

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии имени академика И.И. Дедова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

**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

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
**Пигарова Екатерина Александровна**  
доктор медицинских наук

Научный консультант:  
**Попов Сергей Владимирович**  
кандидат биологических наук

Москва – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>6</b>
<b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>13</b>
1.1. Общее представление о нейроэндокринных новообразованиях.....	13
1.1.1. Эпидемиология .....	15
1.1.2. Описание и эпидемиология нейроэндокринных опухолей – феохромоцитомы и паранглиомы .....	17
1.1.3. Анализ метастатического потенциала феохромоцитом и параганглиом.....	18
1.1.4. Описание и эпидемиология нейроэндокринных опухолей гипофиза.....	20
1.1.5. Классификация нейроэндокринных опухолей гипофиза .....	22
1.2. Диагностика и лечение гипофизарных нейроэндокринных опухолей ....	24
1.3. Применение scRNA-seq для изучения нейроэндокринных опухолей .....	25
1.3.1. Общая схема работы метода scRNA-seq.....	27
1.3.2. Изучение процессов развития здоровых клеток гипофиза с использованием технологии scRNA-seq .....	30
1.3.3. Изучение профиля экспрессии генов и клеточной гетерогенности нейроэндокринных опухолей гипофиза .....	33
1.4. Изучение признаков злокачественности нейроэндокринных опухолей гипофиза с использованием scRNA-seq .....	35
1.4.1. Инвазивные свойства нейроэндокринных опухолей гипофиза ...	35
1.4.2. Апоптотические свойства нейроэндокринных опухолей гипофиза.....	36
1.4.3. Онкомаркеры нейроэндокринных опухолей гипофиза .....	37
<b>Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>39</b>
2.1. Образцы .....	39
2.2. Реагенты .....	39

2.2.1. Буферы .....	39
2.2.2. Ферменты и ингибиторы Рибонуклеаз (РНКаэ).....	40
2.2.3. Дополнительные реагенты для приготовления буферов .....	40
2.2.4. Другие реагенты и наборы .....	40
2.3. Оборудование .....	41
2.3.1. Оборудование для подготовки образцов .....	41
2.3.2. Оборудование для гистологических исследований.....	41
2.3.3. Оборудование для секвенирования .....	41
2.4. Методы .....	41
2.4.1. Получение суспензий единичных клеток методом уксусно-метанольной диссоциации (ACetic-MEthanol High Salt, ACME HS) ....	41
2.4.2. Получение суспензий единичных клеток методом ферментативной диссоциации .....	42
2.4.3. Метод ядерной экстракции из свежемороженых образцов	43
2.4.4. Фиксация клеток метанолом и криоконсервация методом ACME HS .....	43
2.4.5. Выделение и качественная оценка тотальной РНК .....	44
2.4.6. Иммуногистохимическое окрашивание .....	44
2.4.7. Проточная цитометрия .....	45
2.4.8. Подготовка клеточных суспензий для загрузки на станцию для работы с единичными клетками 10x Chromium Controller .....	45
2.4.9. Подготовка библиотек sn/scRNA-seq с использованием технологии 10x Genomics .....	46
2.4.10. Анализ транскриптомов единичных опухолевых клеток надпочечника (ФХЦ) и гипофиза (НЭОГ) .....	46
2.4.11. Анализ маркерных генов клеточной гибели и стресса.....	48
2.4.1. Статистический анализ данных .....	49

<b>Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....</b>	<b>50</b>
3.1. Разработка методов пробоподготовки свежих и свежезамороженных нейроэндокринных опухолевых тканей.....	50
3.2.1. <i>Получение фиксированных единичных клеток с высоким индексом целостности РНК с помощью метода ACME HS диссоциации .....</i>	<i>50</i>
3.2.2. <i>Оценка качества клеточных суспензий, полученных ACME HS диссоциацией с помощью проточной цитометрии.....</i>	<i>53</i>
3.2.3. <i>Общая характеристика кДНК-библиотек единичных клеток, полученных методом ACME HS.....</i>	<i>61</i>
3.2.4. <i>Анализ экспрессии ключевых тканеспецифических генов в единичных клетках, полученных методом ACME HS.....</i>	<i>65</i>
3.2.5. <i>Анализ экспрессии генов, связанных со стрессом и апоптозом, в клеточных суспензиях, полученных методом ACME HS.....</i>	<i>66</i>
3.2. Описание клинических случаев выбранных пациентов для определения клеточной гетерогенности НЭОГ .....	67
3.3. Сравнительный анализ клеточных популяций аденоцитов в гормон-секретирующих и неактивных аденомах гипофиза с помощью технологии scRNA-seq.....	77
3.3.1 <i>Общее транскриптомное профилирование образцов нейроэндокринных опухолей гипофиза на основе анализа scRNA-seq..</i>	<i>77</i>
3.3.2. <i>Классификация и характеристика клеточного состава нейроэндокринных опухолей гипофиза .....</i>	<i>79</i>
3.3.3. <i>Обнаружение специфических клеточных кластеров для НСА и НГА.....</i>	<i>83</i>
3.3.4. <i>Обнаружение специфических клеточных кластеров СА.....</i>	<i>90</i>
3.3.5. <i>Обнаружение кластеров пролиферирующих и стволовых клеток в различных типах НЭОГ .....</i>	<i>91</i>

3.4. Анализ вариаций числа копий генов в единичных клетках гормонально-активных и неактивных НЭОГ .....	94
3.5. Исследование однонуклеотидных генетических полиморфизмов в единичных клетках гормон-секретирующих и неактивных аденом гипофиза.....	98
<b>Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>99</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>105</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>109</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>109</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....</b>	<b>111</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>114</b>
<b>Приложение А (обязательное). Экспрессия основных факторов транскрипции в тканях гипофиза: <i>POU1F1</i> для ацидофильной линии (PIT-1), <i>TBX19</i> для кортикотропной линии (T-PIT), и <i>NR5A1</i> и <i>GATA2</i> для гонадотропной линии (SF-1). .....</b>	<b>124</b>
<b>Приложение Б (обязательное). 20 высоко-экспрессирующихся ДЭГ в каждом кластере .....</b>	<b>126</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность и разработанность темы исследования**

Нейроэндокринные новообразования (НЭН) представляют собой гетерогенную группу опухолей, происходящих из нейроэндокринных клеток (НК) эмбриональной кишки. Эти новообразования могут быть обнаружены в различных частях тела, однако определенные типы НЭН чаще наблюдаются в органах эндокринной системы. К ним относятся, нейроэндокринные опухоли гипофиза (НЭОГ) и нейроэндокринная опухоль мозгового слоя надпочечника – феохромоцитома (ФХЦ). Последние исследования свидетельствуют о том, что заболеваемость и распространенность НЭН неуклонно растут, что может быть связано с улучшением диагностики на ранних стадиях заболевания с помощью современных визуализирующих методик. Это делает НЭН важной областью для дальнейшего изучения.

Секвенирование РНК единичных клеток (scRNA-seq) предлагает инновационный подход к исследованиям НЭН, позволяя с высоким разрешением изучать транскриптомные профили отдельных клеток, в том числе в микроокружении опухоли. Традиционное массовое РНК-секвенирование (Bulk RNA-seq) анализирует экспрессию генов во всех типах клеток одновременно, тем самым частично усредняя различия в транскриптомах, делая недоступным исследования клеточной гетерогенности [1]. scRNA-seq позволяет идентифицировать отдельные клеточные субпопуляции, включая опухолевые, эндотелиальные и иммунные клетки, а также их функциональное и переходное состояния. Такое детальное понимание крайне важно для выяснения механизмов, лежащих в основе развития, прогрессии и ответа опухоли на терапию.

Одним из главных этапов в секвенировании единичных клеток, определяющим биологическую релевантность и достоверность полученных scRNA-seq данных, является пробоподготовка образцов клеточных суспензий. Существующие на данный момент методы диссоциации позволяют получить единичные клетки из свежего послеоперационного материала или выделить ядра из замороженных тканей. Разработка методов, направленных на получение

единичных клеток из замороженного материала для scRNA-seq, открывает новые возможности для исследований транскриптомов единичных клеток редких форм неоплазм, хранящихся в центрах биобанкирования медицинских исследовательских центров по всему миру.

Изучение НЭОГ с помощью scRNA-seq особенно актуально в связи с гетерогенностью, наблюдаемой среди гормонально-активных и неактивных аденом [2]. Этот метод позволяет выявлять молекулярные механизмы, характерные для активных или неактивных аденом гипофиза, и соотнести их с клиническими фенотипами, такими как прогрессивный рост опухоли или устойчивость к медикаментозной терапии. Кроме того, scRNA-seq позволяет обнаруживать ранее не идентифицированные опухолевые субпопуляции, включая прогениторные и стволовые клетки, что дает возможность предположить траектории развития опухоли или выявить различные пути, определяющие рост опухоли и выработку гормонов [3].

Помимо характеристики опухолевых клеток, scRNA-seq позволяет исследовать микроокружение опухоли [4, 5]. Понимание взаимодействия между нейроэндокринными клетками НЭОГ и клетками микроокружения, такими как иммунные или эндотелиальные клетки, может помочь в поиске потенциальных мишеней для иммунотерапии. Кроме того, транскриптомное профилирование может способствовать открытию биомаркеров для более точной диагностики, прогнозирования и терапевтического мониторинга.

Таким образом, использование scRNA-seq для изучения транскриптомных профилей НЭОГ является весьма актуальным и перспективным подходом. Он позволяет охарактеризовать клеточный состав и исследовать гетерогенность опухолей, что открывает путь к разработке стратегий персонализированной медицины с учетом уникальных молекулярных и клеточных особенностей заболевания.

### **Цель и задачи исследования**

**Целью** данной работы являлось проведение сравнительного анализа транскриптомов единичных клеток гормонально-активных и негативных аденом

гипофиза для выявления новых клеточных субпопуляций и генетических полиморфизмов.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Проанализировать технологии 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. Идентифицировать 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**

В данной научной работе была впервые в мире оптимизирована и успешно применена технология выделения единичных клеток (ACME HS) из свежзамороженных нейроэндокринных опухолей, таких как НЭОГ и феохромоцитомы, для scRNA-seq анализа. Данный метод открывает возможности новых исследований в транскриптомике НЭН и существенно облегчает логистику послеоперационного опухолевого материала, как внутри медицинских центров, так и между ними. Для более глубокого применения технологии scRNA-seq в области исследований НЭН мы сосредоточились на изучении гетерогенности ткани НЭОГ. Нами было проведено сравнительное исследование транскриптомов неактивных и гормонально-активных аденом гипофиза, в результате которого были выявлены ранее неидентифицированные клеточные кластеры, характерные для гормонально-



неактивных аденом гипофиза. Нами была изучена роль данных кластеров в прогрессии и развитии опухоли. Кроме того, нами были описаны про- и противоопухолевые клеточные кластеры, составляющие популяцию кортикотропных клеток аденом гипофиза. В настоящем исследовании был впервые описан транскриптомный профиль единичных клеток гормонально-неактивных соматотропином. На основе CNV были определены клеточные кластеры, в которых происходят несбалансированные хромосомные перестройки, такие как делеции и дупликации, а также были выявлены клетки с патогенными вариантами в гене *GNAS*.

Наша работа над методом ACME HS облегчает транскриптомные исследования тканей НЭН, таких как НЭОГ и ФХЦ, особенно в контексте биобанкированных образцов. Также, наша работа вносит существенный вклад в развитие представлений о механизме возникновения гормонально-неактивных аденом гипофиза. 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.

### **Теоретическая и практическая значимость**

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

### **Методология и методы исследования**

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 биоинформатики (анализ данных scRNA-seq, CNV анализ и поиск однонуклеотидных полиморфизмов).

### **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.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Результаты работы, представленные к защите, являются составными частями статей, опубликованных в трех рецензируемых научных журналах, и представлены на четырех научных конференциях. Цель, поставленная в работе, достигнута.

#### Публикации:

1. **Asaad W.**, Utkina M., Shcherbakova A., Popov S., Melnichenko G., Mokrysheva N. scRNA sequencing technology for PitNET studies // Front. Endocrinol. 2024. Vol. 15.

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., Popov S. Comparative evaluation of ACetic-MEthanol High Salt dissociation approach for single-cell transcriptomics of frozen human tissues // Front. Cell Dev. Biol. 2024. Vol. 12.

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, № 1.

#### Тезисы конференций:

4. **Асаад В.**, Девятяров Р. М., Щербакова А. С., Попов С. В., Уткина М. В.. 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. **Асаад В.**, Девятяров Р. М., Щербакова А. С., Попов С. В., Уткина М. В. 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.

6. **Асаад В.** scRNA-seq method in PitNETs studies // Конференция сирийских исследователей-экспатриантов, Сирия, 2024.

7. **Асаад В.**, Девятяров Р. М., Уткина М. В. Исследование транскриптома единичных клеток в различных типах НЭОГ // IX Молодежная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии, Санкт-Петербург, 2024.

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

### **Личное участие автора в проведении исследований**

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.

### **Структура и объем работы**

Диссертационная работа состоит из введения, трех глав («Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты»), обсуждения, заключения, выводов и приложений. Работа изложена на 140 страницах, содержит 32 рисунка и 4 таблицы. Список литературы включает 179 источников.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Общее представление о нейроэндокринных новообразованиях

Нейроэндокринные новообразования (НЭН) – гетерогенная группа опухолей, происходящих из нейроэндокринных клеток (НК) эмбриональной кишки, обладающих биологически активными свойствами. Нейроэндокринные клетки имеют определенные секреторные характеристики, обуславливающие развитие синдромов гиперпродукции регуляторных пептидов/гормонов, что, в свою очередь, может приводить к развитию соответствующих клинических симптомов.

Важной особенностью является, что НЭН могут быть локализованы практически в любом типе тканей. Наиболее частая локализация НЭН – желудочно-кишечный тракт, поджелудочная железа – более 60%, легкие – более 20%. Другая локализация может включать в себя мочевыделительную систему, кожные покровы, молочные железы и т. д. Отдельно необходимо отметить нейроэндокринные опухоли самой эндокринной системы, которые могут локализоваться в околощитовидных железах, гипофизе, надпочечниках и щитовидной железе [6–8]. По классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), НЭН подразделяются на высокодифференцированные нейроэндокринные опухоли (НЭО) – злокачественные опухоли, клетки которых сохраняют структурные особенности синтеза и секреции гормонов нормальной нейроэндокринной клетки и низкодифференцированные нейроэндокринные карциномы (НЭК) – злокачественные новообразования высокой степени злокачественности, клетки которых мало или совсем не экспрессируют эндокринные маркеры [9].

В большинстве случаев НЭН развиваются спорадически, однако до 25% могут быть в рамках некоторых наследственных синдромов – множественных эндокринных неоплазий (МЭН). МЭН – синдромы характеризуются наличием двух и более НЭН различной локализации. Например, синдром МЭН-1 чаще всего связан с развитием опухолей гипофиза, околощитовидных желез и поджелудочной

железы, а синдром МЭН-2 – опухолей щитовидной железы, околощитовидных желез и надпочечников [6, 10, 11].

