

**АСААД ВАЛАА**

**ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА И ГЕТЕРОГЕННОСТИ  
ГОРМОНАЛЬНО-АКТИВНЫХ И НЕАКТИВНЫХ АДЕНОМ ГИПОФИЗА  
НА ТРАНСКРИПТОМНОМ УРОВНЕ**

3.1.19 Эндокринология

1.5.3. Молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в Государственном научном центре Российской Федерации  
Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский  
исследовательский центр эндокринологии имени академика И.И. Дедова» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации.

**Научные руководители:**

**Пигарова Екатерина Александровна**, доктор медицинских наук, доцент

**Попов Сергей Владимирович**, кандидат биологических наук

**Официальные оппоненты:**

**Астафьева Людмила Игоревна**, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник 8-го  
нейрохирургического отделения (базальные опухоли), профессор кафедры нейрохирургии и  
нейронаук Федерального государственного автономного учреждения "Национальный  
медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко"  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Кондратьева Лия Германовна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории  
структуры и функций генов человека Федерального государственного бюджетного учреждения  
наук "Государственный Научный Центр Российской академии наук, институт биоорганической  
химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова"

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный  
центр имени академика Н.П. Бочкова»

Защита диссертации состоится «...» ..... 2025 года в 14:00 часов на заседании диссертационного  
совета 21.1.045.01 в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России  
по адресу: 117292, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д.11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им.  
академика И.И. Дедова» Минздрава России – [www.endocrincentr.ru](http://www.endocrincentr.ru) .

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 года

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

Мазурина Наталия Валентиновна

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследования**

Нейроэндокринные новообразования (НЭН) — гетерогенная группа опухолей, возникающих из нейроэндокринных клеток (НК). Среди них выделяют нейроэндокринные опухоли гипофиза (НЭОГ) и феохромоцитому (ФХЦ). Заболеваемость НЭН растёт, что связано с улучшением диагностики.

scRNA-seq позволяет изучать транскрипционные профили отдельных клеток, выявляя клеточные субпопуляции и их состояния, что важно для понимания механизмов развития и реакции опухолей на терапию. Этот метод особенно актуален для изучения гетерогенных опухолей, таких как НЭОГ. scRNA-seq помогает идентифицировать молекулярные особенности аденом гипофиза, включая их гормональную активность, устойчивость к терапии и потенциальные биомаркеры. Также метод позволяет исследовать микроокружение опухоли, что может выявить новые мишени для терапии.

Применение scRNA-seq открывает перспективы для персонализированной медицины, учитывающей молекулярные особенности заболевания.

### **Цель работы**

Целью данной работы являлось проведение сравнительного анализа транскриптомов единичных клеток гормонально-активных и неактивных аденом гипофиза для выявления новых клеточных субпопуляций и генетических полиморфизмов.

### **Задачи исследования**

1. Проанализировать технологические подходы к диссоциации нейроэндокринных новообразований, таких как аденомы гипофиза и феохромоцитомы, для получения клеточной суспензии единичных клеток из послеоперационного и криоконсервированного материала.
2. Сопоставить клинические проявления и иммуногистохимические характеристики у пациентов с гормонально-активными и неактивными аденомами гипофиза.
3. Провести сравнительный анализ основных клеточных популяций и ранее не обнаруженных подтипов аденоцитов в гормонально-активных и неактивных аденомах гипофиза с использованием технологии секвенирования единичных клеток.

4. Провести анализ копийности (вариации числа копий генов (CNV)) в единичных клетках гормонально-активных и неактивных аденомах гипофиза.

5. Изучить однонуклеотидные генетические полиморфизмы в клеточных кластерах единичных клеток гормонально-активных и неактивных аденом гипофиза.

### **Научная новизна**

1. Впервые оптимизирована и успешно применена методика выделения единичных клеток (ACME HS) из свежзамороженных нейроэндокринных опухолей (НЭОГ и феохромоцитомы) для scRNA-seq анализа. Это значительно упрощает логику работы с послеоперационным опухолевым материалом.

2. Выявлены ранее неидентифицированные клеточные кластеры, характерные для гормонально-неактивных аденом гипофиза. Описана их роль в прогрессии и развитии опухоли, а также охарактеризованы про- и противоопухолевые кластеры кортикотропных клеток.

3. Определены клеточные кластеры с хромосомными перестройками (делеции, дупликации) и обнаружены клетки с патогенными вариантами в гене *GNAS*.

4. Выявлены функциональные отличия между гормонально-активными и неактивными аденомами гипофиза, включая активацию путей деградации протеасом в гормонально-неактивных опухолях.

### **Теоретическая и практическая значимость**

1. Разработанный метод уксусно-метанольной диссоциации ACME HS позволяет эффективно изучать нейроэндокринные новообразования, такие как НЭОГ и ФХЦ после их биобанкирования.

2. Объединение данных scRNA-seq с традиционной иммуногистохимией (ИГХ) повышает точность диагностики при НЭОГ, что приводит к более точной классификации, совершенствованию протоколов лечения и улучшению результатов лечения пациентов.

3. Детальная идентификация клеточного состава, межопухолевой и внутриопухолевой гетерогенности, а также геномных модификаций в тканях НЭОГ позволяет получить важнейшие представления о биологии опухоли. Эти знания помогают прояснить механизмы, лежащие в основе

прогрессирования, рецидива, инвазивности, реакции на лечение или резистентности к нему, что является основой для разработки терапевтических стратегий.

### **Личное участие автора в получении научных результатов**

Автор работы принимал непосредственное участие в проведении исследования на всех этапах: участие в постановке задач и выборе методов исследования, проведение экспериментальных работ, и интерпретация полученных результатов. Автором самостоятельно выполнен основной объем исследований - ключевые эксперименты (подготовка суспензий единичных клеток, выделение РНК, подготовка кДНК-библиотек и т.д.). Также автор внес существенный вклад в написание и редактирование научных публикаций по теме диссертации. Некоторые эксперименты были осуществлены совместно с коллегами: проточная цитометрия единичных клеток была выполнена совместно с М.Ю. Логиновой, биоинформатический анализ данных scRNA-seq был сделан совместно Р.М. Девятяровым, описание клинической картины выбранных пациентов было выполнено совместно с Н.В. Пачуашвили.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Метод ACME HS позволяет эффективно выделять неповрежденные единичные клетки из криоконсервированных образцов нейроэндокринных опухолей, таких как НЭОГ и ФХЦ, сохраняя целостность РНК и обеспечивая надежное профилирование экспрессии генов.
2. Выявлены специфические кластеры клеток НЭОГ, связанные с инициацией и прогрессией опухоли, а также их уникальные функциональные особенности, что подчеркивает сложную клеточную архитектуру и их регуляторные механизмы.
3. Полученные данные указывают на функциональные отличия гормонально-активных и гормонально-неактивных аденом гипофиза на уровне единичных клеток, в частности, отличительной особенностью, характеризующей гормонально неактивные типы НЭОГ является активация клеточных путей деградации протеасом.
4. НЭОГ демонстрируют разнообразные профили геномных перестроек, что указывает на наличие внутриопухолевой гетерогенности. Также были выявлены кластеры с повышенной частотой геномных перестроек.

5. Были идентифицированы клеточные кластеры НЭОГ с мутациями в гене *GNAS*. Эти клеточные кластеры играют важную роль в прогрессировании опухоли и лекарственной устойчивости.

### **Апробация результатов**

Официальная апробация диссертационной работы состоялась 04 февраля 2025 года на расширенной межкафедральной научной конференции ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России.

Результаты работы представлены в виде устных докладов на международных конгрессах: 14-я Международная Мультиконференция «Биоинформатика регуляции и структуры геномов» / системная биология (Новосибирск, 2024 г.), Конференция сирийских исследователей-экспатриантов (Дамаск, Сирия, 2024 г.), и в виде устных докладов на Российских конгрессах: Вычислительная биология и искусственный интеллект для персонализированной медицины (Москва, 2024 г.), и IX Молодежная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2024 г.).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы в рецензируемых научных изданиях, включенных в перечень рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, 1 тезис в сборниках зарубежных конференций, 1 тезис в сборниках российских конференций.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 128 страницах, и состоит из введения и обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов и заключения, выводов и практических рекомендаций. Библиография включает 178 литературных источника. Диссертация иллюстрирована 4 таблицами и 32 рисунками.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Дизайн исследования**

В соответствии с поставленной целью и задачами проведено одномоментное исследование, состоящее из двух этапов.

На первом этапе данного исследования была проведена разработка и оптимизация метода диссоциации ACME HS для получения интактных единичных клеток из свежемороженых опухолевых тканей, хранящихся в биобанке ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России. Эффективность метода ACME HS оценивали на различных типах нейроэндокринных тканевых образцов и сравнивали с двумя широко применяемыми в протоколах scRNA-seq методами диссоциации: методом выделения ядер и ферментативной диссоциацией. Для сравнения эффективности данных методов, были проанализированы следующие ключевые параметры: сохранение высококачественной РНК (оцененное по интегральному индексу целостности РНК, RIN), способность получать высококачественные суспензии единичных клеток (путем экспериментального контроля качества с использованием методов проточной цитометрии), а также пригодность полученных суспензий для проведения scRNA-seq и последующего транскриптомного анализа.

На втором этапе исследования был проведен сравнительный анализ транскриптомов 10 образцов аденом гипофиза с использованием scRNA-seq и последующей обработки данных. В исследование были включены как гормонально-активные, так и гормонально-неактивные аденомы гипофиза: 3 гормонально-активные соматотропиномы, 3 гормонально-активные кортикотропиномы, 2 гормонально-неактивные соматотропиномы и 2 гормонально-неактивные гонадотропиномы.

### **Условия проведения**

Работа выполнена с использованием современного оборудования и методов молекулярной биологии, генетики и цитологии (выделение тотальной РНК, подготовка суспензий единичных клеток, проточная цитометрия, подготовка кДНК-библиотек, секвенирование, ИГХ), а также биоинформатических методов (анализ данных scRNA-seq, CNV анализ и поиск однонуклеотидных

полиморфизмов). Суспензии единичных клеток были получены из свежих и свежемороженых образцов НЭОГ и ФХЦ. Свежемороженые образцы хранились при  $-80^{\circ}\text{C}$  до последующей диссоциации в Центре биобанкирования эндокринных патологий ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России (зав. – к.м.н. Е.В. Бондаренко). Образцы были процессированы методом scRNA-seq в соответствии с процедурой, описанной в разделах 2.4.1-2.4.5, в Лаборатории общей, молекулярной и популяционной генетики (руководитель лаборатории - к.б.н. С.В. Попов). Биоинформатический анализ был выполнен с использованием ресурсов серверного пространства для хранения и обработки данных на базе ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России.

