifer C.A., Medvedev A.E. // *J. Leukoc. Biol.* 2016. V. 100. P. 927–941.
<https://doi.org/10.1189/jlb.2MR0316-117RR>
53. Takaoka A., Yanai H., Kondo S., Duncan G., Negishi H., Mizutani T., Kano S., Honda K., Ohba Y., Mak T.W., Taniguchi T. // *Nature*. 2005. V. 434. P. 243–249.
<https://doi.org/10.1038/nature03308>
54. Kolb J.P., Casella C.R., SenGupta S., Chilton P.M., Mitchell T.C. // *Sci. Signal*. 2014. V. 7.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2005442>
55. Gudowska M., Gruszevska E., Panasiuk A., Cylwik B., Flisiak R., Świdorska M., Szmitkowski M., Chrostek L. // *Clin. Exp. Med.* 2016. V. 16. P. 523–528.
<https://doi.org/10.1007/s10238-015-0388-8>
56. Caon I., Bartolini B., Parnigoni A., Caravà E., Moretto P., Viola M., Karousou E., Vigetti D., Passi A. // *Semin. Cancer Biol.* 2020. V. 62. P. 9–19.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.007>
57. Yang Y.M., Noureddin M., Liu C., Ohashi K., Kim S.Y., Ramnath D., Powell E.E., Sweet M.J., Roh Y.S., Hsin I.F., Deng N., Liu Z., Liang J., Mena E., Shouhed D., Schwabe R.F., Jiang D., Lu S.C., Noble P.W., Seki E. // *Sci. Transl. Med.* 2019. V. 11.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat9284>
58. Halimani N., Nesterchuk M., Tsitrina A.A., Sabirov M., Andreichenko I.N., Dashenkova N.O., Petrova E., Kulikov A.M., Zatsepin T.S., Romanov R.A., Mikaelyan A.S., Kotelevtsev Y.V. // *Sci. Rep.* 2024. V. 14. P. 2797.
<https://doi.org/10.1038/s41598-024-53089-x>
59. Vollmann E.H., Cao L., Amatucci A., Reynolds T., Hamann S., Dalkilic-Liddle I., Cameron T.O., Hosbach M., Kauffman K.J., Mir F.F., Anderson D.G., Novobrantseva T., Koteliensky V., Kisseleva T., Brenner D., Duffield J., Burkly L.C. // *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2017. V. 7. P. 314–323.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.04.014>
60. Li C., Sun S., Kong H., Xie X., Liang G., Zhang Y., Wang H., Li J. // *RSC Chem. Biol.* 2024. V. 6. P. 73–80.
<https://doi.org/10.1039/d4cb00247d>
61. Alnylam and Regeneron.
<https://investors.alnylam.com/press-release?id=26976>

RNA-Interference as a Method for Validation of Pharmacological Targets in Fibrosis Treatment

A. S. Mikaelyan*, N. Halimani**, V.V. Fedorova**, and Y. V. Kotelevtsev**, #

Phone: +7 (916) 438-19-03; email: y.kotelevtsev@skoltech.ru

* Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova, 26, Moscow, 119334, Russia

** Skolkovo Institute of Science and Technology, Bol'shoj bulv., 30/1, Moscow, 121205 Russia

RNA interference (RNAi) is an evolutionarily conserved mechanism of gene expression silencing based on the degradation of mRNA by small interfering RNAs (siRNAs). The discovery of this mechanism has not only become a powerful tool for fundamental research in biology, but has also opened up new perspectives for therapeutic medicine. In terms of efficacy and safety, siRNA therapy represents a promising alternative to traditional pharmaceutical approaches. Unlike traditional pharmacological approaches, which are often characterized by systemic toxicity and low specificity, siRNA-based therapy allows for the selective suppression of genes associated with pathologies, providing highly precise action and low toxicity. The use of siRNA to modulate the activity of macrophages, key effectors of innate immunity that play a central role in the development of liver fibrosis, represents particular interest. Due to their high plasticity, macrophages are able to polarize into proinflammatory (M1) or anti-inflammatory (M2) phenotypes, which determines their contribution to the progression or regression of fibrosis. Epigenetic modifications and suppression of key polarization regulators (such as EGR2, IRF5, IRF3, TLR4, HAS2) using siRNA allow targeted changes in their functional state. This review systematizes current data on the role of macrophages in the pathogenesis of liver fibrosis and the prospects for using siRNA therapy to control their activity. Strategies for precision targeting of key molecular targets are discussed, opening up new possibilities for the development of pathogenetically justified treatment methods.

Keywords: RNA interference, short interfering RNA, lipid nanoparticles, fibrosis, macrophages