В последние годы были зарегистрированы и другие ассоциации эндокринных опухолей, а именно аденомы гипофиза (АГ) и феохромоцитомы/параганглиомы (ФХЦ/ПГ). Наличие АГ и ФХЦ/ПГ у одного и того же пациента, также известное как «синдром 3РАs» (первые английские буквы наименований трех основных составляющих: Pituitary adenoma, Pheochromocytoma, Paraganglioma), встречается в клинической практике крайне редко [12]. АГ у пациентов с синдромом 3РАs – это пролактиномы, соматотропиномы и НАГ. Большинство из них крупные и локально агрессивные, или вовсе невосприимчивые к лечению. Семьдесят пять процентов пациентов с этим синдромом, описанных в литературе, нуждались в двух или более хирургических вмешательствах [13].

В 2015 году было установлено, что основные гены предрасположенности к ФХЦ/ПГ играют ключевую роль в развитии аденом гипофиза. Одним из таковых является ген, кодирующий сукцинатдегидрогеназу (SDH), мутация в зародышевой линии которого приводит к развитию синдрома 3РАs. SDH – это белок с двойной функцией: участвует в цикле Кребса (цикл трикарбоновых кислот), катализируя окисление сукцината до фумарата, а также в работе дыхательной цепи митохондрий, перенося электроны на кофермент Q (убихинон) [14]. Комплекс SDHx состоит из 4 белковых субъединиц (SDHA, SDHB, SDHC и SDHD) и двух факторов сборки (SDHAF1 и SDHAF2). Субъединицы SDH кодируются ядерными генами и действуют как гены-супрессоры опухолей [15]. Мутации в генах SDHx приводят к нарушению функции SDH и накоплению сукцината. Сукцинат накапливается в митохондриях, а затем перемещается в цитоплазму. Повышенное же содержание сукцината ингибирует активность пролилгидроксилазы, фермента, ответственного за гидроксилирование фактора, индуцируемого гипоксией 1 альфа (HIF-1 $\alpha$ ). В результате способность белка-онкосупрессора pVHL (Von Hippel–Lindau tumor suppressor) связываться с HIF-1 $\alpha$  снижается, предотвращая протеасомную деградацию фактора. HIF-1 $\alpha$  стабилизируется и транслоцируется в ядро, где активирует транскрипцию генов, связанных с ангиогенезом,

метаболической адаптацией и выживаемостью клеток, что в совокупности способствует опухолевому росту. Этот процесс называется «псевдогипоксией», так как стабилизация HIF-1 $\alpha$  происходит даже в условиях нормального уровня кислорода [16]. Кроме того, в 2015 году была опубликована обзорная статья, в которой были обобщены данные о 72 случаях сочетания АГ и ФХЦ/ПГ [171,172]. Согласно исследованию, у 29% пациентов были выявлены мутации в генах, связанных с развитием семейных форм АГ или ФХЦ/ПГ (MEN1, RET, SDHB, SDHC, SDHD, SDHAF2, SDHA, VHL), у 32% был отмеченотягощенный семейный анамнез, а в 39% случаев патология была без подтверждённых генетических мутаций [171,172].

Таким образом, в развитии АГ и ФХЦ/ПГ участвуют гены, ответственные за развитие семейных ФХЦ/ПГ (SDHx, MAX, TMEM127), тогда как среди генов, ответственных за развитие семейных АГ, только для *MEN1* была доказана его роль в развитии обоих типов опухолей [17].

### ***1.1.1. Эпидемиология***

По мировым оценкам, заболеваемость и распространенность НЭН составляют 6 случаев на 100 000 и 35 на 100 000 населения, соответственно [18]. Исследования указывают на неуклонный рост заболеваемости и распространенности НЭН, что, возможно, связано с улучшением диагностики на ранних стадиях [7, 19]. Тактика лечения НЭН зависит от степени дифференцировки и злокачественности опухоли, требует точного определения ее функционального статуса, стадии прогрессирования и наличия метастазов [20]. Именно это является причиной необходимости проведения не только гистологического исследования, но и расширенного ИГХ-исследования, по результатам которого уточняется/определяется функциональная активность, позволяющая подтвердить клинический диагноз, оценивается индекс пролиферации, что позволяет оценить злокачественный потенциал, а также выявить ряд возможных мишеней для терапии, к которым относятся рецепторы к соматостатину (SSTR) 2А и 5-го подтипов. В последние годы были разработаны методы лечения различных типов

НЭН [21]. Например, примерно 80% НЭО желудочно-кишечного тракта экспрессируют SSTR, преимущественно 2-го подтипа, НЭК не экспрессируют SSTR [22]. Аналоги соматостатина (АСС) были разработаны в первую очередь для контроля симптомов функционирующих НЭН (антисекреторный эффект). Результаты исследований PROMID, CLARINET и CLARINET OLE подтвердили, что АСС также оказывают положительное влияние на беспрогрессивную выживаемость (БПВ) при панкреатических и непанкреатических НЭН благодаря своему антипролиферативному эффекту [23].

Результаты исследования PROMID подтвердили противоопухолевый эффект АСС и обобщили использование октреотида длительного высвобождения (LAR), независимо от функциональной принадлежности НЭН. В исследование были включены 85 пациентов с хорошо дифференцированными ( $Ki67 < 2\%$ ) местнораспространенными неоперабельными или метастатическими НЭО средней кишки (функционирующими и нефункционирующими), которые были рандомизированы на прием октреотида LAR (30 мг внутримышечно каждые 28 дней) или плацебо в течение 18 месяцев до прогрессирования опухоли или смерти. Через 6 месяцев лечения в группе октреотида LAR заболевание оставалось стабильным у 66,7% пациентов по сравнению с 37,2% пациентов в группе плацебо. БПВ была значительно выше в группе октреотида LAR по сравнению с плацебо (14,3 месяца против 6 месяцев, соответственно;  $HR = 0,34$ ). Положительное влияние октреотида LAR на общую выживаемость установить не удалось [23].

В исследование CLARINET были включены 204 пациента, ранее не получавших лечения, с распространенными хорошо или умеренно дифференцированными ( $Ki67 < 10\%$ ) нефункционирующими гастроэнтеропанкреатическими опухолями (Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors – GEP-NET), они были рандомизированы на прием ланреотида аутожель (120 мг подкожно каждые 28 дней) или плацебо в течение 96 недель. Медиана БПВ не была достигнута для ланреотида аутожель в 96-недельном исследовании по сравнению с 18 месяцами при использовании плацебо ( $HR = 0,47$ ). Показатели БПВ составили 65,1% в группе ланреотида аутожель и 33,0% в группе плацебо через 24



месяца. Различий в качестве жизни и общей выживаемости получено не было [24, 25].

### ***1.1.2. Описание и эпидемиология нейроэндокринных опухолей – феохромоцитомы и паранглиомы***

Феохромоцитомы и паранглиомы (ФХЦ/ПГ) – редкие нейроэндокринные опухоли, продуцирующие катехоламины (норадреналин или адреналин) и входящие в некоторые синдромы с множественным поражением эндокринных желез, в том числе в синдром ЗРАs. Повышение катехоламинов может predispose к сердечно-сосудистым и желудочно-кишечным заболеваниям, а также к метаболическим нарушениям, таким как сахарный диабет [173]. ФХЦ/ПГ возникают из хромоаффинных клеток мозгового вещества надпочечников и симпатических ганглиев, соответственно, которые происходят из нервно-ассоциированных потомков нервного гребня или предшественников шванновских клеток [174]. В 80% случаев эти опухоли возникают в мозговом веществе надпочечников, а в остальных 20% за их пределами – в превертебральных и паравертебральных симпатических ганглиях. Частота возникновения ФХЦ/ПГ колеблется от 0,04 до 0,95 случаев на 100 000 человек в год [26] и достигает пика между 3-й и 5-й декадами жизни, и порядка 20% случаев приходится на детский возраст [27].

ФХЦ/ПГ обладают высокой гетерогенностью, включая клинические, генетические и транскрипционные профили. Хотя большинство ФХЦ/ПГ являются доброкачественными, около 20% метастазируют, причем две трети отдаленных метастазов локализуются в костях [28]. Клиническое течение у пациентов с ФХЦ/ПГ различно – некоторые пациенты переживают длительные бессимптомные периоды, в то время как у других заболевание быстро прогрессирует. Пятилетняя выживаемость при ФХЦ/ПГ составляет около 60%. На данный момент хирургическое лечение является первичной терапией и может быть излечивающим для одиночных опухолей. Терапевтические возможности для метастатических

вариантов ФХЦ/ПГ ограничены и включают местную, радионуклидную и системную терапию [29].

ФХЦ и ПГ входят в число опухолей с высоким уровнем наследственной предрасположенности. До 35% случаев ФХЦ/ПГ генетически опосредованными. Эти случаи часто встречаются в контексте семейных синдромов, включая множественную эндокринную неоплазию 2А типа (MEN2A), синдром Вон Хиппеля – Линдау (VHL-синдром) и нейрофиброматоз 1-го типа (NF1) [30]. Кроме того, от 35% до 45% случаев обусловлены соматическими мутациями. В общей сложности зародышевые и соматические мутации обнаружены более чем в 20 различных генах, функционально объединенных в два основных кластера. Кластер 1 характеризуется развитием опухолевого процесса в направлении псевдогипоксического пути и включает гены, которые кодируют фермент цикла Кребса – *SDHx* (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*) и ген-супрессор опухоли Вон Хиппеля – Линдау (*VHL*). Кластер 2 характеризуется активацией сигнальных путей киназы и включает гены *RET*, *NF1*, *HRAS*, *TMEM127*, *MAX*, *FGFR1*, *MET*, *MERTK*, *BRAF*. С идентификацией новых соматических драйверов, включая слияние генов, был идентифицирован новый кластер 3, представляющий опухоли с активацией сигнального пути Wnt ( $\beta$ -катенин-зависимый и независимый путь). Этот кластер включает ФХЦ/ПГ с сочетанным влиянием активации транскрипционного коактиватора 3 (*MAML3*), чаще всего *UBTF-MAML3*, и соматическими мутациями в *CSDE1*, и может быть связан с более агрессивным течением заболевания [31].

### ***1.1.3. Анализ метастатического потенциала феохромоцитом и паранганглиом***

В последней классификации эндокринных опухолей, представленной ВОЗ [32], был устранен подход к разграничению ФХЦ/ПГ на доброкачественные и злокачественные. Теперь данные новообразования классифицируются исключительно по признаку метастатической активности: их разделяют на метастатические и неметастатические, в зависимости от наличия метастазов в нехромаффинной ткани. Скорость метастазирования чрезвычайно изменчива.

Обычно наличие мутаций в гене *SDHB* считается самым сильным предиктором, связанным со значительным риском метастатического заболевания, приводящим к метастазам у 40% или более пациентов. Некоторые гистологические особенности, такие как некроз опухоли, митозы более трех на десять полей зрения, капсулярная инвазия и инвазии сосудистой или жировой ткани, были предложены в качестве прогностических маркеров наиболее агрессивных опухолей [33].

Однако реальная прогностическая эффективность многих из этих параметров, включая митотическую активность и сосудистую инвазию, остается весьма ограниченной. Подобным образом, даже локальная инвазия, затрагивающая соседние ткани, не всегда служит достоверным индикатором повышенного риска метастатического прогрессирования. Маркер пролиферации Ki67 также использовался для прогнозирования метастатического поведения ФХЦ/ПГ [34]. Однако пролиферативный индекс Ki67 характеризуется высокой специфичностью по сравнению с низкой чувствительностью, поскольку почти половина злокачественных ФХЦ характеризуется индексом  $Ki67 < 2-3\%$ , и это состояние может быть связано с ограниченным количеством клеток, находящихся в фазе клеточного цикла, в которой экспрессируется Ki67. Кроме того, несколько молекулярных маркеров, таких как *SDHB*, *MAML3*, *SNAIL*, *hTERT*, *HSP90*, *STAT3*, *HuR*, *COX-2*, *VEGF*, *HIF1alpha* и секретоградин, также были связаны с метастатическими ФХЦ/ПГ [35]. На основе этих данных были разработаны различные системы для оценки метастатического риска данных новообразований.

Первая предложенная система оценки – шкала феохромоцитомы надпочечников (PASS) для подтверждения опухоли, созданная на основе ретроспективного исследования, проведенного на когорте из 100 случаев ФХЦ [35]. Система основана на анализе 12 гистологических признаков, характерных для метастатических ФХЦ, и демонстрирует корреляцию между значением  $PASS \geq 4$  и метастатическим потенциалом опухоли. Последующие исследования подтвердили связь этой шкалы с риском рецидивов и метастазов [36]. Однако применение PASS ограничено ФХЦ, а высокая вариабельность морфологических критериев между врачами-патоморфологами снижает ее достоверность [37].

Для определения надежных гистопатологических предикторов развития метастазов, группой исследователей из Японии была предложена система оценки ФХЦ и ПГ (GAPP), на основе анализа 163 новообразований, включая 40 метастатических опухолей [38]. Данная система объединила гистологические, иммуногистохимические и биохимические критерии, а также гистологическую картину, клеточность, некрозы, инвазии, индекс Ki67 и тип секреции катехоламинов. Опухоли получали оценку от 0 до 10 и классифицировались как хорошо, умеренно или плохо дифференцированные. Система GAPP коррелирует с метастатическим потенциалом, однако показала ограниченную эффективность в отношении метастатических и неметастатических ФХЦ, ассоциированных с синдромом MEN2A.