### **Образцы**

25 образцов нейроэндокринных опухолей человека, включая 10 НЭОГ и 15 ФХЦ были получены после оперативного лечения в отделе хирургии ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России (директор – академик РАН Н.Г. Мокрышева). У всех пациентов диагноз был подтвержден на основании клинико-инструментального, гистологического и иммуногистохимического исследования. Каждый участник исследования дал письменное информированное согласие.

### **Реагенты**

**Буферы:** HBSS, 3xSSC, 1xDPBS (без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ), буферы для разведения антител и окрашивания PI/RNase.

**Ферменты и ингибиторы Рибонуклеаз (РНКаэ):** Фермент D, ингибитор RiboLock.

**Дополнительные реагенты для приготовления буферов:** DTT, BSA, NAC, HEPES, глюкоза, сахароза, DMSO, FBS.

**Другие реагенты и наборы:** Метанол, PI, CFSE, Tissue Storage Solution, раствор для лизиса эритроцитов, Dead Cell Removal Kit, Multi Tissue Dissociation Kit, Chromium Next GEM Single Cell 3'GEM Kit (10x Genomics), AllPrep DNA/RNA Mini Kit, Qubit dsDNA HS Assay Kit, DNA HS (1–6000



bp) Kit, S4 Reagent Kit (Illumina), Anti-CYP11B1, антитела к TSH (4C1), AlexaFluor 594 (Abcam), Hoechst 33342, формалин, гематоксилин, эозин.

### **Оборудование**

**Оборудование для подготовки образцов:** gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec), микротом HM 355 S (Thermo Fisher), Countess 3, Olympus FV3000, NovoCyte 2060R, Agilent 5200.

**Оборудование для гистологических исследований:** Leica ASP6025, Leica Aperio AT2

**Оборудование для секвенирования:** 10x Chromium Controller, Illumina NovaSeq 6000.

### **Методы исследования**

**Получение суспензий единичных клеток методом уксусно-метанольной диссоциации (ACetic-MEthanol High Salt, ACME HS)**

Свежезамороженные ткани ФХЦ (200–250 мг) и НЭГО (5–10 мг) измельчали на льду и сразу помещали в раствор ACME (15% метанол, 0,1 М уксусная кислота, глицерин, NAC, вода без РНКаз, до 10 мл). Диссоциация проходила при комнатной температуре на шейкере (35 об/мин, 1 ч), с пипетированием 2–4 раза. После центрифугирования (1000g, 5 мин, 4°C) осадок промывали 2–4 мл холодного 3хSSC\* буфера (3хSSC, 40 mM DTT, 1% BSA, 0,5 ЕД/мкл ингибитора РНКазы), затем ресуспендировали. Гомогенат фильтровали через фильтры 70 и 40 мкм, центрифугировали (1000g, 7 мин, 4°C) и ресуспендировали в 1–2 мл 3хSSC\*.

**Получение суспензий единичных клеток методом ферментативной диссоциации**

Образцы свежей опухолевой ткани ФХЦ и НЭОГ диссоциировали с ферментом D при 37°C в течение 7–30 минут, с периодическим пипетированием. Гомогенаты фильтровали через 70 мкм фильтр, промывали буфером с FBS, HEPES и глюкозой, затем центрифугировали (300g, 5 мин, 4°C). При необходимости проводили лизис эритроцитов и удаление мертвых клеток. Жизнеспособность оценивали по окрашиванию трипановым синим. Клетки ресуспендировали в 100–400 мкл промывочного буфера.

### **Метод ядерной экстракции из свежемороженых образцов**

Свежемороженные ткани НЭОГ и ФХЦ измельчали на льду и гомогенизировали в gentleMACS Dissociator с гипотоническим буфером. После двукратной гомогенизации образцы инкубировали на льду, добавляли изотонический буфер, фильтровали через 70 мкм фильтр и центрифугировали (1000g, 5 мин, 4°C). Осадок ресуспендировали в 1хDPBS с 1% BSA, фильтровали через 30 мкм фильтр и снова ресуспендировали в 100–400 мкл того же буфера.

### **Фиксация клеток метанолом и криоконсервация методом ACME HS**

Для фиксации метанолом использовали 200 мкл предварительно приготовленных ферментативно-диссоциированных клеток в буфере для промывки с добавлением 0,5 ед./мкл ингибитора РНКазы. К клеткам по каплям добавляли ледяной 100% метанол в объеме 800 мкл при слабом вортировании для предотвращения слипания клеток. Фиксированные клетки хранили при –80°C. Для криоконсервации методом ACME HS к 900 мкл клеточной суспензии в буфере 3хSSC\* добавляли 10% DMSO и криоконсервировали. Криоконсервированные клетки хранили при –80°C.

### **Выделение и качественная оценка тотальной РНК**

Для оценки индекса целостности РНК (RIN) образцов выделяли РНК из клеточных суспензий, приготовленных методами ACME HS и ферментативной диссоциации. РНК выделяли из свежеприготовленных клеток сразу после диссоциации (день 0), и спустя 1, 3, 7, 14 и 28 дней хранения (–80°C) из криоконсервированных и фиксированных в метаноле клеток, полученных с применением методов ACME HS и ферментативной диссоциации, соответственно.

### **Иммуногистохимическое окрашивание**

Образцы опухолевой ткани фиксировали в 10% формалине, обрабатывали в гистологическом процессоре Leica ASP6025 и заливали парафином. Затем из парафиновых блоков с опухолевой тканью делали срезы толщиной 3 мкм с помощью микротомы и наносили их на предметные стекла, обработанные поли-L-лизин. Стекла окрашивали гематоксилином и эозином

согласно протоколу производителя. Для ИГХ исследования применяли антитела к транскрипционным факторам НЭОГ – PIT1, TPIT1, SF-1 и антитела к гормонам – СТГ, ПРЛ, АКТГ, ТТГ, ЛГ и ФСГ. Все гистологические стекла сканировали с помощью системы Leica Aperio AT2 с 20-кратным увеличением для дальнейшего анализа.

### **Проточная цитометрия**

Клетки опухолей НЭОГ и ФХЦ, полученные методами АСМЕ HS и ферментативной диссоциации, ресуспендировали в 1хDPBS с 0,1% FBS (1 млн клеток/мл) и инкубировали с 2 мкМ CFSE при 37°C в течение 5 минут. Затем клетки дважды промывали холодным буфером и окрашивали PI (10 мкг/мл) в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте. Проточный цитометрический анализ проводили на системе NovoCyte 2060R с возбуждением CFSE и PI лазером 488 нм. Использовали программную компенсацию спектрального перекрытия и калибровку с частицами NovoCyte QC. Порог установлен по FSC-H, скорость потока — минимальная, проанализировано  $\geq 10\,000$  событий. Деконволюцию ДНК-гистограмм проводили с помощью программного пакета NovoExpress.

### **Подготовка клеточных суспензий для загрузки на станцию для работы с единичными клетками 10x Chromium Controller**

Криоконсервированные и фиксированные метанолом клетки размораживали и центрифугировали при 2000g в течение 5 минут при 4°C для удаления 3хSSC\*/ДМСО и метанола. Полученный осадок ресуспендировали в холодном буфере 3хSSC\* до концентрации 2000 клеток или ядер на 1 мкл.

### **Подготовка библиотек sn/scRNA-seq с использованием технологии 10x Genomics**

Для каждого образца использовали ~10 000 клеток или ядер ( $\approx 2000$ /мкл) в холодном буфере 3хSSC. РНК смешивали с мастер-миксом для ОТ-ПЦР и 3'-гелевыми частицами с молекулярными и клеточными баркодами, инкапсулировали в масляные капли и загружали в чип Chromium Chip G (10x Genomics). Библиотеки кДНК для оценки экспрессии генов готовили по протоколу 10x Genomics. Их количественную и качественную оценку проводили с помощью Qubit dsDNA HS

Assay Kit и Agilent Fragment Analyzer с DNA HS Kit. Библиотеки мультиплексировали и секвенировали на Illumina NovaSeq 6000 (S4 Reagent Kit, 200 циклов) с покрытием  $\geq 20\,000$  ридов на клетку.

### **Анализ транскриптомов единичных опухолевых клеток надпочечника (ФХЦ) и гипофиза (НЭОГ)**

Данные секвенирования анализировали в Cell Ranger (v6.1.1), матрицы экспрессии обрабатывали в Seurat (v4.9.9, v5.0.0) с нормализацией и масштабированием. Фильтрация клеток выполнялась в pagoda2 (v1.0.11), дубликаты и амбиентная РНК устранялись с помощью scrublet, SoupX и decontX. Образцы интегрировали через RunHarmony, клеточные типы определяли в Conos (v1.5.0). Скорость транскрипции оценивали в Velocity и scVelo. Дифференциальную экспрессию и фазу клеточного цикла анализировали в Seurat, функциональное обогащение — в clusterProfiler и WikiPathways. CNV-анализ проводили с использованием Numbat (v1.4.0).

### **Анализ маркерных генов клеточной гибели и стресса**

Функция PercentageFeatureSet с параметрами по умолчанию из пакета Seurat использовалась для оценки влияния различных методов — АСМЕ HS, ферментативной диссоциации и ядерной экстракции — на клеточный стресс, некроз или апоптоз. Эта функция вычисляет долю всех транскриптов, соответствующих определенной группе генов. В зависимости от опубликованных данных, мы выбрали основные гены-маркеры для выявления признаков апоптоза ([Kiraz, Adan et al., 2016](#)), некроза ([Nikoletopoulou, Markaki et al., 2013](#)), клеточного стресса, включая окислительный стресс, клеточное старение ([Kanehisa, Sato et al., 2019](#), [Kanehisa, Furumichi et al., 2021](#)), повреждение ДНК, тепловой шок ([Kampinga, Hageman et al., 2009](#), [Yer, Baloglu et al., 2018](#)) и фолдинга белковых молекул ([Kanehisa, Sato et al., 2019](#), [Kanehisa, Furumichi et al., 2021](#)). Используя парный тест Уилкоксона, мы рассчитали статистически значимые различия в значениях сигнатур между различными методами диссоциации.

## **Статистический анализ данных**

Все данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. Статистическая значимость (оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна — Уитни) показана на рисунках: \*\*\*\* ( $0,0001 < p < 0,001$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $0,001 < p < 0,01$ ), \* ( $0,01 < p < 0,05$ ), ns — не значимо -  $p > 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

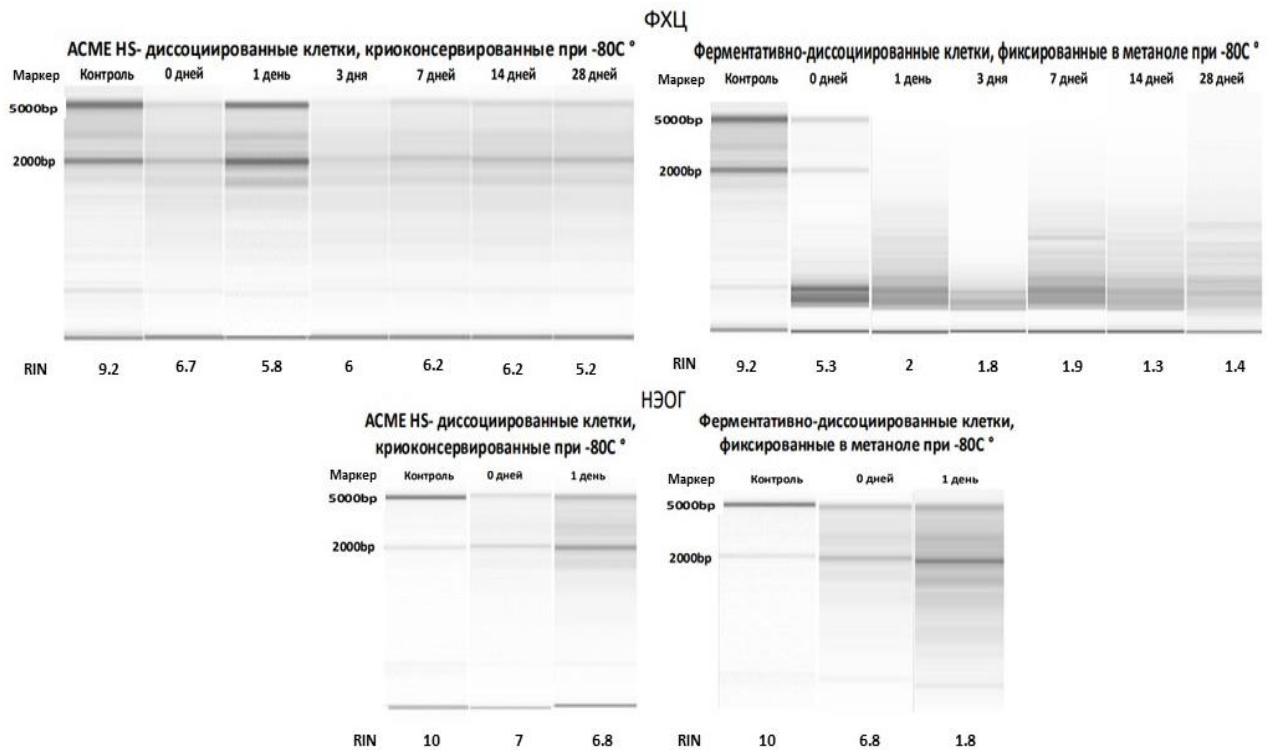
### **Разработка методов пробоподготовки свежих и свежемороженных нейроэндокринных опухолевых тканей**

Одним из ключевых ограничений в приготовлении суспензии единичных клеток на сегодняшний день является отсутствие методологии одновременной фиксации и диссоциации клеток, которые бы сохраняли высокий RIN и включали минимум артефактов.

Для получения суспензии единичных клеток нами разработан протокол ACME HS, позволяющий выделять клетки из замороженной ткани с целостной структурой их РНК. Метод оптимизирован для эндокринных тканей надпочечника и гипофиза, но применим и к другим тканям. Протокол включает оптимизацию времени диссоциации, добавление N-ацетил-цистеина и этапы фильтрации в буфере 3xSSC с DTT и BSA.

### **Получение фиксированных единичных клеток с высоким индексом целостности РНК с помощью метода ACME HS диссоциации**

Для оценки показателя RIN на уровне единичных клеток были использованы послеоперационные опухолевые образцы НЭОГ и ФХЦ. Каждая ткань была разделена на две части: одну обрабатывали методом ферментативной диссоциации, другую замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  для последующей обработки методом ACME HS. Полученные клеточные суспензии делили на аликвоты: для ФХЦ — шесть (0, 1, 3, 7, 14 и 28 дней), для НЭОГ — две (0 и 1 день) из-за ограниченного объема ткани. Анализ тотальной РНК из свежих суспензий (0 день) показал сопоставимые значения RIN для обоих методов: 7 и 6,8 для НЭОГ, 6,7 и 5,3 для ФХЦ.



**Рисунок 1.** Электрофореграммы фрагментов РНК единичных клеток, полученных с помощью ферментативной диссоциации и метода ACME HS. А. Электрофоретическое разделение фрагментов РНК, полученных из клеточных суспензий НЭОГ и ФХЦ методом ферментативной диссоциации с последующей фиксацией в 80% метаноле при -80° С. Б. Электрофоретическое разделение фрагментов РНК, полученных из клеточных суспензий НЭОГ и ФХЦ с методом ACME HS с последующей криоконсервацией в 3SSC\* и 10% DMSO при -80°С. RIN измерялся сразу после приготовления клеточной суспензии (0 день) и после 1, 3, 7, 14 и 28 дней фиксации или криоконсервации (-80°С) клеток, полученных из ФХЦ. RIN для клеточных суспензий из НЭОГ был оценен сразу после приготовления суспензии единичных клеток (0 день) и спустя 1 день после фиксации или криоконсервации. В качестве контрольного значения RIN использовалась тотальная РНК выделенная из свежей ткани НЭОГ и ФХЦ.

Анализ качества РНК (RIN) показал, что ACME HS и ферментативная диссоциация дают сопоставимые результаты: RIN 7 и 6,8 для НЭОГ, 6,7 и 5,3 для ФХЦ (Таблица 1). Оценена возможность криоконсервации клеточных суспензий, полученных методом ACME HS. После

хранения при  $-80^{\circ}\text{C}$  RIN клеток ФХЦ через 1, 3, 7, 14 и 28 дней оставался высоким ( $\sim 6,2$ ) по сравнению с ферментативной диссоциацией ( $\sim 2,3$ ). Для НЭОГ RIN составил  $\sim 6,8$  против  $\sim 1,4$ , соответственно.

Таблица 1. Значения RIN для ферментативно-диссоциированных и фиксированных в метаноле клеток, полученных из ФХЦ и НЭОГ

Значения RIN для ACME HS-диссоциированных и криоконсервированных клеток, полученных из ФХЦ				Значения RIN для диссоциированных ферментами и обработанных метанолом клеток, полученных из ФХЦ			
Интервалы	RIN	Концентрация РНК (нг/мкл)	% рибосомальной РНК	интервалы	RIN	Концентрация РНК (нг/мкл)	% рибосомальной РНК
0 дней	6,7	13,4	44,3	0 дней	5,3	4,43	9
1 день	5,8	31	34,4	1 день	2	2,3	0
3 дня	6	13,7	30,8	3 дня	1,8	3,24	0
7 дней	6,2	15,9	33,7	7 дней	1,9	11	0
14 дней	6,2	13,9	32,1	14 дней	1,3	8,47	0
28 дней	5,8	15,5	28,7	28 дней	1,4	1,95	0
Значения RIN для ACME HS-диссоциированных и криоконсервированных клеток, полученных из НЭОГ				Значения RIN для диссоциированных ферментами и обработанных метанолом клеток, полученных из НЭОГ			
Интервалы	RIN	Концентрация РНК (нг/мкл)	% рибосомальной РНК	интервалы	RIN	Концентрация РНК (нг/мкл)	% рибосомальной РНК
0 дней	7	12,1	36,5	0 дней	6,8	1,94	37,5
1 день	6,8	65	34,7	1 день	1,4	2,05	0

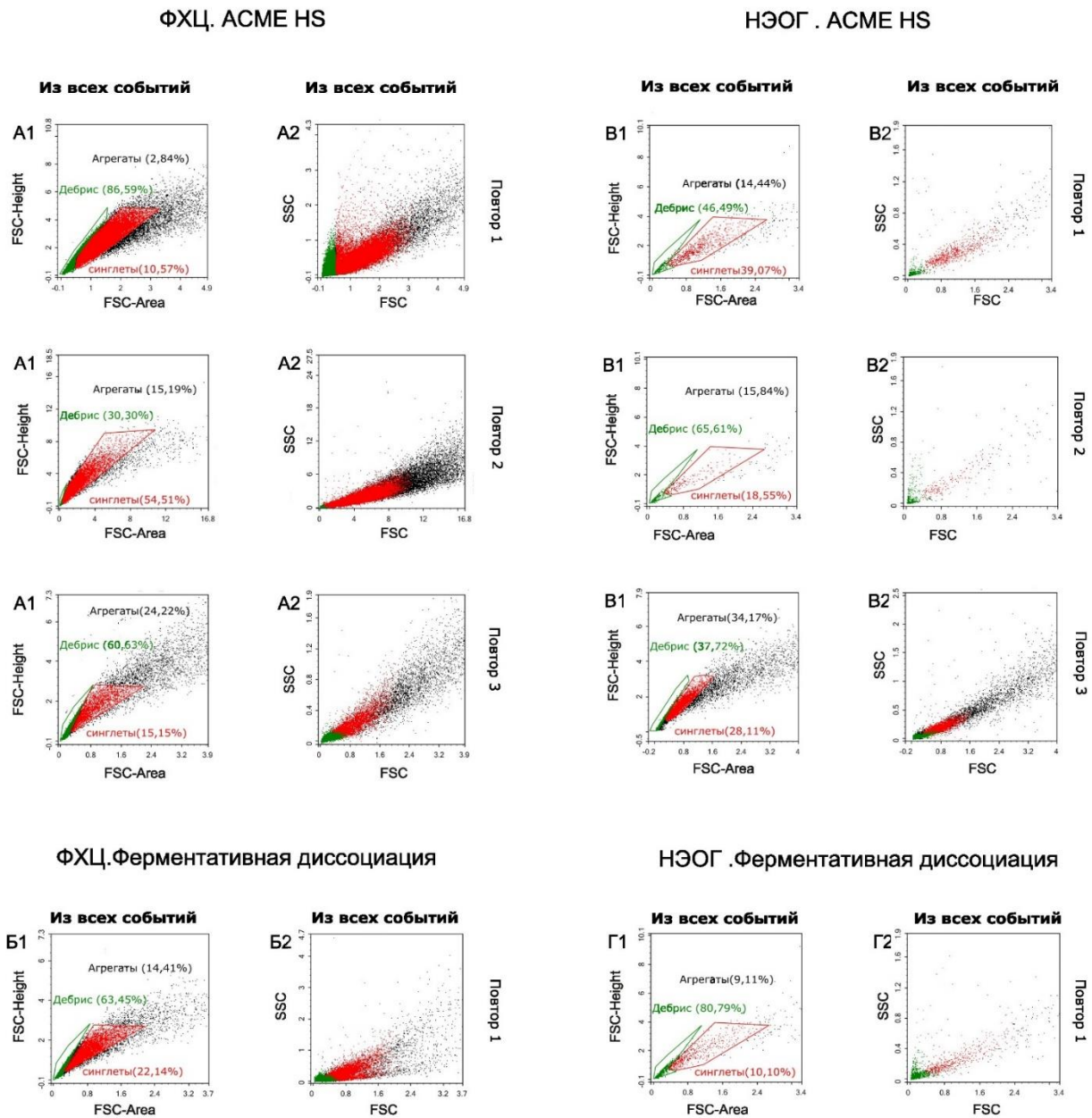
### Оценка качества клеточных суспензий, полученных ACME HS диссоциацией с помощью проточной цитометрии

Для дополнительной оценки качества единичных клеток образцов, полученных методом ACME HS и методом ферментативной диссоциации был использован метод проточной цитометрии. Метод ACME HS оценивали по трем независимым повторам для каждого типа опухоли – НЭОГ и

ФХЦ. Мы определили гейты дебриса, одиночных клеток и агрегатов на дот плотях FSC/SSC для всех тканей и для каждого метода диссоциации (Рисунок 2). Как и ожидалось, дебрис располагался в левой нижней области дот плота, а агрегаты образовывали кластеры в правой верхней области дот плота FSC/SSC. Так как исследуемые опухоли имели разное происхождение и клеточную организацию, было ожидаемо, что количество одиночных клеток и дебриса будет различным. Для образцов ФХЦ было обнаружено наибольшее количество одиночных клеток в диапазоне от 15,15 до 54,51%, в то время как для образцов НЭОГ количество одиночных клеток варьировалось от 18,55 до 39% (Рисунок 2).