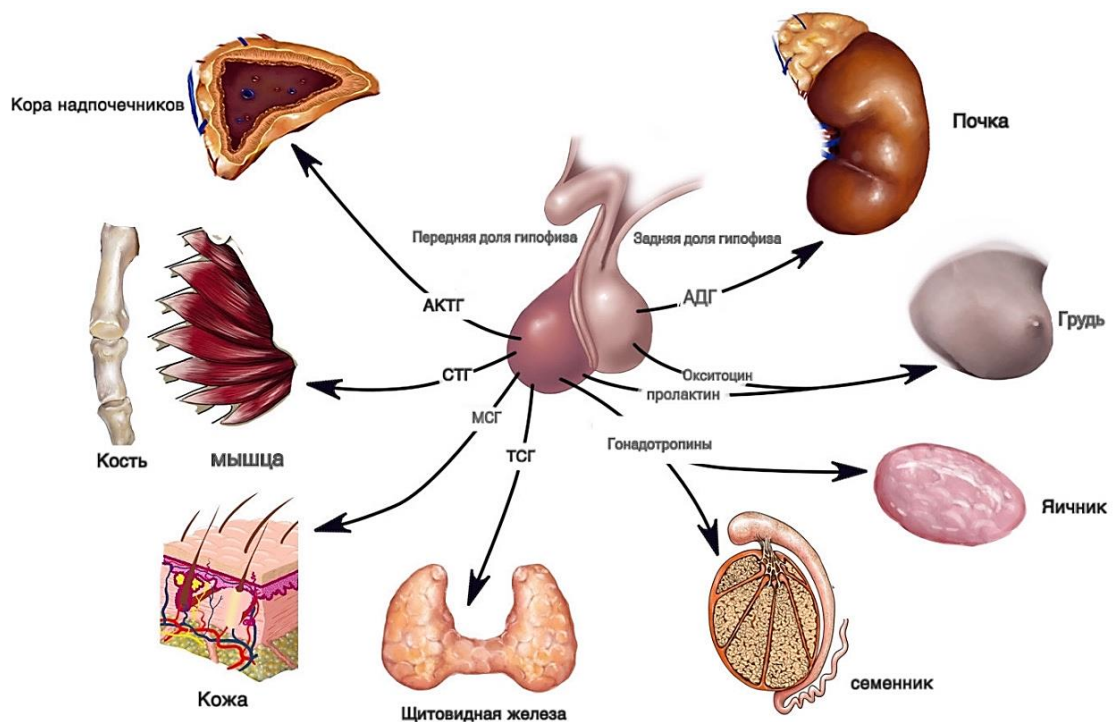
Как было указано ранее, ФХЦ/ПГ отличаются повышенной клеточной гетерогенностью. Полагается, что опухолевая гетерогенность – это одна из причин ограничивающая эффективное прогнозирование течения заболевания у пациентов. Клиническая и гистопатологическая диагностика риска гетерогенности и метастазирования ФХЦ/ПГ особенно сложна и по-прежнему ограничена отсутствием надежных прогностических маркеров [39]. Тем не менее последние достижения передовых технологий, о которых будет сказано несколько позже, позволяют раскрыть транскрипционные состояния, связанные с физическим положением отдельных клеток опухоли, и являются ключевыми для изучения клеточных популяций, характеризующихся высокой гетерогенностью.

#### ***1.1.4. Описание и эпидемиология нейроэндокринных опухолей гипофиза***

Нейроэндокринные опухоли гипофиза (НЭОГ), также называемые аденомами гипофиза, представляют собой опухоли, происходящие из клеток передней доли гипофиза [40]. Гипофиз, главная железа эндокринной системы, регулирующая функции других эндокринных желез в организме (Рисунок 1). Обе доли гипофиза, передняя и задняя, содержат множество различных типов клеток, что объясняет многообразие функциональных проявлений новообразований данной области. Передняя доля гипофиза (ПДГ), или аденогипофиз, расположена в

гипофизарной ямке турецкого седла клиновидной кости черепа и контролируется гипоталамусом. Задняя доля, называемая нейрогипофизом, выполняет функции хранения и секреции гормонов окситоцина и вазопрессина (*син.* антидиуретического гормона, АДГ).

ПДГ состоит из как минимум пяти основных типов гормон-секретирующих клеток (соматотрофы, гонадотрофы, лактотрофы, тиреотрофы и кортикотрофы), а также других типов клеток, таких как фолликулярно-звездчатые клетки и зрелые прогениторные клетки. Эти клетки реагируют на сигналы гипоталамуса и периферических регуляторов, секретируют гормоны, которые регулируют жизненно важные функции в периферических тканях и органах [41]. Например, соматотрофы вырабатывают гормон роста (соматотропный гормон, СТГ), гонадотрофы – лютеинизирующий гормон (ЛГ) и фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лактотрофы – пролактин (ПРЛ), тиреотрофы – тиреотропный гормон (ТТГ), а кортикотрофы – адренокортикотропный гормон (АКТГ).



**Рисунок 1** – Две доли гипофиза. Передняя доля (аденогипофиз) секретирует ключевые гормоны, такие как СТГ, ПРЛ, АКТГ, ТТГ, ФСГ и ЛГ. Задняя доля (нейрогипофиз), происходящая из нервной ткани, накапливает и выделяет окситоцин и вазопрессин, которые синтезируются в гипоталамусе. Взято с изменениями из [42]

Опухоли передней доли гипофиза составляют примерно 15–20% внутричерепных новообразований и являются наиболее распространенными опухолями нейроэндокринной системы [40, 43]. Несмотря на то, что НЭОГ в основном доброкачественные, они могут проявлять инвазивное, агрессивное поведение и злокачественное метастазирование, что подчеркивает важность их детального изучения. Эти опухоли встречаются с частотой от 3,9 до 7,4 случаев на 100 000 населения в год (среднегодовая частота составляет около 5,1 случая на 100 000 человек) [44–47]. Соотношение встречаемости по полу несколько выше у женщин, у детей опухоли гипофиза редки, но среди них также чаще встречаются у девочек с соотношением 1,8:1 [48]. Учитывая гетерогенный и многокомпонентный характер ткани гипофиза, НЭОГ демонстрируют широкий спектр разнообразных клинических проявлений.

#### ***1.1.5. Классификация нейроэндокринных опухолей гипофиза***

В целом, НЭОГ классифицируются на основании клеточных линий опухоли, выявляемых с помощью ИХГ анализа на основании экспрессии трех основных транскрипционных факторов, SF1, PIT1 и TRIT, а также уровню гормонов гипофиза, которые секретируются гормон-продуцирующими клетками опухоли гипофиза (СТГ, АКТГ, ТТГ, ФСГ, ЛГ и ПРЛ) в кровь [40, 49]. Согласно клинко-патологической классификации, НЭОГ делятся на линии PIT1 (гормон-секретирующие лактотрофные, соматотрофные, тиреотрофные, маммосоматотрофные опухоли и неактивные опухоли PIT1), кортикотрофную линию TRIT (гормон-секретирующие кортикотрофные опухоли и неактивные опухоли TRIT), гонадотрофную линию SF1 (гормон-секретирующие гонадотрофные опухоли и неактивные опухоли SF1), нефункциональные или ноль-клеточные опухоли (не производят гормоны и не содержат транскрипционные факторы PIT1, TRIT, SF1 или GATA2, за исключением эмбриональной экспрессии  $\alpha$ -субъединицы в редких случаях) и плюригормональные НЭОГ. В рамках этой классификации НЭОГ клинически делятся на гормон – секретирующие (функциональные, активные) аденомы и неактивные («молчащие»,

нефункционирующие) аденомы гипофиза (НАГ). НАГ классифицируются по экспрессии транскрипционных факторов на неактивные PIT1, неактивные TRIT, неактивные SF1 или ноль-клеточные опухоли [45, 50–52]. Функциональные опухоли вызывают симптомы, связанные с гормональной гиперсекрецией, такие как акромегалия (повышенный уровень в крови СТГ), синдром аменореи-галактореи или гипогонадизм при гиперпролактинемии, либо болезнь Иценко – Кушинга при гиперкортицизме вследствие избыточной продукции АКТГ [50]. Несмотря на то, что НАГ не вызывают гормонального гиперсекреторного синдрома, они могут приводить к симптомам, связанным с масс-эффектом, такими как ухудшение зрения, головные боли или гипопитуитаризм.

Согласно исследованиям, НАГ составляют около 30% всех НЭОГ. Большинство НАГ (73%) относятся к гонадотрофной линии SF1, 16% – к неактивным кортикотрофным аденомам (НКА), кортикотрофной линии TRIT, а «молчащие» аденомы линии PIT1 составляют 9% случаев НАГ. Истинно ноль-клеточные опухоли встречаются редко и составляют менее 5% [40, 49, 53]. Некоторые исследователи полагают, что опухолей с ноль-клеточной линией может не существовать вовсе [54].

Наиболее частой ассоциацией среди плюригормональных НЭОГ является сочетание СТГ и ПРЛ, однако редкие ассоциации, такие как сочетание СТГ и АКТГ, также описаны в литературе [55, 56]. Клинически наиболее выраженная гиперсекреция СТГ выявляется при субклиническом течении болезни Иценко – Кушинга. Патогенез плюригормональных опухолей может быть связан с неопластической трансформацией двух различных клеточных линий или транс-дифференцировкой одной гормон-продуцирующей клеточной линии в другую. В случае соматомаммотропином предполагается более низкая дифференцировка – из предшественника для обеих линий. Гистологически плюригормональные НЭОГ составляют около 10–15% всех опухолей гипофиза [55].

Кроме того, НЭОГ классифицируют по размеру и инвазивности опухоли. Согласно данным магнитно-резонансной томографии (МРТ), НЭОГ подразделяются на микроаденомы (< 10 мм в диаметре), макроаденомы ( $\geq$  10 мм) и гигантские опухоли ( $\geq$  40 мм) [50]. Частота инвазивных опухолей всех типов

варьирует от 30 до 65% в зависимости от изучавшейся когорты пациентов, периода исследования и диагностических критериев. Крупные опухоли чаще имеют инвазивный характер роста [57, 58].

## **1.2. Диагностика и лечение гипофизарных нейроэндокринных опухолей**

Симптомы НЭОГ зависят от множества различных факторов. Первое – это тип опухолевых клеток, и, как следствие, клинические проявления повышенного уровня гормонов в сыворотке крови пациента. Второе – это «масс-эффект» опухоли на окружающие структуры, вследствие чего НЭОГ могут вызывать такие симптомы, как головная боль и нарушение полей зрения, а также снижение секреции гормонов гипофиза нормальной тканью железы за счет ее сдавления опухолью, или гипопитуитаризм, за счет чего могут наблюдаться такие проявления, как гипогонадизм у мужчин и женщин, надпочечниковая недостаточность, гипотиреоз, СТГ-дефицит. Для диагностики НЭОГ проводят исследования уровня гормонов в крови и моче, в том числе на фоне разработанных функциональных тестов, отклонение которых указывают на активность опухоли.

АКТГ-секретирующие опухоли, встречающиеся при болезни Иценко – Кушинга, могут быть локализованы не только в гипофизе, что затрудняет их диагностику и требует проведения дополнительных исследований таких, как двусторонний селективный забор крови из нижних каменистых синусов [175]. Диагностические возможности селективного забора в различных модификациях и методов лучевой и радионуклидной визуализации в диагностике и дифференциальной диагностике АКТГ-зависимого гиперкортицизма дают возможность поставить точный диагноз и вылечить пациента [176]. Подобная ситуация возможна с СТГ-секретирующими эктопическими опухолями.

Визуализирующие методы диагностики являются обязательными для оценки прогрессирования заболевания [40]. МРТ в большей степени и в меньшей степени компьютерная томография (КТ) и позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) – это различные методы визуализации, применяемые для диагностики НЭОГ. Также необходимы неврологическое обследование и компьютерная оценка полей зрения.



Выявление аденом гипофиза на ранней стадии имеет решающее значение для своевременного и эффективного лечения, а также предупреждения опасных для жизни и здоровья осложнений [59].

При выявлении НЭОГ в большинстве случаев лечением первой линии является транссфеноидальная аденомэктомия с последующим динамическим наблюдением. Исключением являются пролактиномы, для которых первично назначают медикаментозную терапию (бромокриптин или каберголин) [177]. Помимо хирургического и медикаментозного лечения при отсутствии ремиссии или прогрессировании заболевания применяют лучевую и химиотерапию [53]. В последние годы молекулярно-таргетная терапия стала перспективным методом для лечения отдельных типов НЭОГ. Например, установлено, что АСС замедляют рост опухоли и снижают гиперпродукцию гормонов благодаря взаимодействию с SSTR, которые часто гиперэкспрессируются в НЭО [6, 60].

### **1.3. Применение scRNA-seq для изучения нейроэндокринных опухолей**

Метод scRNA-seq предназначен для исследования транскриптома отдельных клеток различных тканей. Основное применение этого метода – выявление транскрипционных сходств и различий внутри клеточной популяции в ткани. На сегодняшний день технология scRNA-seq является самым современным подходом для определения различных уровней гетерогенности в тканях и получения более глубокого понимания разнообразия функций и организации клеток [61, 62]. Преимущество scRNA-seq заключается в способности выявлять редкие типы клеток и уникальные компоненты ткани, что значительно превосходит возможности традиционных методов секвенирования РНК. Например, метод объемного секвенирования РНК измеряет лишь средний уровень экспрессии в клеточной популяции, из-за чего информация о клеточной гетерогенности остаётся недоступной [63]. С момента публикации метода scRNA-seq в 2009 году [64], его активно используют для получения большого объема данных о различных типах клеток и тканей, таких как эмбриональные и иммунные ткани [62, 65–67].

Выдающееся разрешение scRNA-seq делает его мощным инструментом для изучения компонентов и гетерогенности сложных опухолевых тканей, таких как НЭО. Интерес к этой области значительно вырос в последние годы, и несколько исследований уже продемонстрировали уникальные преимущества секвенирования отдельных клеток для интерпретации гетерогенности опухолей и предоставления ценной информации о патологии этих опухолей.

При исследовании нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы была выявлена, как внутриклеточная, так и межклеточная гетерогенность среди субпопуляций клеток, включая злокачественные клетки, макрофаги, Т-клетки и фибробласты во всех участках опухоли [68]. Также было обнаружено изменение нескольких ключевых признаков канцерогенеза, таких как пути гипоксии, метаболическое перепрограммирование и агрессивная пролиферация, которые активировались на различных стадиях прогрессирования опухоли. Последующее исследование еще глубже изучило гетерогенность опухолей в различных группах классификации Grade при нефункциональных нейроэндокринных опухолях поджелудочной железы [69]. В результате исследования были выявлены значительные различия в активации основных путей в опухолевых клетках в зависимости от гистологических характеристик и паттернов геномной нестабильности. Кроме того, были идентифицированы специфические типы клеток, такие как лимфатические эндотелиальные клетки, макрофаги, CD1a<sup>+</sup> дендритные клетки, Т-регуляторные клетки, инвариантные Т-клетки, связанные со слизистой оболочкой (MAIT-клетки), лимфоидные клетки врождённого иммунитета (ILC) и опухоль-ассоциированные фибробласты (CAF), которые могут участвовать в процессе метастазирования в печени, что способствует пониманию злокачественного потенциала нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы.