Для различения ядерных клеток и внеклеточного клеточного дебриса, мы использовали ДНК-интеркалирующий краситель пропидиум йодид (PI). Для дополнительной характеристики природы клеточного дебриса применяли 5(6)-карбоксифлуоресцеиндиацетат N-сукцинимидный эфир (CFSE) — краситель, широко используемый в протоколах проточной цитометрии для мечения жизнеспособных клеток за счёт связывания с внутриклеточными аминогруппами. Наш анализ показал, что большинство фрагментов дебриса были CFSE-положительными и PI-отрицательными, что свидетельствует об отсутствии ядер в этих структурах. Методы АСМЕ HS и ферментативной диссоциации дали сопоставимое количество агрегатов и дебриса. Тем не менее, с помощью проточной цитометрии было подтверждено, что оба подхода обеспечивают достаточное количество одиночных, интактных клеток, пригодных для последующего анализа.

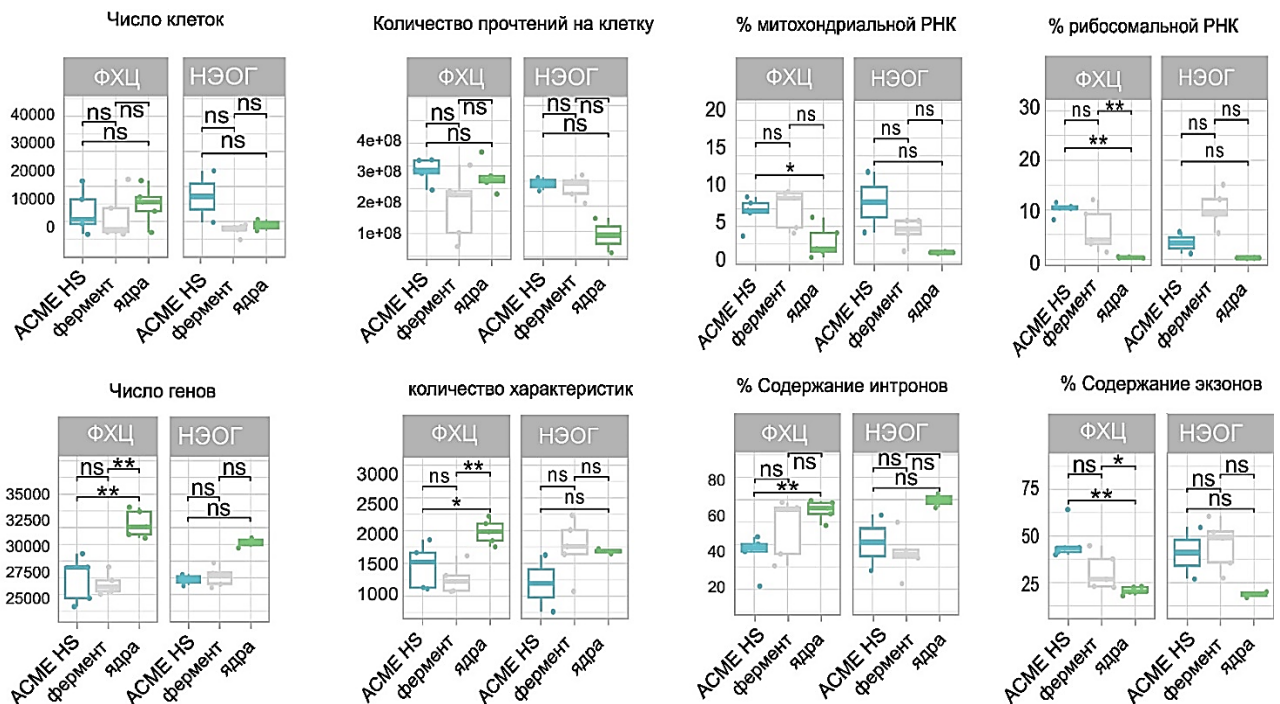




**Рисунок 2.** Данные проточной цитометрии, представленные в виде точечных диаграмм для образцов, приготовленных методами ACME HS и ферментативной диссоциации. A1-A4 и Б1-Б4 – для ФХЦ; В1-В4 и Г1-Г4 – для НЭОГ (зеленый цвет – дебрис, красный – одиночные клетки, черный – агрегаты).

### Общая характеристика и анализ экспрессии тканеспецифических генов в кДНК-библиотеках единичных клеток, полученных методом ACME HS

Для сравнительного анализа были отобраны 25 образцов нейроэндокринных опухолей человека. Нами было получено 94807 клеток и ядер из ФХЦ (n=15), 41418 клеток и ядер из НЭОГ (n=9). Сначала мы изучили стандартные характеристики кДНК библиотек единичных клеток (Рисунок 3).

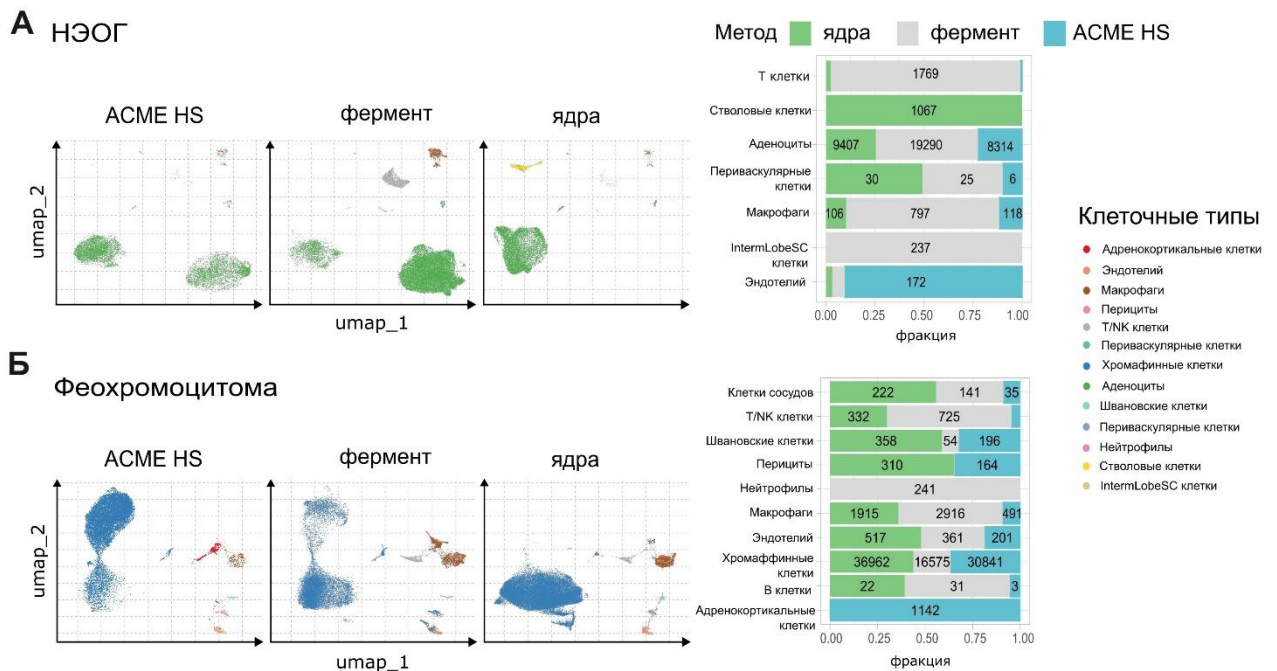


**Рисунок 3:** Стандартные метрики контроля качества наборов данных образцов при анализе транскриптомов единичных клеток (количество клеток; фракция идентифицированных прочтений в клетках; картирование экзонов/интронов; митохондриальные, рибосомальные гены; общее число обнаруженных генов и транскриптов на клетку) для наборов данных образцов, диссоциированных методами ACME HS, ферментативным методом и методом ядерной экстракции. Статистические различия оценены с помощью критерия Уилкоксона (Wilcoxon rank-sum test): \*\*\*\* ( $0,0001 < p < 0,001$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ), ns – не значимо –  $p > 0,05$ .

Мы установили, что показатели качества данных, полученных методом ACME HS, сопоставимы с результатами ферментативной диссоциации и выделения ядер, а в некоторых

случаях практически идентичны. Обнаружены различия в экспрессии рибосомальных генов и соотношении экзонов к интронам между методами. Как и ожидалось, анализ ядер выявил большее число генов. При этом значимых различий в общем числе клеток и количестве прочтений между методами не зафиксировано.

Мы использовали Seurat v.4.9 ([Hao, Stuart et al., 2024](#)) с целью создания интегрированных наборов данных и проведения клеточной аннотации для каждого типа ткани. Для наборов данных на основе трех методов диссоциации были определены основные клеточные типы. Мы выяснили, что в данных ACME HS успешно идентифицируются тканеспецифичные клетки, а именно, аденоциты и хромаффинные клетки, и другие неспецифические для ткани клетки (Рисунок 4).