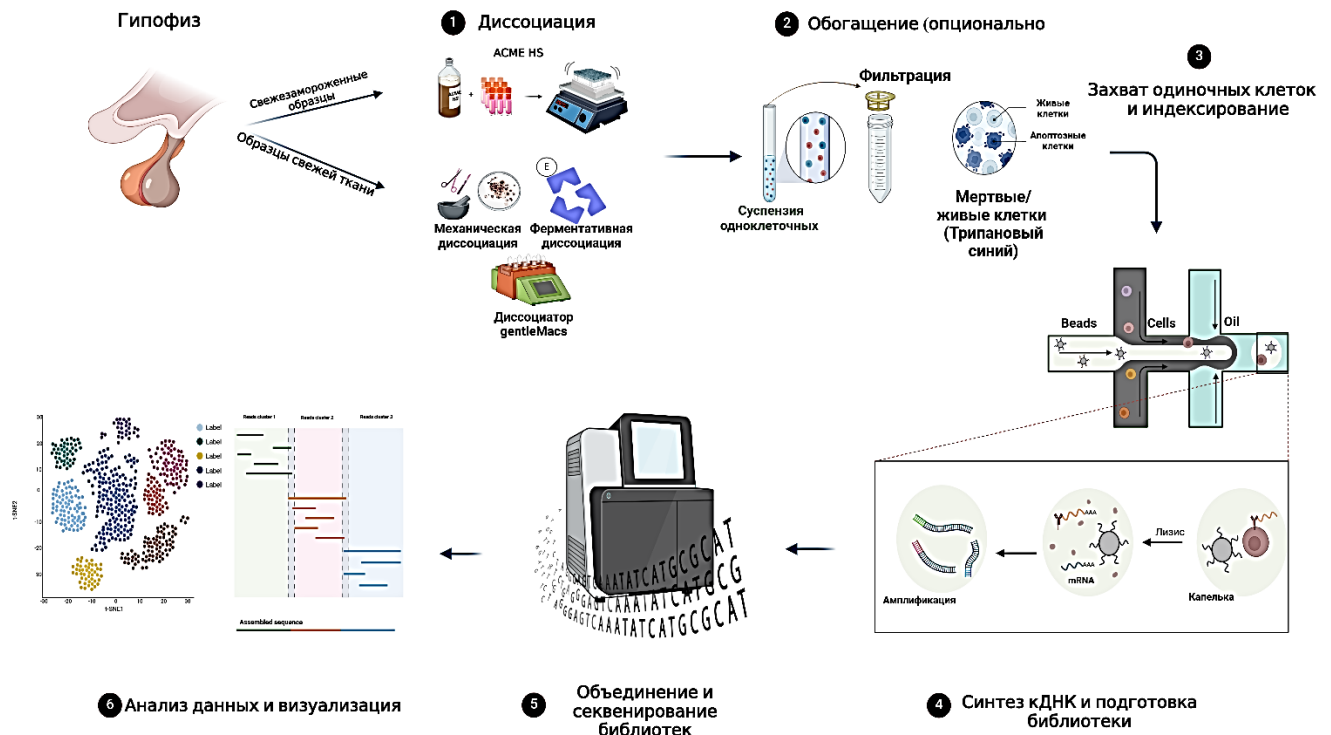
Другие исследования еще больше осветили свойства опухолевых тканей и выявили важные маркеры для диагностики, лечения и прогноза [70–72]. Дальнейшие исследования в этой области необходимы для накопления знаний о

НЭО, что в конечном итоге позволит улучшить медицинские протоколы и повысить качество лечения пациентов.

Технология scRNA-seq также позволяет выполнять детальное профилирование отдельных клеток гипофиза и предоставляет глубокое представление о его клеточном составе, характере генной экспрессии и молекулярном разнообразии. Неоднородность молекулярной патологии и вариабельность клинических проявлений НЭОГ затрудняют их классификацию и создают значительные трудности при диагностике и прогнозировании этих опухолей [73]. Ранее были изучены различные профили экспрессии для разных типов клеток и линий НЭОГ [74–76]. Однако внедрение технологии scRNA-seq в эти исследования позволило преодолеть существующие ограничения, выявить новые маркеры, активированные пути и клеточные взаимодействия, ранее не описанные.

### ***1.3.1. Общая схема работы метода scRNA-seq***

Технология scRNA-seq привлекает внимание благодаря возможности исследовать транскриптомы на уровне отдельных клеток. Однако максимальная эффективность этого метода достигается только при использовании оптимальных протоколов на каждом этапе многоступенчатой процедуры scRNA-seq. Уже опубликованы различные протоколы scRNA-seq для разных типов тканей [62, 77], и выбор подходящего протокола зависит от множества факторов, включая конкретную цель исследования и тип исследуемой ткани. Рабочий процесс для scRNA-seq тканей гипофиза представлен на Рисунке 2.



**Рисунок 2** – Схема работы протоколов scRNA-seq для тканей гипофиза человека.  
Создано с помощью программы BioRender.com

На первом этапе scRNA-seq для образцов гипофиза проводится получение клеточной суспензии. После хирургического извлечения образца гипофиза (например, эмбриональный гипофиз можно извлечь под стереомикроскопом) свежая ткань диссоциируется с использованием механического измельчения скальпелем [78], лазерной микродиссекции путем захвата, ферментативного расщепления коллагеназой II/IV [3, 79, 80], коллагеназой I/II/IV [5] или коллагеназой VIII [4] при температуре 37°C в течение 15–30 минут. Также применяют комбинацию ферментативных и механических методов диссоциации с использованием прибора gentleMACS и коммерческого набора Human Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Германия), которые используются во многих исследованиях [81–83]. Стоит отметить, что извлечение неповрежденных клеток для scRNA-seq из свежемороженых твердых тканей – сложная задача, что ограничивает применение метода scRNA-seq.

После подготовки суспензии единичных клеток можно провести дополнительный этап обогащения для выделения определенной популяции клеток. Этот этап можно пропустить, если исследуется небольшая опухолевая ткань, и

ождается значительная потеря клеток, как, например, при микроаденоме гипофиза. Дополнительное обогащение может быть выполнено с использованием сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) с целью выделения определенного типа клеток в ткани для последующего анализа. Один из самых распространенных методов обогащения – фильтрация суспензии клеток через фильтры размером 40, 45 или 70 мкм для удаления клеточных агрегатов, после чего клетки центрифугируют и ресуспендируют в фосфатном буферном солевом растворе (PBS) с 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA) [81] или с 10%-й фетальной бычьей сывороткой (FBS) [3]. Оценка жизнеспособности клеток с использованием трипанового синего [81], обработка суспензии лизирующим буфером для удаления эритроцитов [5] или повторное ферментативное расщепление с использованием таких ферментов, как аккутаза [84], трипсин, TrypLE или диспаза для разрушения оставшихся клеточных кластеров – также часто применяемые методы обогащения.

Следующий этап – захват и распределение единичных клеток для переноса каждой клетки в отдельную реакционную пробирку (или лунку, или камеру). Существует два метода захвата клеток: низкопроизводительный и высокопроизводительный. К низкопроизводительным методам захвата клеток относится одномолекулярное секвенирование в реальном времени (single molecule real time sequencing или SMRT-seq), которое описано в работах [79, 80].

К высокопроизводительным методам захвата клеток относятся FACS, магнитно-активированная сортировка клеток (MACS) и методы микрофлюидики. На практике капельные методы микрофлюидики широко используются для исследований scRNA-seq гипофиза [3, 5, 81–83]. Этот метод позволяет создавать капли – «вода в масле», что значительно увеличивает пропускную способность секвенирования единичных клеток. Он также дает возможность комбинаторной предварительной индексации РНК-транскриптов путем совместного инкапсулирования клеток и баркодированных гелевых частиц, чтобы вся РНК из каждой клетки могла быть помечена уникальным олигонуклеотидом. Основные методы капельного секвенирования одиночных клеток – это 10X Genomics, InDrop

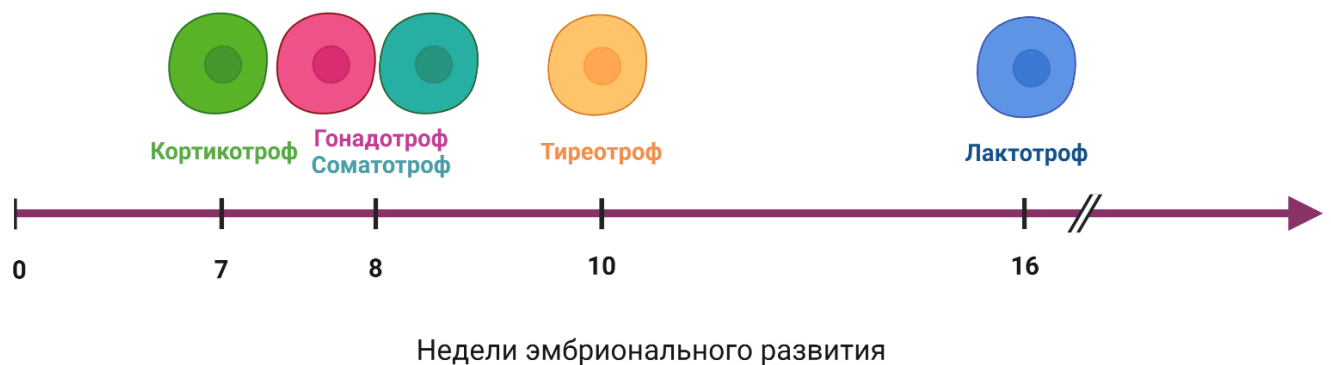
и Drop-seq, которые различаются типом частиц, дизайном баркодов и типом амплификации кДНК [85].

Следующий этап – секвенирование амплифицированных кДНК – библиотек методом секвенирования нового поколения (NGS). Существуют различные платформы для секвенирования; наиболее популярными являются секвенаторы Illumina, которые используют мостиковую амплификацию и секвенирование путём синтеза, на долю которого приходится более 90% всех данных секвенирования. Последний ключевой этап – анализ данных scRNA-seq [86, 87]. Анализ начинается с обработки сырых данных, включая фильтрацию ридов, демультиплексирование, сопоставление с эталонным геномом и количественную оценку для создания матриц генов/штрих-кодов. Для устранения артефактов, таких как амбиентная РНК, апоптотические клетки и дуплитеты применяются различные биоинформатические подходы, включающие различные алгоритмы фильтрации. Далее проводится линейное сокращение размерности данных на основе выбранных признаков и генов. Последний этап – кластеризация клеток и визуализация данных на основе проведенного анализа.

### ***1.3.2. Изучение процессов развития здоровых клеток гипофиза с использованием технологии scRNA-seq***

Первое опубликованное исследование, посвященное применению метода scRNA-seq для изучения гипофиза человека, было проведено в 2020 году [80]. В этом исследовании ученые анализировали эмбриональные ткани гипофиза для понимания молекулярных процессов развития и временных рамок дифференцировки эндокринных клеток. Проанализировав данные scRNA-seq 21 человеческого эмбриона на сроках от 7 до 25 недель после оплодотворения, они выявили 14 различных клеточных кластеров в передней и задней долей гипофиза (Рисунок 3). Дальнейший анализ этих кластеров позволил проследить динамику дифференцировки клеток гипофиза, при которой кортикотрофы являются первым типом клеток, появляющимся на седьмой неделе. Затем на восьмой неделе

появляются гонадотрофы и соматотрофы, на десятой – тиреотрофы, а на шестнадцатой – лактотрофы (Рисунок 3).

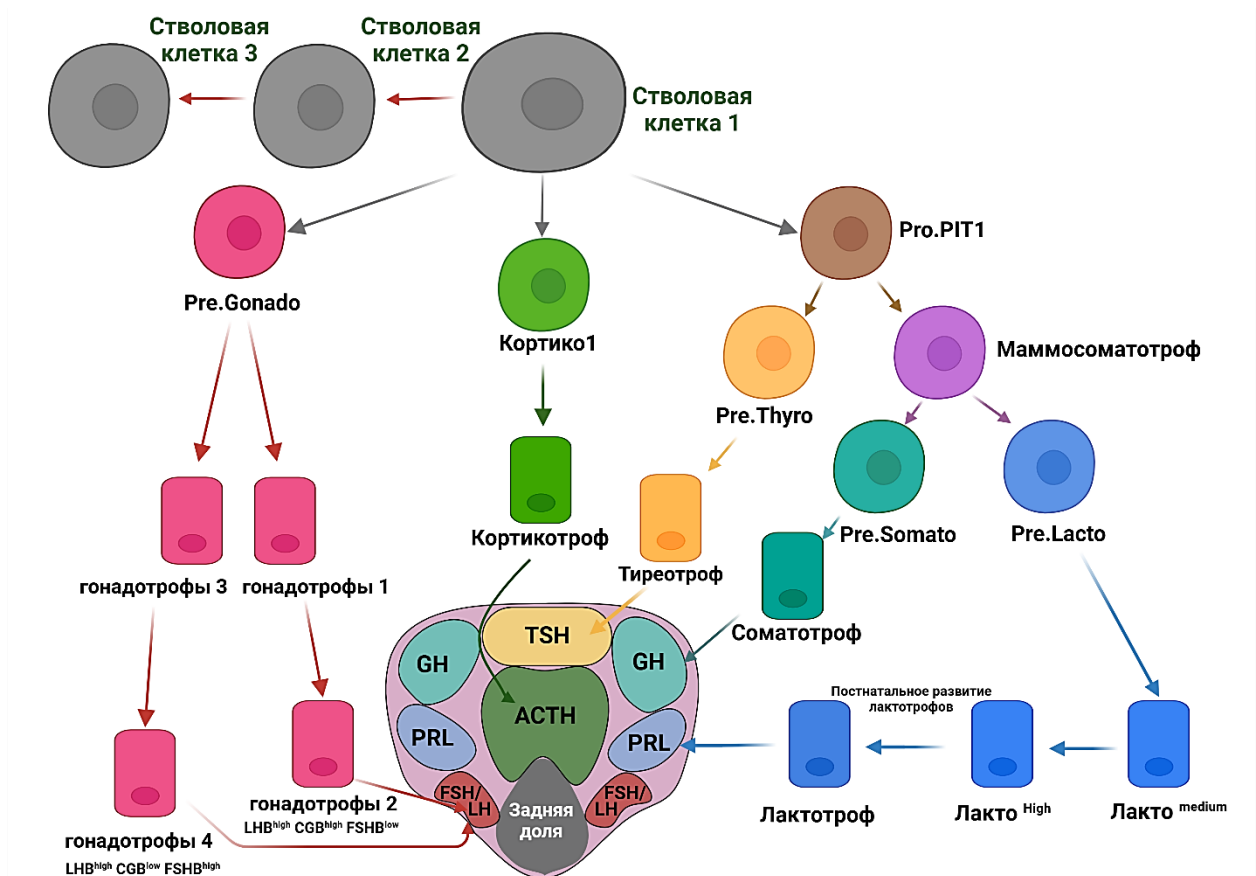


**Рисунок 3** – Временная иллюстрация эмбрионального развития клеток гипофиза человека. Создано с помощью Biorender.com

Эти результаты были подтверждены методами ИГХ и иммунофлуоресценции в той же статье. Клеточный кластер Pro.PIT1 был определён, как общий кластер предшественников всех трех гормон-продуцирующих типов клеток ацидофильной линии PIT1 (лактотрофы, соматотрофы и тиреотрофы), а также предшественников тиреотрофов – Pre.Thy и потенциальных предшественников соматотрофов – Pre.Som. Кроме того, были охарактеризованы стволовые клетки, сгруппированные в кластеры с помощью анализа обогащения набора генов (GSEA – анализ обогащения по функциональной принадлежности), и идентифицированы сигнальные пути, связанные с клеточной пролиферацией, клеточным циклом и регуляцией внеклеточного матрикса (extracellular matrix, ECM). Благодаря возможностям scRNA-seq смогли выделить три субпопуляции стволовых клеток: STEM1 (Стволовая клетка 1), STEM2 (Стволовая клетка 2) и STEM3 (Стволовая клетка 3). Эти субпопуляции различались обогащенными путями индукции и подавления клеточной пролиферации, что свидетельствует о смене эмбрионального состояния стволовых клеток гипофиза, поддерживаемого негативной регуляцией клеточной пролиферации, а также перестройками в транскрипционных факторах и сигнальных путях. Кроме того, была охарактеризована клеточная гетерогенность ткани гипофиза и выявлены многоступенчатые траектории развития гонадотрофов

и кортикотрофов. Это включает траекторию развития Cortico1 (Кортико1), затем Cortico2 (Кортико2) для линии PIT-T, и Pre.Gonado, с последующим развитием либо в гонадотрофы 1, затем гонадотрофы 2, которые идентифицируются в соответствии с их профилями экспрессии маркерных генов как (LHB<sup>high</sup> CGB<sup>high</sup> FSHB<sup>low</sup>), либо в гонадотрофы 3, затем гонадотрофы 4, которые идентифицируются в соответствии с их профилями экспрессии маркерных генов как (LHB<sup>high</sup> CGB<sup>low</sup> FSHB<sup>high</sup>) для гонадотрофной линии SF1 (Рисунок 4). Другие клетки-предшественники в процессе развития гипофиза были выявлены позже. В другом исследовании, анализ данных экспрессии scRNA-seq гормон-секретирующих клеток показал сходство экспрессии между лактотрофами и соматотрофами, что подтверждает ранее опубликованные данные о том, что соматотрофы и лактотрофы дифференцируются из одних и тех же клеток-предшественников — маммосоматотрофов [84]. Также были определены траектории развития кластера Pro.PIT1 ПДГ [81]. Объединение данных о ПДГ взрослых и эмбрионов показало, что большое количество эмбриональных клеток PIT1 находится на стадии низкой дифференцировки, аналогично клеткам Pro.PIT1 во взрослом ПДГ, в то время как клетки линий TRIT и SF1 у взрослых людей соответствуют эмбриональным клеткам. Интеграция этих данных из разных исследований позволила предложить предполагаемую траекторию развития ПДГ (Рисунок 4). Эта траектория начинается от стволовой клетки (Stem1) и заканчивается полностью дифференцированными гормон-секретирующими клетками (кортикотрофами, лактотрофами, соматотрофами, тиреотрофами и гонадотрофами 2 и 4), проходя через промежуточные клетки-предшественники (Рисунок 4).