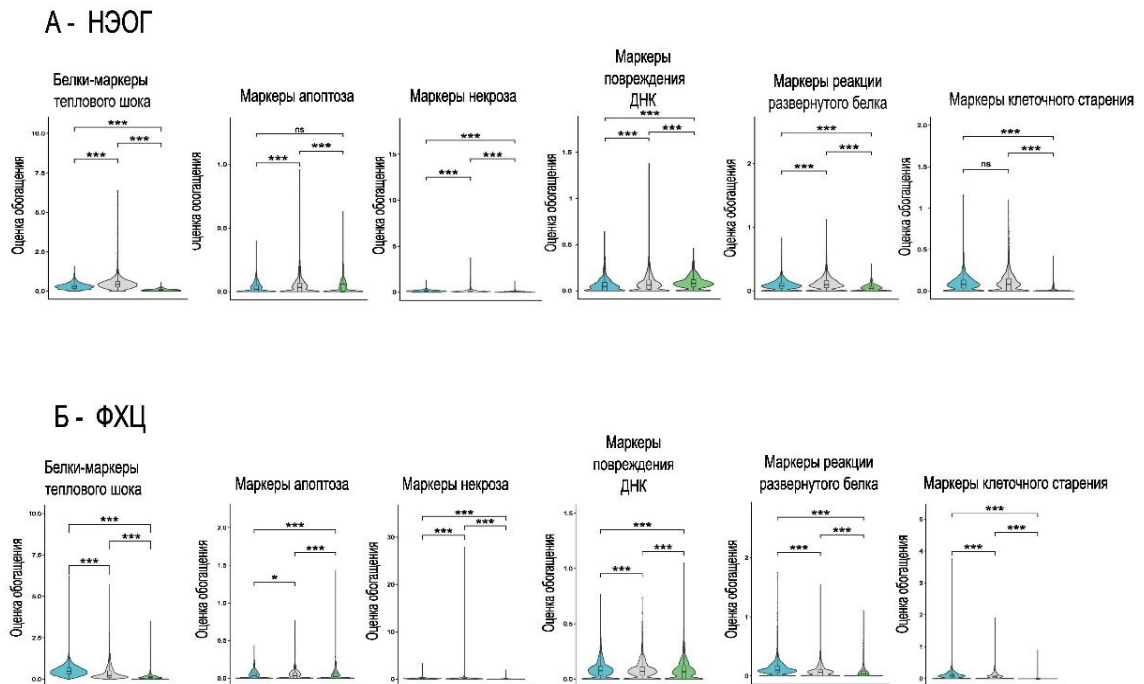
**Рисунок 4:** UMAP с аннотацией основных клеточных типов, идентифицированных в наборе данных клеток НЭОГ и ФХЦ. А. Соотношения клеточных типов, идентифицированных различными методами диссоциации (ACME HS, ферментативная и ядерная экстракция) для тканей НЭОГ. На диаграмме не указано количество клеток, составляющих менее 5% от общего числа. Б. Соотношения клеточных типов, идентифицированных различными методами диссоциации (ACME HS, ферментативная и ядерная экстракция) для тканей ФХЦ. На диаграмме не указано количество клеток, составляющих менее 5% от общего числа.

Мы оценили гетерогенность основных типов клеток путем дальнейшей кластеризации интегрированных клеток. Кроме того, мы исследовали, насколько хорошо метод ACME HS сохраняет экспрессию генов, специфичных для двух образцов ткани, и обнаружили, что эти клетки экспрессируют основные маркерные гены, которые обычно используются для идентификации тканей гипофиза и феохромоцитомы, такие как *POMC*, *GHI*, *POU1F1* и *CHGA* ([Mete and Asa, 2022](#)), *PNMT* ([Konosu-Fukaya, Omata et al., 2018](#)), соответственно.

#### **Анализ экспрессии генов, связанных со стрессом и апоптозом, в клеточных суспензиях, полученных методом ACME HS**

Для оценки стресса, вызванного различными методами диссоциации, была проанализирована экспрессия маркеров клеточной гибели и стресса (апоптоз, некроз, старение, повреждение ДНК, тепловой шок) в данных ACME HS, ферментативной и ядерной диссоциации (Рисунок 5). Наименьшая экспрессия маркеров теплового шока и повреждения ДНК наблюдалась при ядерной экстракции и ACME HS. Ферментативная диссоциация вызывала более высокую экспрессию маркеров стресса, особенно в НЭОГ. Маркер *ERN2 (UPR)* был высоко экспрессирован в НЭОГ при ACME HS и ядерной экстракции. Маркеры старения были выше в ACME HS по сравнению с ядерными данными, но ниже, чем при ферментативной диссоциации.

Методы  ядерная экстракция  Ферментативная диссоциация  ACME-HS



**Рисунок 5.** Относительная экспрессия маркеров теплового шока, апоптоза, некроза, повреждения ДНК, клеточного старения и ответа на белковый фолдинг в наборах данных, полученных из опухолевых образцов НЭОГ и ФХЦ.

### Описание клинических случаев выбранных пациентов для определения клеточной гетерогенности НЭОГ

Мы адаптировали протокол и доказали эффективность получения единичных клеток из свежесзамороженных тканей, тем самым раскрыли возможность использования редких НЭОГ, хранящихся в биобанке, для изучения их клеточного состава и генетической гетерогенности. Для исследования транскриптомов единичных клеток были выбраны 10 опухолей НЭОГ: 3 соматотропиномы (СА): P1-P3, 3 кортикотропиномы (КА) P4-P6, 2 неактивные соматотропиномы (НСА): P7-P8, и 2 неактивные гонадотропиномы (НГА) P9-P10.

**Таблица 2.** Анализ уровня гормонов в крови, анализ наличия или отсутствия экспрессии транскрипционных факторов и гормонов в клетках НЭОГ у выбранных пациентов. ПРЛ – пролактин, АКТГ – адренокортикотропный гормон, ТТГ – тиреотропный гормон, ЛГ – лютеинизирующий гормон, ФСГ – фолликулостимулирующий гормон, К – кортизол, СТГ – соматотропный гормон, «+» обнаружена экспрессия белка, «-» не выявлена экспрессия белка, «+/-» наличие единичных позитивно-окрашенных клеток.

№	ID	Уровень гормонов в крови									Транскрипционные факторы			Ki-67, %	Экспрессия гормонов					
		ПРЛ	АКТГ	ТТГ	ЛГ	ФСГ	К	св. Т4	СТГ	ИФР-1	PTG1	TPG1	SF-1		СТГ	ПРЛ	АКТГ	ТТГ	ЛГ	ФСГ
1	P8	208,6 мЕд/л	34пг/мл	1,51 мМЕ/мл	0,0 МЕ/л	0,46 мМЕ/мл	550 нмоль/л	N/A	N/A	171,3 нг/мл	+	-	-	9,2	+	-	-	-	-	-
2	P10	28,7 мЕд/л	26,5 пг/мл	4,96 мМЕ/мл	0,64 МЕ/л	0,82 мМЕ/мл	5,3 мкг/дл	0,38 нг/дл	0,184 нг/мл	60,27 нг/мл	+/-	-	+	3,2	-	-	+/-	+/-	+	+
3	P7	210 мЕд/л	20,54 пг/мл	1.869 мМЕ/мл	4,94 Ед/л	5,93 Ед/л	325 нмоль/л	12,52 нг/дл	0,58 нг/мл	N/A	+	-	-	9,2	+	-	-	-	-	-
4	P4	N/A	98,7 пмоль/л	N/A	N/A	N/A	58 нмоль/л	N/A	N/A	N/A	+	+	-	3,2	+	-	+	-	-	-
5	P1	578 мЕд/л	N/A	0,344 мМЕ/л	10,3 Ед/л	40,9 Ед/л	N/A	12.42 пмоль/л	20 нг/мл	757 мЕд/л	+	-	-	1,7	+	-	+/-	-	-	-
6	P6	291.5 мЕд/л	35.72 пг/мл	1.501 мМЕ/л	0.748< Ед/л	3.89 Ед/л	606.3 нмоль/л	11.09 пмоль/л	N/A	N/A	-	+	-	6,6	-	-	+	-	-	-
7	P3	743,2 мЕд/л	N/A	0,714 мМЕ/мл	N/A	N/A	N/A	9.94 пмоль/л	3,21 нг/мл	1 539.8> нг/мл	+	-	+	4,5	+	+	-	-	-	-
8	P9	>1500 мЕд/л	28.7 пг/мл	0,001 мМЕ/мл	0,01 МЕ/л	13.1 мМЕ/мл	1617 нмоль/л	14.57 пмоль/л	0.13 нг/мл	76.78 нг/мл	-	-	N/A	2,7	-	-	-	-	+	+
9	P5	406,8 мЕд/л	77.93 пг/мл	1,2 мМЕ/мл	4,9 МЕ/л	6,9 мМЕ/мл	363,6 нмоль/л	N/A	0,005 нг/мл	315.2 нг/мл	N/A	N/A	N/A	5	N/A	N/A	+	N/A	N/A	N/A
10	P2	853.7 мМЕ/л	46,9 пг/мл	0.765 мМЕ/л	N/A	N/A	698.6 нмоль/л	13.66 пмоль/л	41.5 нг/мл	703.6 нг/мл	+	-	-	1,6	+	+	-	+	-	-

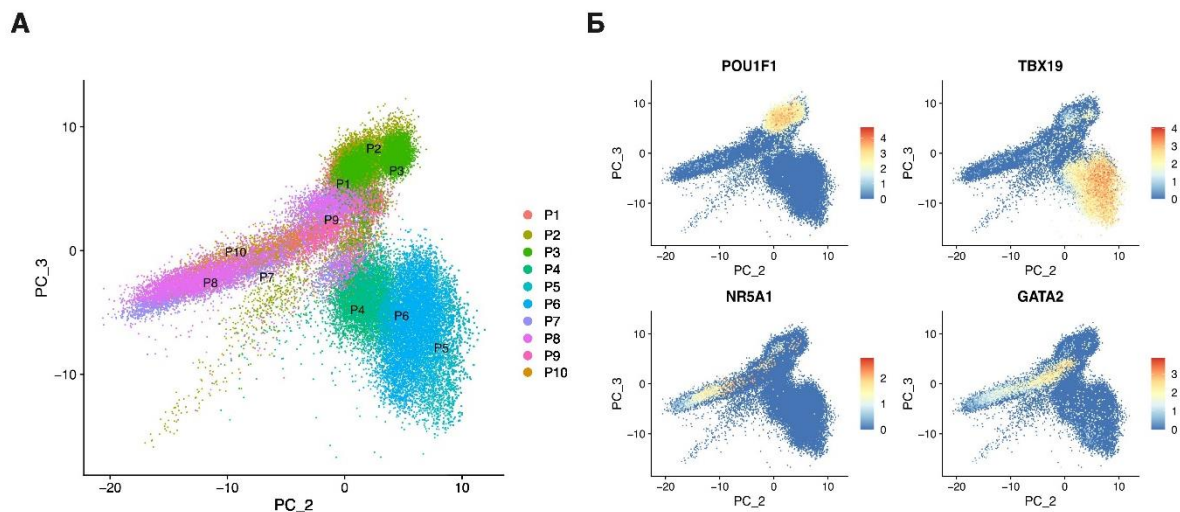
### Сравнительный анализ клеточных популяций аденоцитов в гормон-секретирующих и неактивных аденомах гипофиза с помощью технологии scRNA-seq

Для изучения транскриптомного профиля различных типов НЭОГ и проведения сравнительного анализа гормон-секретирующих и неактивных НЭОГ, мы провели анализ scRNA-seq 10 образцов НЭОГ. Все НЭОГ, включенные в исследование, были классифицированы на основании уровня гормонов в крови и ИГХ-окрашивания специфических факторов транскрипции и гормонов. Информация о пациентах представлена в таблице 2. Общее количество единичных клеток составило 46571 для всех образцов НЭОГ.