**Рисунок 4** – Траектория развития передней доли гипофиза на основании интегрированных данных из литературных источников [80, 81]. Траектория развития начинается от стволовой клетки (Стволовая клетка 1) и движется в направлении полностью дифференцированных гормон-секретирующих клеток (кортикотрофы, лактотрофы, соматотрофы, тиреотрофы и гонадотрофы 2 и 4). Стрелками указаны направления клеточной дифференцировки в горизонтальном разрезе гипофиза. Создано с помощью программы BioRender.com.

### **1.3.3. Изучение профиля экспрессии генов и клеточной гетерогенности нейроэндокринных опухолей гипофиза**

Применение метода scRNA-seq для изучения патологий НЭОГ на молекулярном уровне требует сравнения клеток опухолевой ткани со здоровыми клетками гипофиза. Это подтверждается анализом типов образцов в разных исследованиях. Например, в двух исследованиях 2023 и 2024 годов были использованы три ткани здорового гипофиза взрослого человека против 21 образца НЭОГ и четыре здоровые ткани гипофиза против 24 образцов НЭОГ, соответственно. Такое сравнение позволяет выявить различия в профилях экспрессии генов между нормальными и опухолевыми клетками разных линий.

Например, было установлено, что, сравнивая дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) в опухолевых и нормальных клетках, большинство ДЭГ в гонадотропинах снижено, тогда как в соматотропинах и пролактиномах – повышено [79]. Считается, что гонадотропные опухоли контролируются механизмами ДНК-метилирования или другими эпигенетическими процессами [88, 89], что может объяснить пониженную экспрессию ДЭГ в гонадотропных опухолях [79]. Также были определены гены, связанные с опухолями: *AMIGO2*, *ZFP36*, *BTG1* и *DLG5*. Дополнительные опухоль-ассоциированные гены были выявлены в исследовании Zhang S. и соавт. [81], где были определены молекулярные маркеры для каждой линии клеток: *ENPP1*, *NTS*, *GATA3*, *IGFBP7* и *LRRC4C* как специфические маркеры для ацидофильной линии PIT1; *ID4* и *CITED1* для кортикотрофной линии TPIT; и *FSHB* как специфический маркер для гонадотрофной линии SF1.

Исследования scRNA-seq также помогли лучше понять гетерогенность НЭОГ. Применение мультиомиксных технологий на уровне отдельных клеток, включая scRNA-seq, выявило незначительную, но явную внутриопухолевую геномную гетерогенность, проявляющуюся в CNV [79]. Примечательно, что CNV ожидаются при НЭОГ [90, 91], и недавнее исследование scRNA-seq [4] показало, что в трех линиях НЭОГ наблюдаются события CNV, при этом ацидофильная линия PIT1 имеет наибольшее количество таких изменений. В другом исследовании, данные scRNA указывают на внутреннюю гетерогенность опухоли, поскольку, в сравнении с нормальными тканями, профили экспрессии генов в опухолевых клетках значительно различались между собой [3]. При сравнении опухолевых и нормальных клеток было обнаружено, что в нормальных тканях многие клетки одновременно экспрессируют *GHI* и *PRL*, тогда как большинство опухолевых клеток экспрессирует только один из этих генов. Однако опухолевые клетки, экспрессирующие оба гена, делают это на более высоком уровне по сравнению с нормальной тканью. Таким образом, было предложено, что гетерогенность НЭОГ может быть обусловлена гормон-секретирующими генами и связанными с ними регуляторными генами. В целом, данное исследование

подчеркнуло внутреннюю клеточную гетерогенность опухолевых клеток и показало, что экспрессия гормон-секретирующих генов определяет значительные вариации транскриптомной гетерогенности опухолевых клеток ацидофильной линии PIT1.

#### **1.4. Изучение признаков злокачественности нейроэндокринных опухолей гипофиза с использованием scRNA-seq**

##### ***1.4.1. Инвазивные свойства нейроэндокринных опухолей гипофиза***

Около 35% НЭОГ являются инвазивными [92]. Инвазивный рост может происходить в хиазмально-селлярную область, кавернозные синусы, клиновидную пазуху, что обнаруживается во время хирургического вмешательства, при радиологической классификации с использованием МРТ [93, 94]. Инвазивное поведение этих опухолей может ограничить объем резекции и результаты операции, особенно при гормон-секретирующих опухолях гипофиза [95]. Было установлено, что инфильтрация макрофагами CD86<sup>+</sup>/CD163<sup>+</sup> связана с инвазивным поведением гонадотропных опухолей [96]. Также было показано, что инвазия в кавернозный синус зависит от транскрипционного фактора, экспрессирующегося в опухоли, при этом опухоли с экспрессией PIT-1 имеют более высокий уровень инвазивности [95]. Множество исследований проводится для понимания патологии инвазивных опухолей и критических различий между ними и неинвазивными опухолями, и было выявлено восемь ключевых генов (*BMP6*, *CIB2*, *FABP5*, *HOMER2*, *MAML3*, *NIN*, *PRKG2* и *SIDT2*), которые могут играть важную роль в инвазивном прогрессировании НАГ [78].

С помощью технологии scRNA-seq проводилось более глубокое изучение неактивных соматотрофных аденом (НСА) путем их сравнения с гормон-секретирующими аналогами – кортикотропными аденомами (КА) [82]. Анализ данных scRNA-seq показал, что, по сравнению с КА, в НСА снижена экспрессия ключевых протеаз и их регуляторов, участвующих в обработке прогормонов, таких как те, которые включены в обработку проопиомеланокортина (POMC). С

использованием анализа клеточных компонентов Gene Ontology через ENRICHR было установлено, что КА характеризуются высокой экспрессией генов мембранных везикул (генов, участвующих в организации секреторных везикул), малых ГТФаз (белки суперсемейства малых гуанозинтрифосфат гидролаз) и пептидов, а также генов, связанных с плотными контактами и актиноопосредованной подвижностью. В отличие от этого, НСА продемонстрировали несколько признаков эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и преимущественно экспрессировали гены раннего эмбрионального органогенеза гипофиза и регуляторов клеточного цикла, что указывает на степень дедифференциации этих опухолей [51].

#### ***1.4.2. Апоптотические свойства нейроэндокринных опухолей гипофиза***

Одной из характерных черт всех типов рака является нарушение механизма клеточной смерти – апоптоза. Раковые клетки подавляют процессы апоптоза, что увеличивает вероятность накопления мутаций, ангиогенеза, прогрессии и инвазии опухоли, а также нарушает дифференцировку клеток [97, 98]. Поэтому апоптоз рассматривается как перспективная мишень для противораковой терапии, и проводятся исследования, направленные на понимание регуляторов внутренних и внешних путей апоптоза для создания универсальной терапии против рака. Поскольку НЭОГ также не являются исключением, многие исследования изучают возможные регуляторы и пути апоптоза в этих опухолях [99–101]. Однако, учитывая высокую гетерогенность структуры данных опухолей, существует реальная необходимость в таких исследованиях на уровне разрешения отдельных клеток.

С помощью метода scRNA-seq изучались апоптотические свойства опухолей гипофиза при болезни Иценко – Кушинга [102]. Несмотря на сверхэкспрессию гена *PAMIP1*, который кодирует белок Noxa, участвующий в регуляции апоптоза клеток, был обнаружен механизм нарушения процесса апоптоза, связанный с протеасомозависимой деградацией Noxa. Этот вывод был подтвержден с помощью ингибирования протеасомы, что стабилизировало функцию Noxa, указывая на ее

потенциальную роль в качестве терапевтической мишени. Действительно, этот посттрансляционный механизм антиапоптотического ответа также описан в других опухолевых тканях [103]. Анализ данных scRNA-seq показал, что гены *PBK* и *GGH* также являются ингибиторами апоптоза [3].

#### ***1.4.3. Онкомаркеры нейроэндокринных опухолей гипофиза***

Выявлены различные маркеры для высоко- и низкодифференцированных клеток, а затем эти маркеры были подтверждены с помощью ИГХ-анализа препаратов гипофиза в независимом когортном исследовании с участием 800 пациентов [80]. Анализ данных показал, что хорошо дифференцированные НЭОГ характеризуются выраженной активацией путей биосинтеза и секреции гормонов. Интересно, что в группах с низкой дифференцировкой, как в ацидофильной линии PIT1, так и кортикотрофной линии TRIT, наблюдались более высокие показатели рецидивов, в то время как в гонадотрофной линии SF1 более высокий уровень рецидивов отмечался у групп с хорошей дифференцировкой. Эти выводы о классификации по степени дифференцировки могут быть применены для более точного прогноза рецидивов. Также стоит отметить, что индекс Ki67 опухоли зависит от статуса дифференцировки опухоли, что может объяснить противоречивые результаты использования маркера Ki67 в различных исследованиях НЭОГ [104–107]. Таким образом, данный материал предлагает систему оценки риска рецидива на основе молекулярных данных о маркерах, связанных с дифференциацией.

Таким образом, использование scRNA-seq для изучения нейроэндокринных опухолей является перспективным методом изучения для оценки гетерогенности опухолевых тканей и внутриклеточной регуляции, лежащей в основе возникновения, прогрессирования и инвазии нейроэндокринных опухолей на клеточном уровне. Недавно опубликованные исследования аденом гипофиза с использованием scRNA-seq имеют большое значение для понимания как нормальных, так и патологических состояний гипофиза, однако не все типы НЭОГ были представлены в них. Необходимы дополнительные сравнительные испытания

активных и неактивных НЭОГ. Например, НСА ранее не описывалась с использованием scRNA-seq. Этот тип аденом известен как более инвазивный и встречающийся чаще и на более ранних стадиях, чем гормон-секретирующие соматотропные аденомы [108], что делает важным изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе этих особенностей, с помощью таких методов, как scRNA-seq. Кроме того, сравнение НСА с ее функциональным соматотропным аналогом позволит улучшить понимание патологии и механизмов регуляции, которые определяют, является ли неоплазия гипофиза гормон-секретирующей или несекретирующей, что потенциально может открыть новые терапевтические мишени. В конечном счете, знания, полученные в результате дополнительных исследований scRNA-seq, окажут существенное влияние на оценку прогноза опухоли, диагностику и протоколы лечения НЭОГ.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. 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» Минздрава России (директор – член-корр. РАН, профессор Н. Г. Мокрышева).

У всех пациентов диагноз был подтвержден на основании клинико-инструментального, гистологического и иммуногистохимического исследования. Каждый участник исследования дал письменное информированное согласие. 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» 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» Минздрава России.

### 2.2. Реагенты

#### 2.2.1. Буферы

Буфер Хэнкса HBSS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США), цитратно-солевой буфер 3xSSC (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США), фосфатно-солевой буфер Дульбекко 1xDPBS без ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (Capricorn Scientific, Германия), буфер для разведения антител (Abcam, США), буфер для окрашивания PI/RNase (BD Biosciences, США).

### **2.2.2. Ферменты и ингибиторы Рибонуклеаз (РНКа́з)**

Фермент D из набора для диссоциации тканей (Miltenyi Biotec, Германия), ингибитор РНКазы RiboLock (Thermo Fisher Scientific, США).

### **2.2.3. Дополнительные реагенты для приготовления буферов**

Дитиотреитол (DTT) (Wuhan Servicebio Technology, Китай), бычий сывороточный альбумин (BSA) (Thermo Fisher Scientific, США), N-ацетилцистеин (NAC) (Sigma-Aldrich, США), HEPES (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США), глюкоза (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США), сахароза (MilliporeSigma, США), DMSO (Thermo Fisher Scientific, США), фетальная бычья сыворотка (FBS) (HyClone, Thermo Fisher Scientific, США).

### **2.2.4. Другие реагенты и наборы**

Метанол (Sigma-Aldrich, США), пропиций йодид (PI) (BD Biosciences, США), 5,6-карбоксифлуоресцеин диацетат сукцинимидил эфир (CFSE) (BD Biosciences, США), раствор для хранения тканей Tissue Storage Solution (Miltenyi Biotec, Германия), раствор для лизиса эритроцитов (Miltenyi Biotec, Германия), набор для удаления мертвых клеток Dead Cell Removal Kit (Miltenyi Biotec, Германия), набор для диссоциации тканей Multi Tissue Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Германия), набор для получения кДНК и подготовки кДНК – библиотек Chromium Next GEM Single Cell 3'GEM, Library & Gel Bead Kit v3.1 (10x Genomics, США), набор для выделения РНК AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, США), набор для количественной оценки ДНК и РНК Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США), набор DNA HS (1–6000 bp) Kit (Agilent Technologies, США), набор для секвенирования S4 Reagent Kit v1.5 (Illumina, США), антитела Anti-CYP11B1 (ab197908, Abcam, США), моноклональные антитела к рецептору TSH (4C1) (MA5-16519, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США), вторичные антитела AlexaFluor 594 (ab150080, Abcam, США) или 235 AlexaFluor 594 (ab150116, Abcam, США), краситель Hoechst 33342 (BD Pharmingen, США), формалин (Leica Biosystems, США), гематоксилин (Leica Biosystems, США), эозин (Leica Biosystems, США).



## **2.3. Оборудование**

### ***2.3.1. Оборудование для подготовки образцов***

Гомогенизатор gentleMACS Dissociator с пробирками gentleMACS C (Miltenyi Biotec, Германия), микротом (Thermo Fisher HM 355 S, Thermo Fisher Scientific, США), счетчик клеток Countess 3 (Thermo Fisher Scientific, США), сканирующий конфокальный микроскоп Olympus FV3000 (Olympus corporation, Япония), проточный цитометр NovoCyte 2060R (Agilent Technologies, США), фрагментный анализатор Agilent 5200 (Agilent Technologies, США).

### ***2.3.2. Оборудование для гистологических исследований***

Вакуумный гистологический процессор Leica ASP6025 (Leica Biosystems, США), система для сканирования гистологических стекол Leica Aperio AT2 (Leica Biosystems, США).

### ***2.3.3. Оборудование для секвенирования***

Станция для работы с единичными клетками и молекулами 10x Chromium Controller (10x Genomics, США), платформа для секвенирования Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, США).

## **2.4. Методы**

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

Свежезамороженные образцы тканей ФХЦ (200–250 мг) и НЭГО (5–10 мг) тщательно измельчали на льду. Затем, измельченную ткань немедленно помещали в раствор ACME, состоящий из 15%-го метанола, 0,1 М ледяной уксусной кислоты, 0,1 М глицерина, 0,1 М N-ацетилцистеина (NAC) и воды, свободной от РНКаз, до общего объема 10 мл. Образцы диссоциировали при комнатной температуре в течение одного часа на шейкере, при 35 об/мин, с использованием вертикального режима вращения платформы. Во время инкубации смесь пипетировали 2–4 раза

для обеспечения тщательного перемешивания содержимого. После инкубации образцы центрифугировали при 1000g в течение 5 минут при 4 °С для удаления раствора АСМЕ, после чего хранили на льду для предотвращения деградации РНК. Супернатант осторожно удаляли, и к осадку добавляли от 2 до 4 мл холодного буфера 3хSSC\*, состоящего из 3хSSC, 40 мМ DTT, 1% BSA и воды, свободной от РНКаз, а также 0,5 ЕД/мкл ингибитора РНКазы, затем раствор ресуспендировали. Гомогенат последовательно фильтровали через предварительно смоченные (500 мкл 3хSSC\*) фильтры 70 мкм и 40 мкм. После фильтрации образцы центрифугировали при 1000g в течение 7 минут при 4 °С, удаляли супернатант и ресуспендировали осадок в 1–2 мл холодного 3хSSC\* буфера.

#### ***2.4.2. Получение суспензий единичных клеток методом ферментативной диссоциации***

Образцы свежей опухолевой ткани ФХЦ (200–250 мг) и НЭОГ (5–10 мг) промывали в солевом буфере Хэнкса, тщательно измельчали на льду и помещали в буфер для диссоциации при 37 °С, пипетируя содержимое каждые 5 минут. Образцы диссоциировали с использованием 25–30 мкл фермента D из набора для диссоциации тканей (Multi Tissue Dissociation Kit [Miltenyi Biotec, Германия]) в 870 мМ HBSS, 10% FBS и 20 мМ HEPES в течение 20–30 минут. Образцы НЭОГ диссоциировали с 8–10 мкл фермента D при тех же условиях в течение 7–15 минут.

Полученный гомогенат фильтровали через предварительно смоченный клеточный фильтр (70 мкм), с добавлением 3–5 мл промывочного буфера, который содержал 10% FBS, 20 мМ HEPES и 6 мМ глюкозы. После, центрифугировали при 300g течение 5 минут при 4 °С. Для образцов с высоким содержанием крови проводился лизис эритроцитов. Образцы, содержащие клеточный дебрис, были очищены с применением набора для удаления мертвых клеток. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью окрашивания трипановым синим и считали на счетчике клеток Countess 3. Полученные клетки ресуспендировали в буфере для промывки объемом 100–400 мкл, в зависимости от размера осадка.

### ***2.4.3. Метод ядерной экстракции из свежесзамороженных образцов***

Свежесзамороженные образцы опухолевых тканей НЭОГ и ФХЦ тщательно измельчали на льду и помещали в пробирку gentleMACS С с добавлением 2 мл холодного гипотонического лизирующего буфера (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl и 1% NP40).

Пробирки gentleMACS С помещали в гомогенизатор gentleMACS Dissociator, запускали программу h\_mito\_01 и гомогенизировали образцы.

После инкубировали на льду в течение 10 минут. Гомогенизацию осуществляли дважды.

К гомогенату добавляли 2 мл изотонического буфера (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl и 500 mM сахарозы), перемешивали пипетированием, фильтровали через предварительно смоченный клеточный фильтр (70 мкм) с добавлением изотонического буфера для промывки (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl и 250 mM сахарозы) и центрифугировали при 1000g в течение 5 минут при 4 °C.

Супернатант отбирали, осадок ресуспендировали в 1 мл 1хDPBS с 1% BSA и фильтровали через предварительно смоченный клеточный фильтр (30 мкм).

После осадок ресуспендировали в том же 1хDPBS с 1% BSA в объеме 100–400 мкл, в зависимости от размера осадка.

### ***2.4.4. 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 вортексировании для предотвращения слипания клеток. Фиксированные клетки хранили при минус 80 °C.

Для криоконсервации методом ACME HS к 900 мкл клеточной суспензии в буфере 3хSSC\* дабавляли 10% DMSO и криоконсервировали. Криоконсервированные клетки хранили при минус 80 °C.

### 2.4.5. 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 (минус 80 °С) из криоконсервированных и фиксированных в метаноле клеток, полученных с применением методов ACME HS и ферментативной диссоциации, соответственно.

### 2.4.6. Иммуногистохимическое окрашивание

Образцы опухолевой ткани фиксировали в 10%-м 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 (Таблица 1). Все гистологические стекла сканировали с помощью системы Leica Aperio AT2 с 20-кратным увеличением для дальнейшего анализа.

**Таблица 1** – Антитела, использованные для ИГХ окрашивания образцов НЭОГ

Название	Характеристика	Фирма производителя
Анти-POU1F1	кроличьи/поликлональные	Merck
Анти-TBX19	кроличьи/поликлональные	Merck
Анти-SF-1	мышинные/моноклональные	Dako
Анти-СТГ	кроличьи/поликлональные	Dako
Анти-ПРЛ	кроличьи/поликлональные	Dako
Анти-АКТГ	мышинные/моноклональные	Dako
Анти-ТТГ	мышинные/моноклональные	Dako
Анти-ЛГ	мышинные/моноклональные	Dako
Анти-ФСГ	мышинные/моноклональные	Dako

#### ***2.4.7. Проточная цитометрия***

Клетки из образцов опухолей НЭОГ и ФХЦ, полученные методами АСМЕ HS и ферментативной диссоциации, помещали в раствор 1хDPBS с добавлением 0,1% FBS до конечной концентрации 1 млн клеток на мл.

Затем к клеткам добавляли 2 мкМ красителя сукцинимидилового эфира (5,6)-карбоксифлуоресцеина диацетата CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) и инкубировали в течение 5 минут при температуре 37 °С.

После этого клетки промывали дважды 10-кратными объемами холодного раствора и окрашивали PI (10 мкг/мл) в буфере для окрашивания в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте.

Проточную цитометрию проводили на системе NovoCyte 2060R, оснащенную двумя лазерами, включая лазер 488 нм для возбуждения CFSE и PI, и стандартным набором детекторов для зеленой флуоресценции CFSE и красной флуоресценции PI. Для коррекции спектрального перекрестного возбуждения использовали программную компенсацию.

Гидравлическая система и оптика были откалиброваны с помощью контрольных частиц NovoCyte QC.

Порог был установлен на FSC-H.

Образцы анализировали на минимальной скорости потока. Анализировали не менее 10 000 событий. Деконволюцию гистограмм ДНК проводили с помощью программного обеспечения NovoExpress.

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

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

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

Для каждого образца было взято примерно 10 000 клеток или ядер (~2000 клеток или ядер на 1 мкл, согласно расчетам, выполненным с использованием калькулятора объема клеточной суспензии от 10X Genomics) в холодном буфере 3хSSC. РНК этих клеток были смешаны с мастер-миксом для ОТ-ПЦР вместе с 3'телевыми частицами, содержащими молекулярный и клеточный баркоды, инкапсулированы в капле масла и немедленно загружены в чип Chromium Chip G.

Библиотеки кДНК и экспрессии генов были затем получены в соответствии с инструкциями производителя (10x Genomics, США). Для количественной оценки библиотек кДНК и экспрессии генов использовали набор Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Количественный и качественный анализ библиотек проводили с помощью Agilent 5,200 Fragment Analyzer (Agilent Technologies, США) с использованием набора DNA HS (1–6,000 bp) Kit (Agilent Technologies, США).

Готовые библиотеки были мультиплексированы и секвенированы на платформе Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, США) с использованием набора реагентов S4 Reagent Kit v1.5 (200 циклов) (Illumina, США) со средним покрытием не менее 20000 ридов на клетку.

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

Данные секвенирования были проанализированы с помощью 10X Cell Ranger (v6.1.1). Стандартные измерения контроля качества Cell Ranger были использованы для дальнейшего сравнительного анализа с помощью теста Уилкоксона. Матрицы экспрессии для отфильтрованных клеток были обработаны в Seurat [109] (v4.9.9 и v5.0.0) путем проведения стандартного анализа, включающего масштабирование и нормализацию.

Фильтрация клеток на основе зависимости соотношений детектируемых генов и транскриптов была выполнена с помощью программного пакета *pagoda2* (v1.0.11). Для *pagoda2* были использованы гиперпараметры минимального размера клетки 1000 и максимального размера клетки 50000. Показатели Р-значения были установлены, как минимум между 0,001 и  $1/(\text{количество столбцов в матрице подсчета})$ . Дублиеты и уровень амбиентной РНК были определены с помощью *scrublet* [110] (v0.2.3), *SoupX* [111] (v1.6.2) и *decontX* [112] (v3.18) соответственно, с применением настроек по умолчанию. Средние значения для дублиетов и значений окружающей РНК на образец сравнивались между методами подготовки образцов (АСМЕ HS, ферментативная диссоциация, ядерная экстракция). Основные типы клеток были идентифицированы с помощью функции распространения меток с использованием *Conos* (v1.5.0) и эталонных наборов данных [113–117]. Интеграция образцов была проведена путем применения *RunHarmony* к предварительно обработанным объектам *Seurat* [118].

Анализ скорости изменения экспрессии РНК проводился с помощью *Velocity* (v0.17) на подмножестве из 1000 клеток на образец и визуализировался с помощью *Velocity.R* [119] (v0.6). Кроме того, мы использовали *scVelo* (v0.3.2) [120], чтобы оценить достоверности полученной скорости экспрессии РНК и псевдовремени. Анализ дифференциальной экспрессии и определение фаз клеточного цикла были выполнены с помощью *Seurat* (v5.0.0). Статистическая значимость для фаз клеточного цикла рассчитывалась с помощью теста хи-квадрат.

Тест функционального обогащения был проведен для дифференциально экспрессированных генов с использованием *clusterProfiler* [121] и *wiki pathways* [122] в качестве референсных баз данных. Анализ соматических вариантов числа копий с учетом гаплотипов из транскриптомов отдельных клеток был выполнен с использованием пакета *Numbat* (в. 1.4.0) путем интеграции сигналов от экспрессии генов, аллельного соотношения и информации о гаплотипах, полученной из популяций, для точного определения аллель-специфичных CNV в отдельных клетках и восстановления их наследственной связи.

#### 2.4.11. Анализ маркерных генов клеточной гибели и стресса

Использовалась функция `PercentageFeatureSet` с параметрами по умолчанию из пакета `Seurat` для оценки влияния различных методов – ACME HS, ферментативной диссоциации и ядерной экстракции – на клеточный стресс, некроз или апоптоз клеток.

Данная функция подсчитывает долю всех транскриптов, соответствующих определенной группе генов.

В качестве маркеров апоптоза мы выбрали гены *CASP3*, *BAX*, *BAD*, *BID*, *APAF1*, *TP53*, *FAS*, *TNFRSF10B*, *CYCS*, *BCL2* и *AIFM1* [123]. Для идентификации некроза мы выбрали гены *HMGB1* [124], *ATP5F1A*, *CALR*, *ARHGAP45*, *S100A8*, *S100A9*, *NAMPT*, *ANXA1*, *KRT18*, *TNF* и *AGER* [125, 126].

Мы приняли во внимание различные виды клеточного стресса, включая окислительный стресс, клеточное старение, повреждение ДНК, тепловой шок и разворачивание белковых молекул (ответ на разворачивание белка).

Сигнатура окислительного стресса была составлена с использованием генов *NFE2L2*, *KEAP1*, *SOD1*, *CAT*, *HMOX1*, *GCLC*, *GCLM*, *NQO1* и *PRDX1* [125, 126].

Маркеры клеточного старения включали *CDKN1A*, *CDKN2A*, *IGFBP3*, *GADD45A*, *CCND1*, *CDKN2B*, *IL1A*, *IL1B*, *IL6*, *IL10*, *HMGA1*, *HMGB2* и *UBB* [125, 126]. Сигнатуры повреждения ДНК включали *TP53*, *BRCA1*, *CHEK2*, *ATM*, *RAD51*, *RPA1*, *MDM2*, *ATR* и *XRCC5* [125, 126].

Для сигнатуры теплового шока мы рассмотрели гены семейства HSP: *HSPB*, *HSPG2*, *HSPB11*, *HSPA6*, *HSPD1*, *HSPE1*, *HSPBAP1*, *HSPA4L*, *HSPB3*, *HSPA4*, *HSPA9*, *HSPA1L*, *HSPA1A*, *HSPA1B*, *HSP90AB1*, *HSPB1*, *HSPA5*, *HSPA14*, *HSPA14.1*, *HSPA12A*, *HSPB2*, *HSPA8*, *HSP90B1*, *HSPB8*, *HSPH1*, *HSPA2*, *HSP90AA1*, *HSPB9*, *HSPB6*, *HSPBP1*, *HSPA12B* и *HSPA13* [127, 128].

Сигнатура ответа на неправильный фолдинг включала гены *ATF4*, *ATF6*, *XBP1*, *HSPA5*, *DDIT3*, *HERPUD1*, *DNAJC3*, *ERN1*, *ERN2* и *PDIA6* [125, 126]. С помощью парного теста Уилкоксона мы рассчитали статистически значимые различия в показателях сигнатур между различными методами диссоциации.



### ***2.4.1. 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 –  $p > 0,05$ .

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1. 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. С целью преодоления данных ограничений нами был разработан и оптимизирован протокол, позволяющий выделять из замороженной ткани цельные клетки, а не только их ядра.