## Общее транскриптомное профилирование образцов нейроэндокринных опухолей гипофиза основе анализа scRNA-seq

Для того чтобы изучить транскриптомные профили и характеристики различных типов НЭОГ на уровне единичных клеток, мы проанализировали усредненную экспрессию генов с помощью метода главных компонент (PCA). Анализ многомерного масштабирования (MDS) был проведен и идентифицировал сходства и различия между образцами в двумерном пространстве на основании их профиля экспрессии генов (Рисунок 6). Мы изучили экспрессию основных факторов транскрипции и гормонов, ответственных за каждую из трех клеточных линий гипофиза: *POU1F1*, *PRL* и *GH* для линии PIT1; *NR5A1*, *GATA2* и *LH/FSH* для линии SF1; и *TBX19* и *POMC* для линии TRIT.

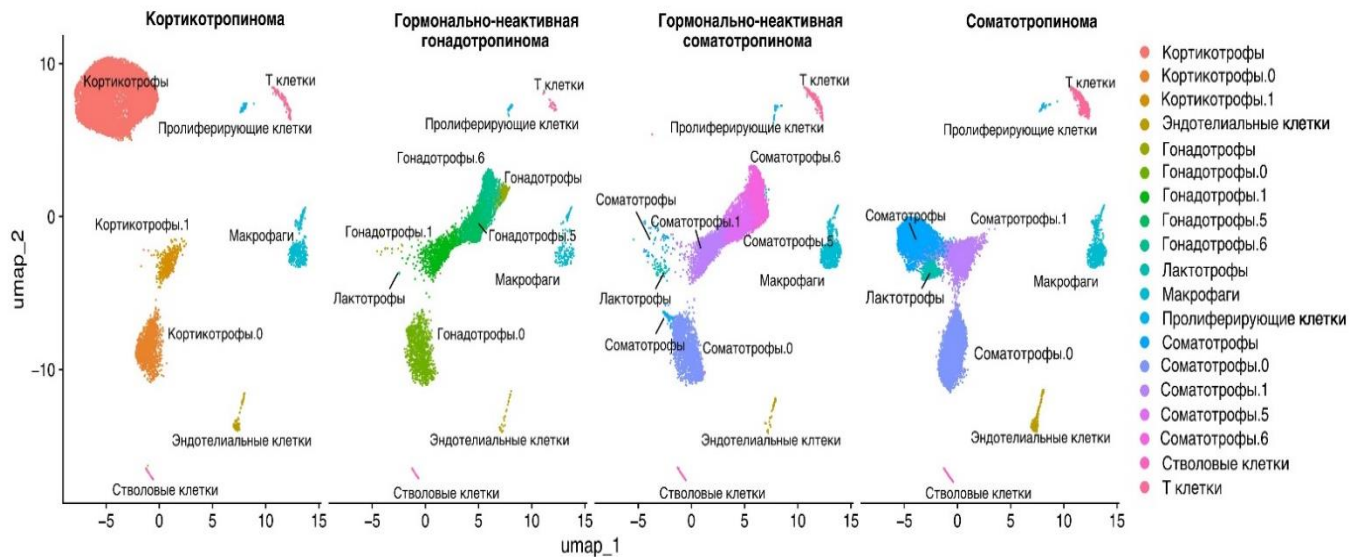


**Рисунок 6.** Характеристика транскриптомных профилей НЭОГ. А. Анализ главных компонент (PCA) единичных клеток каждого образца НЭОГ (P1-P10). Б. Уровень экспрессии *POU1F1* для ацидофильной линии PIT-1, *TBX19* для кортикотропной линии TRIT и *NR5A1/GATA2* для гонадотропной линии SF1 в единичных клетках с применением PCA.

Для аннотации клеточных типов scRNA-seq данные были интегрированы с данными YAN и др. ([Yan, Xie et al., 2024](#)), в работе которых изучались экспрессионные сигнатуры различных типов НЭОГ человека. Однако, этот интеграционный анализ оказался неэффективным для наших данных и показал низкую эффективность распознавания типов клеток. Мы построили нашу собственную

интеграцию, была построена карта аннотации основных клеточных типов, на которой были выделены основные клеточные кластеры для каждого типа НЭОГ: гормон-секретирующие клетки гипофиза, стволовые клетки гипофиза, эндотелиальные клетки, пролиферирующие клетки и кластеры иммунных клеток (кластеры Т-клеток и макрофагов) (Рисунок 7).

**А**

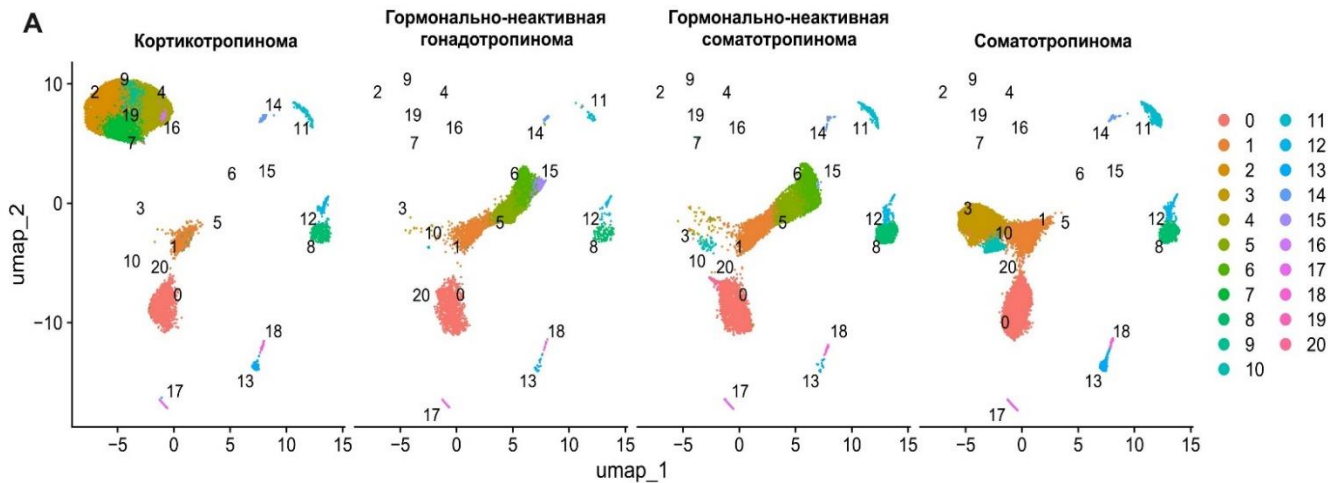


**Рисунок 7. А.** UMAP интеграции наборов данных клеток 10 НЭОГ.

### Обнаружение специфических клеточных кластеров для НСА и НГА

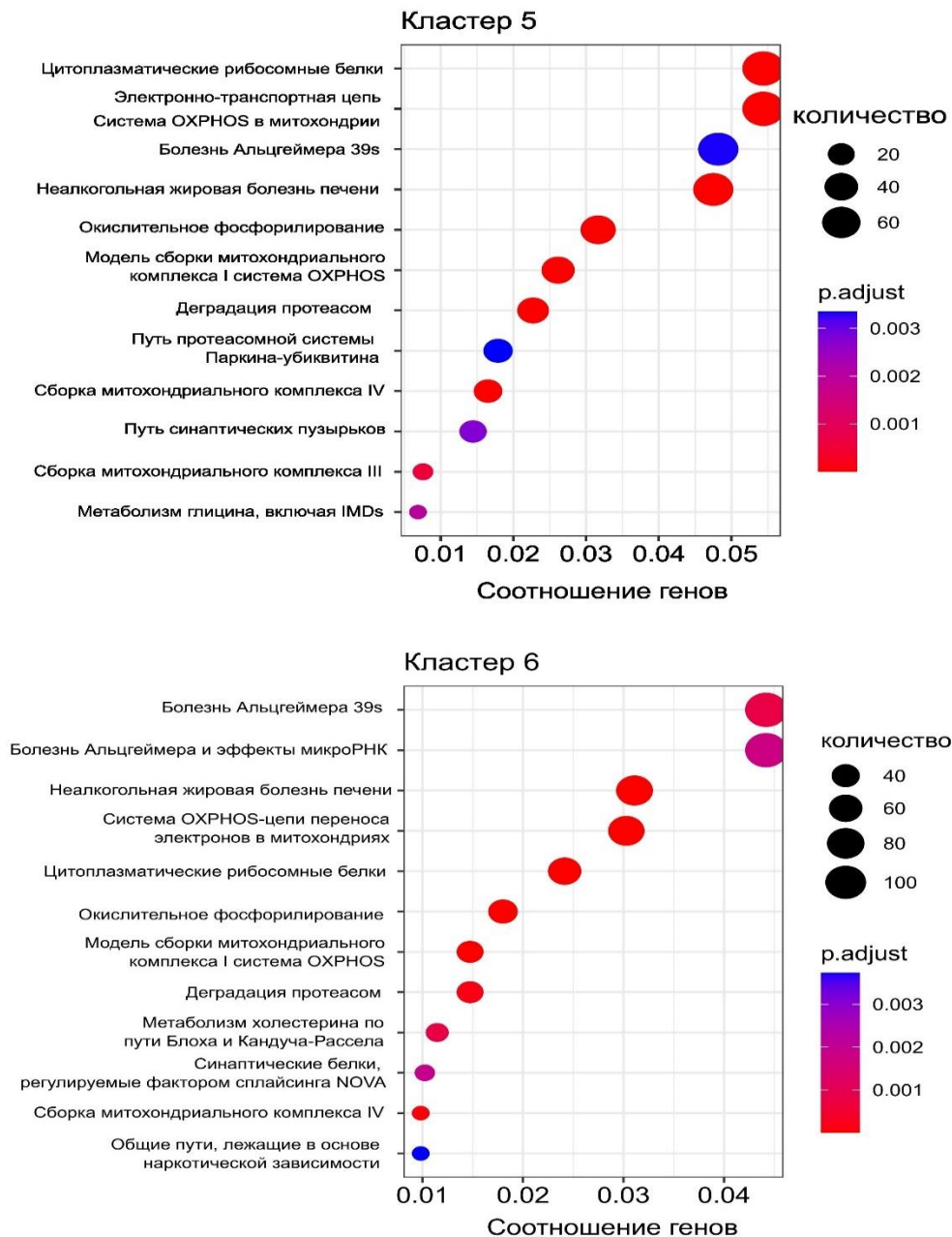
Мы проанализировали дифференциальную экспрессию генов в данных опухолевых клетках. Проведенный анализ выявил 21 отдельный клеточный кластер в четырех типах НЭОГ (Рисунок 8). Они включают как специфичные для конкретного типа НЭОГ кластеры, так и универсальные, общие для всех типов опухолей. Однако, универсальные кластеры демонстрируют различные профили экспрессии генов в каждом типе опухоли. Например, кластеры 0 и 1 – это кластеры клеток, секретирующие гормоны гипофиза, общие для всех образцов. Данные типы кластеров являются уникальными для каждого типа НЭОГ, благодаря экспрессии специфических для данной линии генов, кодирующих транскрипционные факторы и гормоны (PIT-1 - *GHI*, TRP-1 - *POMC* и SF1 - *GATA2/FSH/LH*, соответствующие СА/НСА, КА и НГА соответственно).