Наш метод оптимизирован для эндокринных тканей надпочечника и гипофиза, однако может применяться и для других тканей организма. Мы оптимизировали время и условия диссоциации, дополнили состав буфера восстанавливающим агентом – N-ацетил-цистеином, а также ввели дополнительные этапы фильтрации в цитратно-солевом буфере 3xSSC\*, содержащем дитиотреитол (DTT) и бычий сывороточный альбумин (BSA).

Для оценки эффективности оптимизированного протокола уксусно-метанольного метода диссоциации (ACME HS) были изучены два типа нейроэндокринных тканей – НЭОГ и ФХЦ. Нами было проведено сравнительное исследование различных методов диссоциации, таких как ACME HS, стандартная методика ферментативной диссоциации и ядерная экстракция.

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

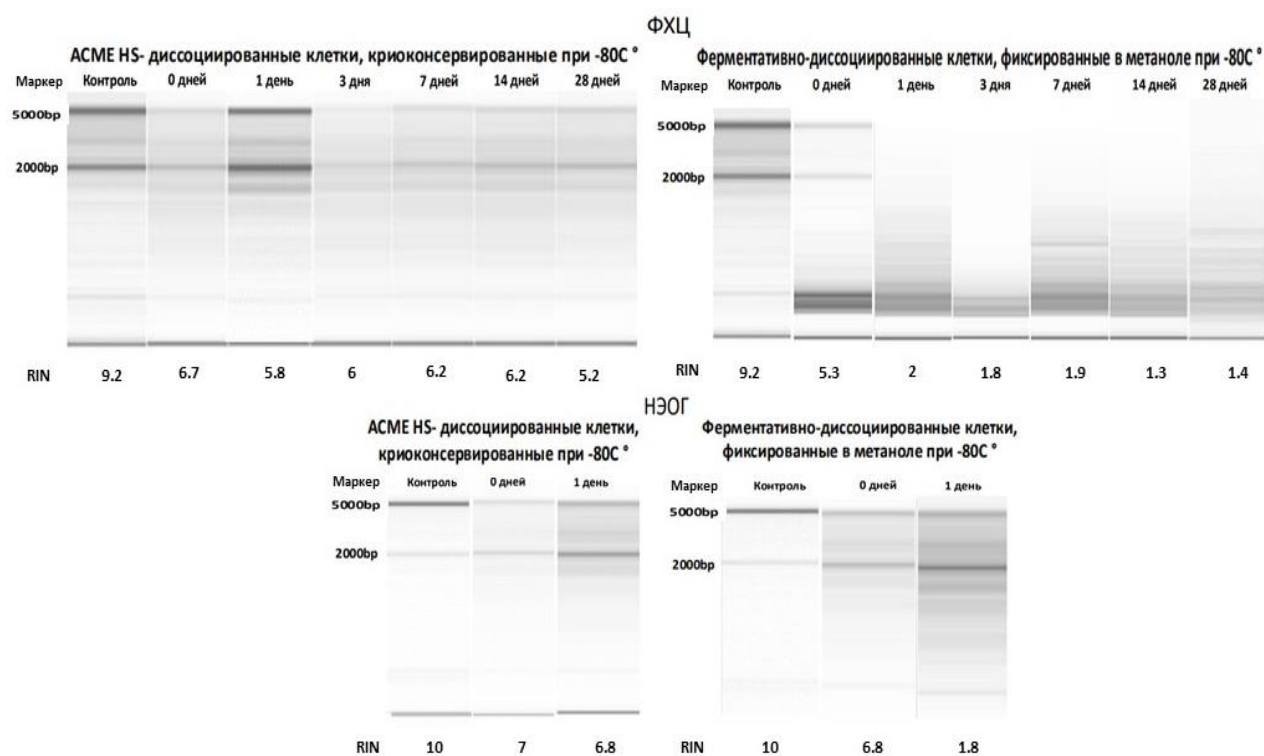
Одним из ключевых этапов, необходимых для проведения scRNA-seq, является оценка качества РНК единичных клеток. Для этого применяется метод, основанный на определении содержания рибосомальных РНК (pРНК), что позволяет достоверно оценить качество образцов. С помощью фрагментного анализатора Agilent 5200, работающего по принципу капиллярного электрофореза, нами был определен RIN, который представляет собой соотношение 28S к 18S

pРНК. RIN лежит в пределах от 10 (неповрежденная РНК) до 1 (абсолютно деградированная РНК). Полагается, что РНК, имеющая  $RIN \geq 5$ , соответствует РНК высокого качества и пригодна для дальнейшей работы.

Для оценки RIN единичных клеток был взят послеоперационный опухолевый материал НЭОГ и ФХЦ. Каждая опухолевая ткань НЭОГ и ФХЦ была разделена на два образца, один из которых использовался для получения единичных клеток методом ферментативной диссоциации, а второй образец был предварительно заморожен при минус 80 °С для получения единичных клеток методом ACME HS. Полученные клеточные суспензии ферментативными ACME HS методами разделяли на 6 аликвот для ФХЦ (0, 1, 3, 7, 14 и 28 дней) и на 2 аликвоты для образцов НЭОГ (0 и 1 дней). Количество аликвот клеточных суспензии для образцов НЭОГ было сокращено до 2 ввиду небольшого размера ткани гипофиза и меньшего количества клеток гипофиза.

Результаты анализа тотальной РНК, выделенной из свежеприготовленной суспензии единичных клеток (0-й день), показали, что значения RIN для клеток, полученных методами ACME HS и ферментативной диссоциацией, были сопоставимы (Рисунок 5). Значения RIN для клеток, полученных методами ACME HS и ферментативной диссоциации составляли 7 и 6,8 для НЭОГ, и 6,7 и 5,3 для ФХЦ, соответственно (Рисунок 5 и Таблица 2).

Затем нами была оценена возможность криоконсервации и хранения клеточных суспензий, полученных методом ACME HS. Мы измерили RIN после 1, 3, 7, 14 и 28 дней криоконсервации (при минус 80 °С) клеточных суспензий, полученных из ФХЦ, и после 1 дня для клеточных суспензий из НЭОГ. Тотальная РНК была выделена из одной аликвоты клеток НЭОГ (1 день) и пяти аликвот (1, 3, 7, 14 и 28 дней) клеток ФХЦ для каждого из методов. RIN клеток, полученных методом ACME HS, демонстрировал высокие значения для всех временных интервалов (1, 3, 7, 14 и 28 дней). Средние значения RIN клеток ФХЦ, полученных методом ACME HS составили  $\approx 6,2$  по сравнению с  $\approx 2,3$  при ферментативной диссоциации.



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

**Рисунок 5** – Электрофореграммы фрагментов РНК единичных клеток, полученных с помощью ферментативной диссоциации и метода ACME HS

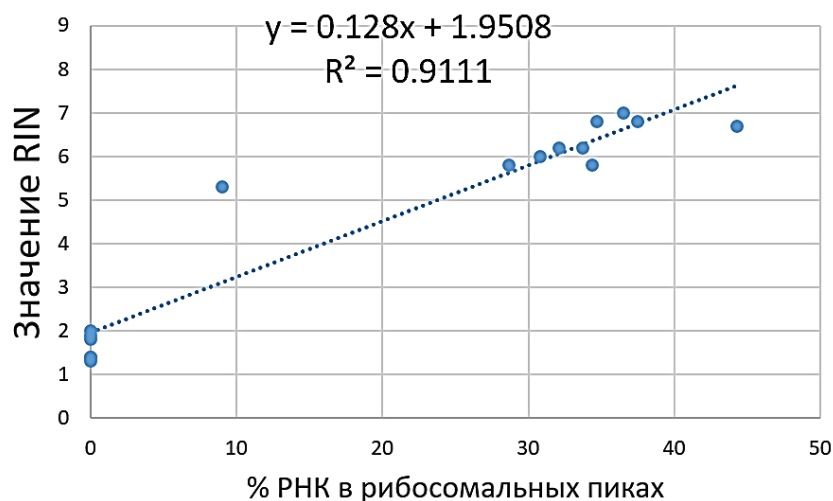
**Таблица 2** – Значения RIN для ферментативно-диссоциированных и фиксированных в метаноле клеток, полученных из ФХЦ и НЭОГ

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

## Продолжение таблицы 2

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

Для НЭОГ данные значения составляли  $\approx 6,8$  и  $\approx 1,4$ , соответственно. Такие показатели RIN указывают на то, что клетки, полученные методом диссоциации ACME HS, пригодны для последующего анализа, включая scRNA-seq. Кроме того, нами был проведен корреляционный анализ, который показал взаимосвязь между значениями RIN и рРНК (Рисунок 6). Квадрат коэффициента корреляции  $R^2$ , который называется коэффициентом детерминации, имел значение равное 0,9111, такое значение показывает высокий уровень корреляции между значениями RIN и % рРНК.



**Рисунок 6** – Корреляционный анализ значений RIN и % рРНК. На диаграмме рассеяния (график корреляции) изображена взаимосвязь двух переменных X и Y, X – % рРНК от всей тотальной РНК, Y – значения RIN для каждой клеточной суспензии.

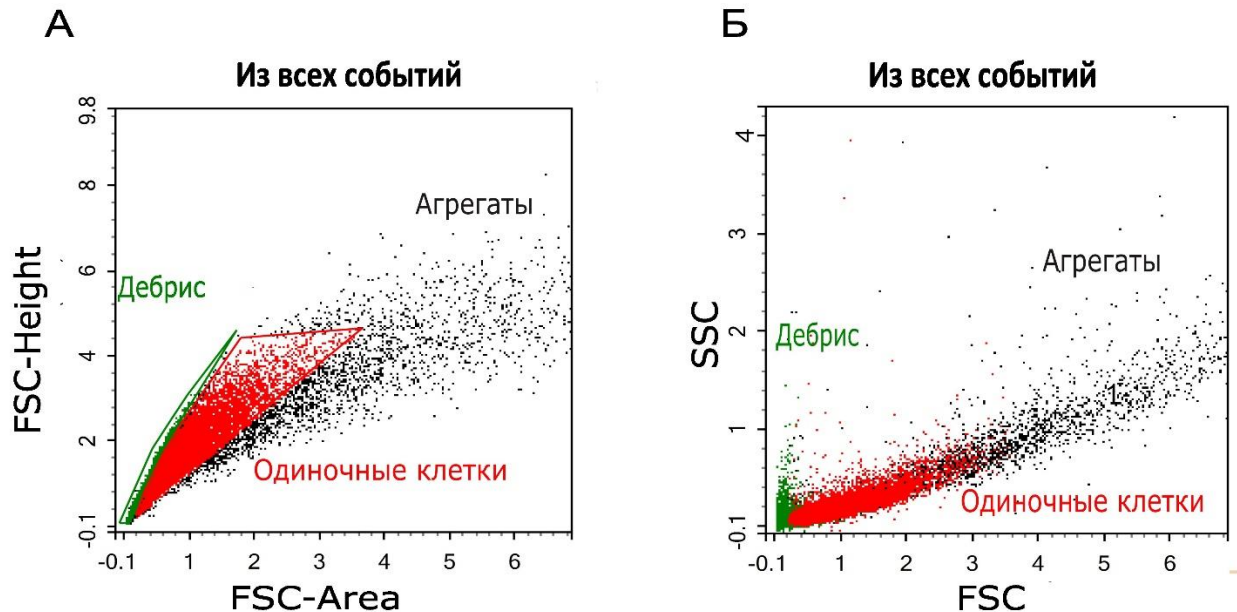
### 3.2.2. Оценка качества клеточных суспензий, полученных ACME HS диссоциацией с помощью проточной цитометрии

Для дополнительной оценки качества единичных клеток образцов, полученных методами ACME HS и ферментативной диссоциации был использован метод проточной цитометрии. Нами оценено количество дебриса, агрегатов и

одинокных клеток в образцах, полученных при помощи двух протоколов диссоциации. Метод ACME HS оценивали по трем независимым повторам для каждого типа опухоли – НЭОГ и ФХЦ. Для оценки количества дебриса, одинокных клеток и агрегатов была использована точечная диаграмма прямой области рассеяния (дот плот) FSC-A/FSC-H, учитывающая значение импульса сигнала по площади (A) и высоте (H) (Рисунок 7 А1). Гейтирование образцов на дот плот FSC-A/FSC-H оказалось проще, чем на FSC/SSC плот (Рисунок 7 А2), на котором клетки обычно распределяются по прямому (FSC) и боковому (SSC) рассеянию света. Причина заключалась в том, что граница между субклеточным дебрисом (фрагментами клеток) и одинокными клетками, а также между одинокными клетками и их агрегатами была плохо различима на FSC/SSC диаграмме (Рисунок 7 А2). Область субклеточного дебриса (обозначена зеленым цветом) охватывала мелкие события с максимальным отношением сигнала прямого рассеяния по высоте (FSC-Height) к сигналу по площади импульса (FSC-Area). Одинокные или синглетные клетки (обозначены красным цветом), как правило, располагающиеся по диагонали на дот плот FSC-Area/FSC-Height, выделяли как события, где значения импульса сигнала прямого рассеяния по высоте (FSC-Height) и площади (FSC-Area) скоррелированы между собой. Агрегаты клеток (выделены черным) имели более высокое значение сигнала прямого рассеяния по площади (FSC-Area) по сравнению с сигналом по высоте (FSC-Height) (Рисунок 7А).