**Рисунок 8. А.** UMAP интеграции наборов данных клеток 10 НЭОГ. Клеточный состав тканей НЭОГ: визуализация основных клеточных субпопуляций и состояний для клеток НЭОГ. Кластеризация интегрированных данные клеток гипофиза.

Ранее нами было отмечено, что НГА и НСА имеют схожие профили экспрессии генов (Рисунок 8), и оба типа опухолей содержат клеточные кластеры 5 и 6, которые отсутствуют в образцах СА и КА. Два этих НГА/НСА-специфических кластера состоят преимущественно из гонадотрофов, экспрессирующих LHB и FSHB. Однако, анализ дифференциальной экспрессии выявил различия между этими кластерами. Они различались по уровню экспрессии таких генов, как *RESP18*, *MC3R*, *RERG-AS1*, *HMGA2-AS1*, *LHX3* и других, что отражает различия в дифференцировке, функциях и поведении опухоли между этими кластерными клетками. Анализ обогащенных генных путей (Pathway enrichment analysis, PEA), также выявил различные сигнальные пути для кластеров 5 и 6 (Рисунок 9). В обоих кластерах был активирован сигнальный путь деградации протеасомы, что позволяет сделать предположение о функциональной «неактивности» этих опухолей. Все эти данные подчеркивают специфичность кластеров 5 и 6 относительно типа опухоли, несмотря на то, что кластеры являются общими только для неактивных НЭОГ.



**Рисунок 9.** Активированные сигнальные пути в 5 и 6 НАГ-специфических кластерах. В обоих кластерах активирован путь дегградации протеасом.

Также было обнаружено, что кластер 15 специфичен для НГА и полностью отсутствует в образцах НСА. Этот кластер экспрессирует *SLR1* – ген, который ассоциирован с метастазированием опухолей ([Weichand, Popp et al., 2017](#)), и *CGB7*, ген кодирующий бета-субъединицу хорионического

гонадотропина ([Policastro, Ovitt et al., 1983](#)). В кластере 15 также было отмечено высокое соотношение некодирующих РНК (нкРНК) и генов с неопределенной ролью, также в была отмечена активация сигнального пути «VEGFA-VEGFR2», который играет критическую роль в развитии опухолей, регулируя ангиогенез, проницаемость сосудов ([Senger, 2010](#)) и модуляцию микроокружения развивающейся опухоли, в частности, через активацию деления фибробластов ([Yaqoob, Cao et al., 2012](#)).

### Обнаружение специфических клеточных кластеров СА

В исследовании кортикотропином (КА) были аннотированы специфические кластеры 2, 4, 7, 9, 16 и 19 (Рисунок 8). Все они экспрессируют *TBX19* и *POMC*, но различаются по дифференциально экспрессируемым генам, молекулярным функциям и регуляторным путям, что указывает на выраженную внутриопухолевую гетерогенность. Кластеры 2 и 4 обладают признаками проопухолевых: в них экспрессируются гены, связанные с рецепторами и развитием (например, *SCTR*, *NEFL*, *BMP3*, *NDNF* — кластер 2; *CHRM2*, *EDN3*, *RSPO2*, *PCDH20* — кластер 4), а также онкоген *PTTG1*, ассоциированный с пролиферацией и агрессивностью опухолей гипофиза ([Tfelt-Hansen, Kanuparthi et al., 2006](#)) и ([Yan, Xie et al., 2024](#)). В противоположность им, кластер 7 имеет антиопухолевый экспрессионный профиль с участием генов, участвующих в апоптозе (*NPTX1*), дегенерации (*CTSE*), клеточной адгезии (*PCDH15*, *COL28A1*) и негативной регуляции роста и ангиогенеза (*MINAR1*). Кластер 9 характеризуется высокой экспрессией глобиновых генов (*ALAS2*, *HBD*, *HBM* и др.), тогда как кластеры 16 и 19 обогащены неизвестными нкРНК. В кластере 19 также выявлена высокая экспрессия *EP300*, *PMAIP1* и *MIF*. Эти данные подчеркивают высокую гетерогенность кортикотрофной популяции в КА на уровне отдельных клеток.

### Обнаружение кластеров пролиферирующих и стволовых клеток в различных типах НЭОГ

В исследуемых образцах нам удалось выделить кластер пролиферирующих клеток (кластер 14) (Рисунок 8), общий для всех типов НЭОГ. В этом кластере мы обнаружили активацию путей клеточного цикла. Анализ фаз клеточного цикла также показал, что клетки находятся в активных G2/M и S фазах, что свидетельствует о высоком пролиферативном потенциале этих клеток ([Stark, Taylor, 2004](#)). Одним из высоко экспрессируемых генов в этом кластере являлся ген *PBK*, который также был идентифицирован в недавнем исследовании scRNA-seq ([Yan, Xie et al., 2024](#)) как новый

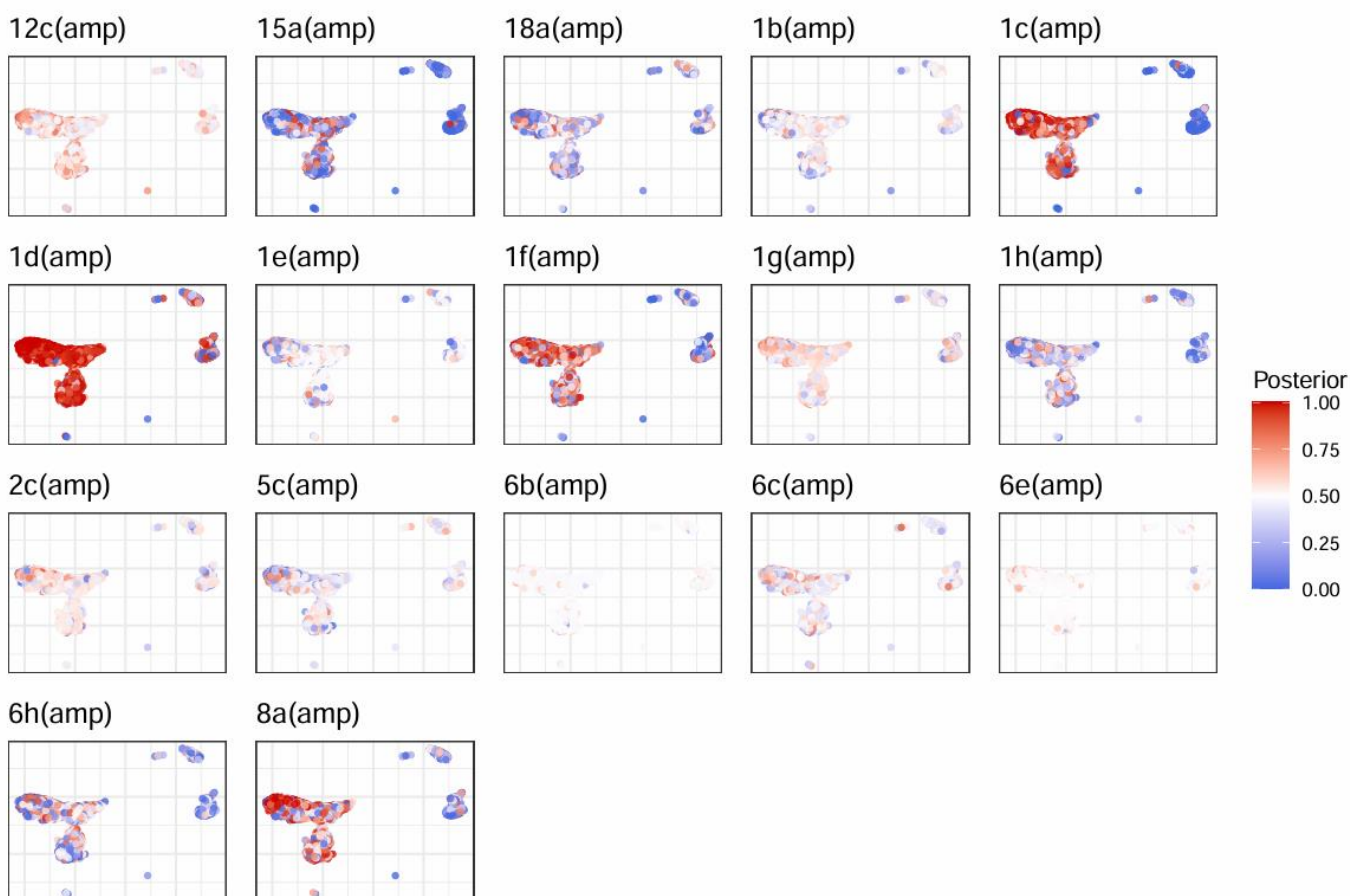
маркер, который при повышенной экспрессии может стимулировать пролиферацию клеток НЭОГ и их способность к миграции, что коррелировало с плохим прогнозом для пациентов.

Мы также идентифицировали кластеры стволовых клеток, основываясь на экспрессии специфических маркеров стволовых клеток. В этом кластере нам удалось идентифицировать такие прогениторные клетки, как маммосоматотрофы, Pro.Pit1 и Pre.lacto, которые были описаны в более ранних исследованиях ([Zhang, Cui et al., 2020](#), [Zhang, Yao et al., 2023](#), [Asaad, Utkina et al., 2024](#), [Lin, Dai et al., 2024](#)). Обнаружено, что в образцах СА присутствуют эти три типа прогениторных клеток. Маммосоматотрофы были обнаружены в СА, в НАС, а не в НГУ и КА, что является еще одним признаком смешанного типа НЭОГ. Примечательно, что в стволовых клетках НГА мы не обнаружили кластера прогениторных клеток.

#### **Анализ вариаций числа копий генов в единичных клетках гормонально-активных и неактивных НЭОГ**

Большинство НЭОГ являются доброкачественными и характеризуются меньшим числом CNV по сравнению с агрессивными опухолями. Для оценки межопухолевой генетической гетерогенности был проведён CNV-анализ с использованием программного пакета Numbat. В каждом образце был идентифицирован как минимум один тип CNV: амплификации (amp) — в 90%, делеции (del) — в 40%, потери гетерозиготности (loh) — в 50%, биаллельные амплификации (bamp) — в 10% образцов. Наибольшее число CNV отмечено в соматотропиномах (СА), что согласуется с данными о высокой нестабильности в ацидофильной линии POU1F1 ([Cui, Li et al., 2021](#)). Чаще всего встречались amp (особенно в СА), далее — del. Максимальное накопление CNV выявлено в регионах 4b и 18a, а также в области 6b (в двух из трёх СА). При этом в НСА, относящихся к той же линии POU1F1, CNV были значительно менее выражены, что указывает на различия в гетерогенности и предполагает существование механизмов перестройки генома, не зависящих от типа опухолевых клеток.

Различные типы CNV были выявлены в разных частях хромосом и в различных клеточных кластерах в каждом образце опухоли. Пример показан на рисунке 10. В данном примере в образце НСА мы обнаружили, что в кластере 3 присутствует намного больше событий амплификации в хромосомных областях 15a, 1c, 1d и 1f по сравнению с другими кластерами. Геномная нестабильность, наблюдаемая в этом кластере, может свидетельствовать о потенциальной роли этой популяции соматотрофных клеток в инициации, прогрессии или резистентности опухоли к лечению.



**Рисунок 10.** UMAP с аннотацией результатов анализа CNV, демонстрирующий различные события перестройки генома в разных кластерах клеток. Наибольшая генная перестройка отмечается в кластере 3.

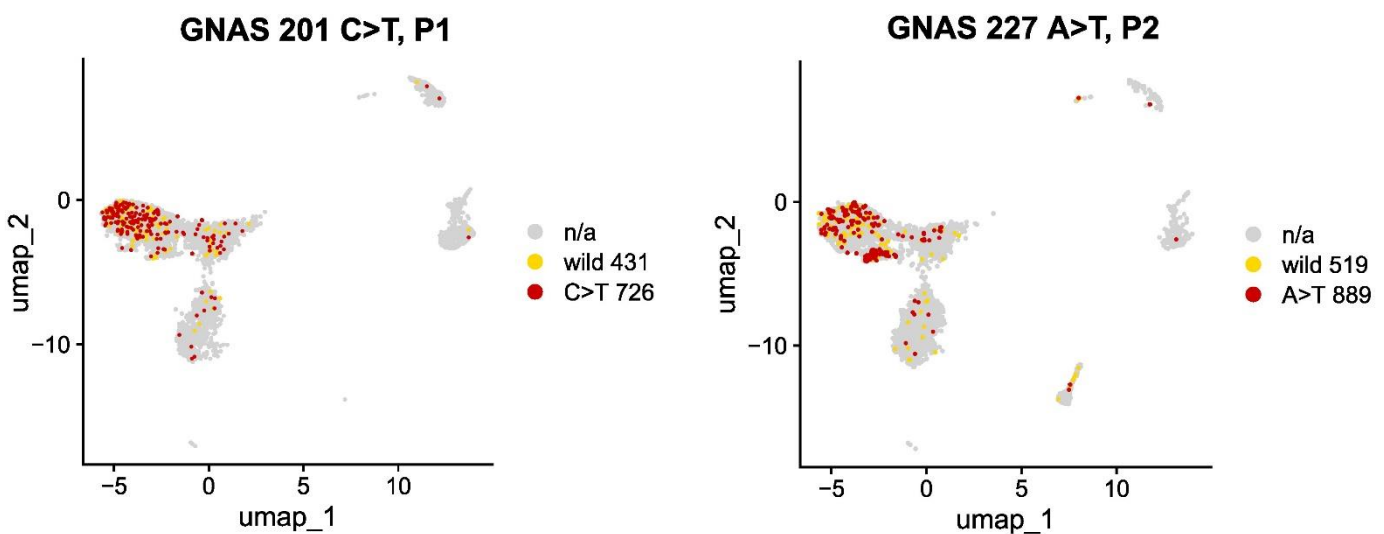
### **Исследование однонуклеотидных генетических полиморфизмов в единичных клетках гормон-секретирующих и неактивных аденом гипофиза**

Мутация в гене *GNAS* является ключевым фактором в изучении нейроэндокринных опухолей гипофиза, особенно СА. Используя анализ данных scRNA-seq, мы изучили изменения вариантов одного нуклеотида (SNV - single nucleotide variations) в этом гене в различных типах НЭОГ, чтобы лучше понять их расположение, тип и частоту встречаемости.

Как и ожидалось, проведенный анализ показал наличие двух вариантов в гене *GNAS* исключительно в СА (в 2 из 3 образцов СА). Обнаруженные генетические вариации представлены на рисунке 11. Наблюдались две различные мутации: замена C>T в одном образце и замена A>T в

другом. Обе мутации являются активирующими и нарушают активность ГТФазы, что приводит к постоянной активации *Gsa*, которая, в свою очередь, способствует гиперсекреции гормонов и росту опухоли.

Несмотря на различия в генетических локусах, обе мутации преимущественно присутствовали в соматотрофном кластере 3. Этот вывод еще раз подтверждает потенциальную роль клеток этого кластера в развитии НЭОГ.



**Рисунок 11.** UMAP вариантов патогенных мутаций в гене *GNAS* в образцах СА: 201A>T и 227A>T. Обе мутации локализованы преимущественно в клеточном кластере 3.

## ВЫВОДЫ

1. Метод уксусно-метанольной диссоциации ACME HS позволяет выделять неповрежденные, целые единичные клетки из криоконсервированных нейроэндокринных опухолей, таких как феохромоцитома и аденома гипофиза, сохраняя целостность РНК клеток и без значительных изменений в уровнях экспрессии генов.
2. Гормонально-неактивные формы НЭОГ имеют схожий транскрипционный профиль, что подчеркивается общими клеточными кластерами (5 и 6) и активацией путей протеасомной деградации.

3. Гормонально-активные КА показали высоко гетерогенную клеточную структуру, в которой присутствуют как про-опухолевые (кластеры 2 и 4), так и анти-опухолевые (кластер 7) клеточные кластеры, а также клеточные кластеры, экспрессирующие глобиновые гены гемоглобина (кластер 9).
4. Типы НЭОГ различались по профилю CNV: наиболее распространенным типом являлись геномные амплификационные события в 90 %, потеря гетерозиготности - в 50 % и делеции - в 40 % исследованных образцов. Наибольшее количество перестроек отмечено в гормонально-активных кортикотропинах, а наименьшее - в неактивных соматотропинах.
5. Патогенные активирующие мутации в гене *GNAS*, обнаруженные в клеточном кластере 3 неактивных соматотропных аденом, позволяют предположить, что данная клеточная популяция является иницирующей для образования опухоли.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется применение метода уксусно-метанольной диссоциации ACME HS для выделения единичных клеток из криоконсервированных нейроэндокринных опухолей, таких как феохромоцитома и аденома гипофиза.
2. Для уточнения диагноза/гетерогенности клеток аденомы гипофиза, рекомендуется дополнительное исследование образцов удаленной опухолевой ткани с помощью методов ИГХ и scRNA-seq.
3. Определение экспрессии *PVK* в удаленных образцах аденом гипофиза с помощью антител к *PVK* в процедуре ИГХ или прямым методом при scRNA-seq может быть применено для уточнения потенциала к росту опухолевой ткани.
4. Изучение мутаций в гене *GNAS* в опухолевой ткани рекомендуется как дополнительный неблагоприятный фактор выраженной гормональной активности и роста аденомы гипофиза.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Asaad W**, Utkina M, Shcherbakova A, Popov S, Melnichenko G and Mokrysheva N. scRNA sequencing technology for PitNET studies. // Front. Endocrinol. Vol. 15, 2024.
2. Utkina M, Shcherbakova A, Deviatiiarov R, Ryabova A, Loguinova M, Trofimov V, Kuznetsova A, Petropavlovskiy M, Salimkhanov R, Maksimov D, Albert E, Golubeva A, **Asaad W**, Urusova L, Bondarenko E, Lapshina A, Shutova A, Beltsevich D, Gusev O, Dzeranova L, Melnichenko, Minniakhmetov I, Dedov I, Mokrysheva N and Popov S. Comparative evaluation of ACetic -MEthanol



High Salt dissociation approach for single-cell transcriptomics of frozen human tissues. // Front. Cell Dev. Biol. Vol. 12, 2024.

3. **Асаад В.**, Пачуашвили Н.В., Урусова Л.С., Бондаренко Е.В., Лапшина А.М., Уткина М.В., Попов С.В., Дзеранова Л.К., Пигарова Е.А. Роль иммуногистохимического анализа в повышении точности диагностики нейроэндокринных опухолей гипофиза // Эндокринная хирургия. — 2025. — Т. 19. — No 1.
4. **В. Асаад**, Р.М. Девятияров, А.С. Щербакова, С.В. Попов, М.В. Уткина. Single-cell transcriptomic analysis reveals a unique cluster and differences in gene expression in somatotroph adenomas. // 14-я Международная Мультиконференция «Биоинформатика регуляции и структуры геномов» / системная биология, Новосибирск, 2024, С. 1582-1583.
5. **В. Асаад**, Р.М. Девятияров, А. С. Щербакова, С.В. Попов, М. В. Уткина. ACME HS - A new method for studying fresh-frozen pituitary tissues by scRNA-seq method. // Вычислительная биология и искусственный интеллект для персонализированной медицины, Москва, 2024, С 144-145.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ – Адrenокортикотропный гормон  
 ИГХ – Иммуногистохимия  
 ИФР1 – Инсулиноподобный фактор роста 1 типа  
 КА – Функциональные (гормонально-активные) кортикотропные аденомы  
 ЛГ – Лютеинизирующий гормон  
 НЭН – Нейроэндокринные новообразования  
 НСА – Гормонально - неактивные соматотропные аденомы  
 НГА – Гормонально - неактивные гонадотрофные аденомы  
 НАГ – Гормонально - неактивные аденомы гипофиза  
 НЭОГ – Нейроэндокринные опухоли гипофиза  
 РНКазы - Рибонуклеазы  
 СА – Функциональные (гормонально-активные) соматотропные аденомы  
 ФХЦ – Феохромоцитома  
 ACME HS – ACetic-MEthanol High Salt (Уксусно-метанольная диссоциация)  
 CNV – Copy number variations (Вариации числа копий)

CFSE – Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (Сукцинимидиловый эфир (5,6)-карбоксифлуоресцеина диацетата)  
 DPBS – Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Фосфатный забуференный солевой раствор Дульбекко)  
 FBS – Fetal bovine serum (Фетальная бычья сыворотка)  
 POMC – Proopiomelanocortin (Проопиомеланокортин)  
 PCA – Principal component analysis (Анализ главных компонент)  
 PI – Propidium  
 MDS – Multidimensional scaling (Анализ многомерного масштабирования)  
 RIN – RNA-integrity number (Индекс целостности РНК)  
 SNV – Single nucleotide variations (Варианты одного нуклеотида)  
 scRNA-seq – Single-cell RNA sequencing (Секвенирование РНК единичных клеток)  
 3xSSC\* – Saline-sodium citrate buffer (Цитратно- солевой буфер)