Затем мы применяли стратегию обратного гейтирования (от англ. back gating), которая предполагала анализ гейтов, полученных на дот плот FSC-Area/FSC-Height, на других дот плотях, проверяя их расположение на этих дот плотях, и корректируя на основе этого первоначальные гейты. Для начала мы проанализировали как располагались события дебриса, одинокных клеток и агрегатов на дот плот FSC/SSC (Рисунок 7 Б). Обычно, дебрис должен располагаться в левой нижней области дот плота, а область агрегатов должна лежать и формировать кластер в правой верхней области дот плота FSC/SSC. Мы проверяли локализацию событий, выделенных на дот плот FSC-Area/FSC-Height

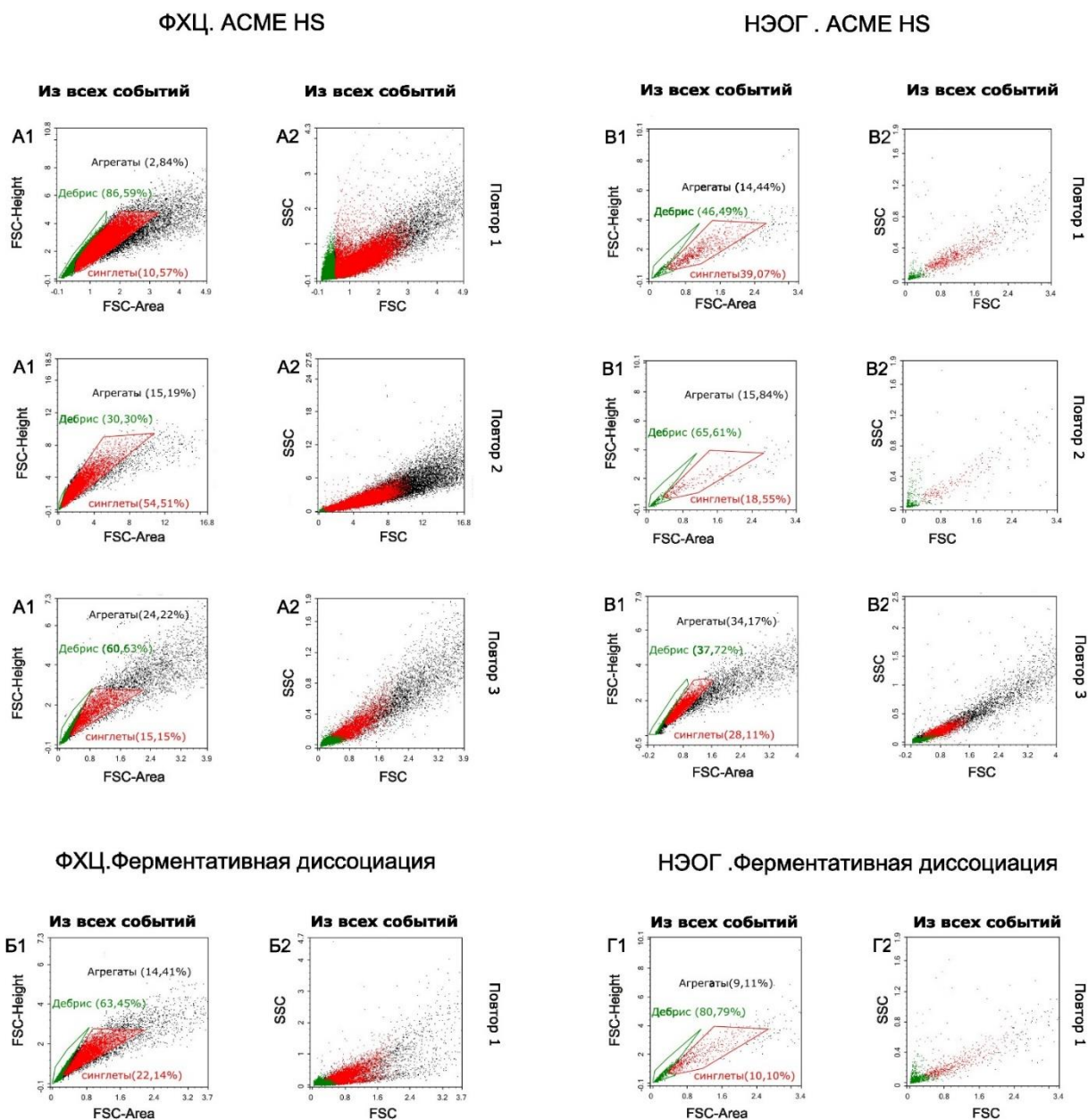
и в случае необходимости, корректировали гейты так, чтобы дебрис и агрегаты занимали правильное положение на дот плотте FSC/SSC.



**Рисунок 7 – А.** Дот плот FSC-высота/FSC-площадь (FSC-Area/FSC-Height) демонстрирующий распределение субклеточного дебриса (фрагментов клеток), одиночных клеток и клеточных агрегатов (зеленым цветом выделены субклеточный дебрис, красным – одиночные клетки, черным – агрегаты), для клеток получены из НЭОГ методом ACME HS. **Б.** Дот плот FSC/SSC, демонстрирующий распределение клеток, их агрегатов и дебриса по боковому рассеянию света

Мы определили гейты дебриса, одиночных клеток и агрегатов на дот плоттах FSC/SSC для всех тканей и для каждого метода диссоциации (Рисунок 8). 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 8).



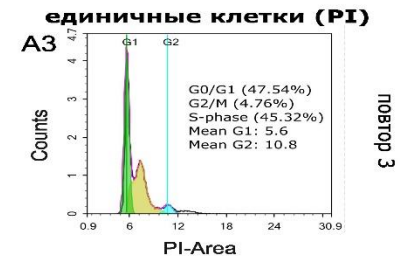
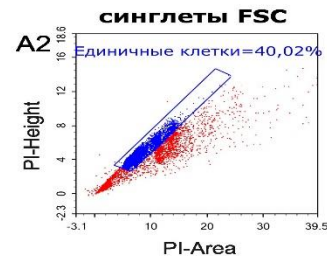
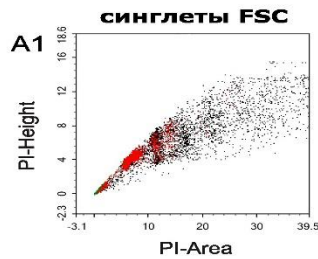
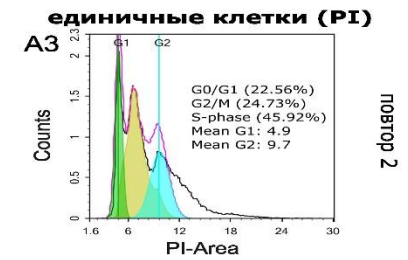
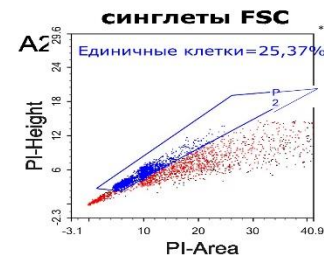
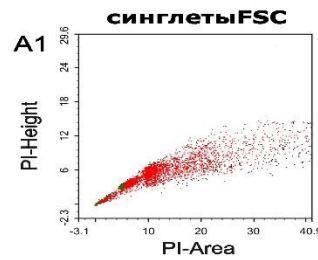
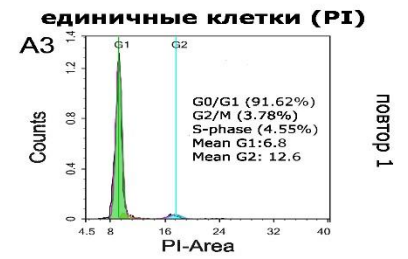
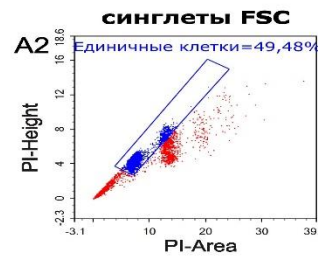
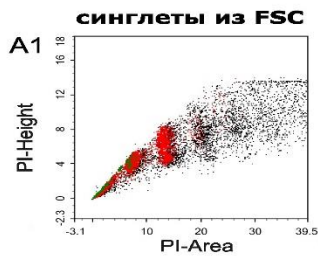
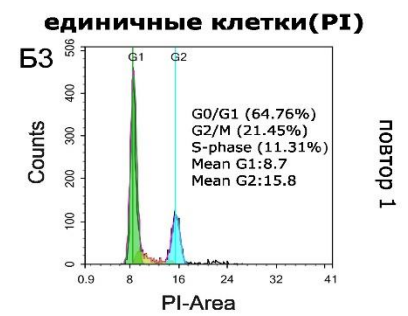
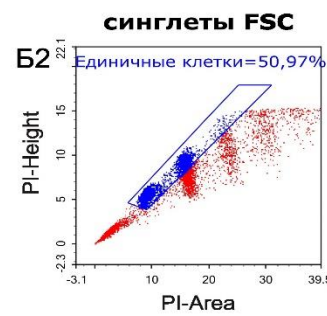
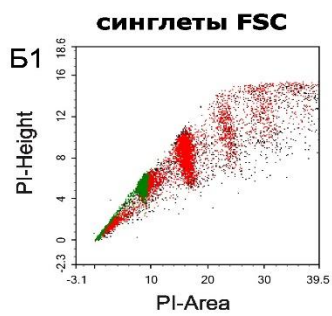
**Рисунок 8** – Данные проточной цитометрии, представленные в виде точечных диаграмм для образцов, приготовленных методами ACME HS и ферментативной диссоциации. А1-А4 и Б1-Б4 – для ФХЦ; В1-В4 и Г1-Г4 – для НЭОГ (зеленый цвет – дебрис, красный – одиночные клетки, черный – агрегаты).

Для того чтобы отличить клетки, содержащие ядра, от безъядерного субклеточного дебриса, мы окрасили образцы PI – ДНК-интеркалирующим красителем. Мы изучили дот плоты высоты/площади сигнала пропидия йодида (PI-высота/PI-площадь – PI-Height/PI-Area) и проверили расположение дебриса, одиночных клеток и агрегатов на дот плоте PI-Height/PI-Area (Рисунок 9 А1, Б1, В1, Г1). Затем мы выделили одиночные клетки из ядродержащих клеток,

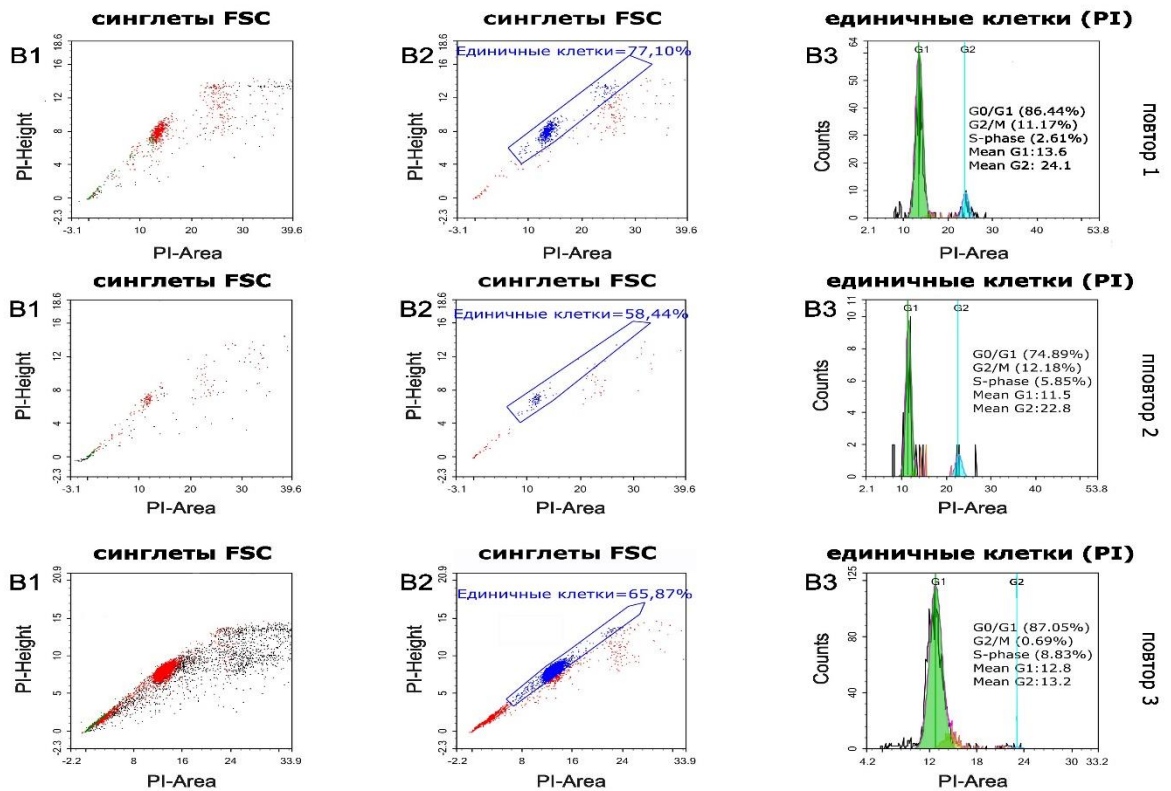


располагающиеся по диагонали на PI-Height/PI-Area (показаны синим цветом на Рисунке 9 А2, Б2, В2, Г2). При работе с такими сложными и нетипичными для проточной цитометрии образцами, иногда было сложно исключить все агрегаты на дот плоте FSC-Area/FSC-Height, поэтому мы дополнительно исключали агрегаты, имеющие более высокие значения сигнала PI по площади на дот плоте PI-Height/PI-Area. Наконец, мы проанализировали гистограммы распределения ДНК из синглетных клеток (Рисунок 9 А3, Б3, В3, Г3) для оценки клеточного цикла.

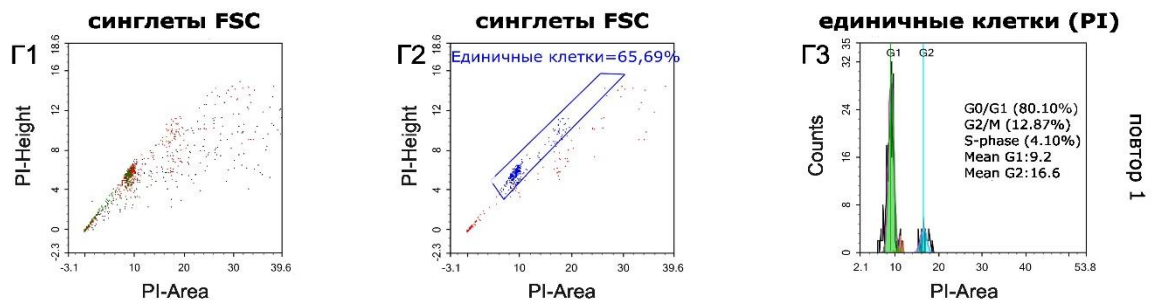
Несмотря на то, что используемые в данной работе протоколы диссоциации отличались от тех, которые часто применяются для стандартного анализа клеточного цикла [129], в большинстве случаев нами были успешно определены фазы клеточного цикла G0/G1, S, и G2/M (G0 – фаза покоя, G1 – пресинтетическая фаза, G2 – постсинтетическая фаза, S – синтетическая фаза, M – митотическая фаза).

**А** ФХЦ. ACME HS**Б** ФХЦ. Ферментативная диссоциация

## В НЭОГ. АСМЕ HS



## Г НЭОГ. Ферментативная диссоциация



**Рисунок 9 – А1–Б1, В1–Г1:** Дот плоты PI-высоты/PI-площади (PI-Height/PI-Area) от всех событий использовались для дополнительной оценки положения дебриса, отдельных клеток и агрегатов. **А2–Б2, В2–Г2:** Дот плоты PI-Height/PI-Area одиночных клеток, использованные для дополнительного выделения одиночных событий (показаны синим цветом) среди ядродержащих клеток и их агрегатов (показаны красным цветом). **А3–Б3, В3–Г3:** Гистограммы ДНК из одиночных событий, показывающие распределение фаз клеточного цикла единичных клеток в образце, со вставкой процентного соотношения фаз клеточного цикла (G0/G1, S, G2/M) и средней интенсивности флуоресценции для фаз G0/G1 и G2/M. Метод АСМЕ HS проводился в 3 репликах для каждой ткани

Фазы клеточного цикла были определены по показателям средней интенсивности флуоресценции (MFI) на клетку в гистограммах распределения ДНК: содержание ДНК в фазе G2/M, как и ожидалось, было в два раза больше, чем в G0/G1, как показано на Рисунке 9 А3, Б3, В3, Г3.

Мы обнаружили, что более 60% проанализированных одиночных клеток находились в фазе клеточного цикла G0/G1, в отличие от клеток G2/M и S-фазах цикла, количество которых было наименьшим, во всех типах опухолей.

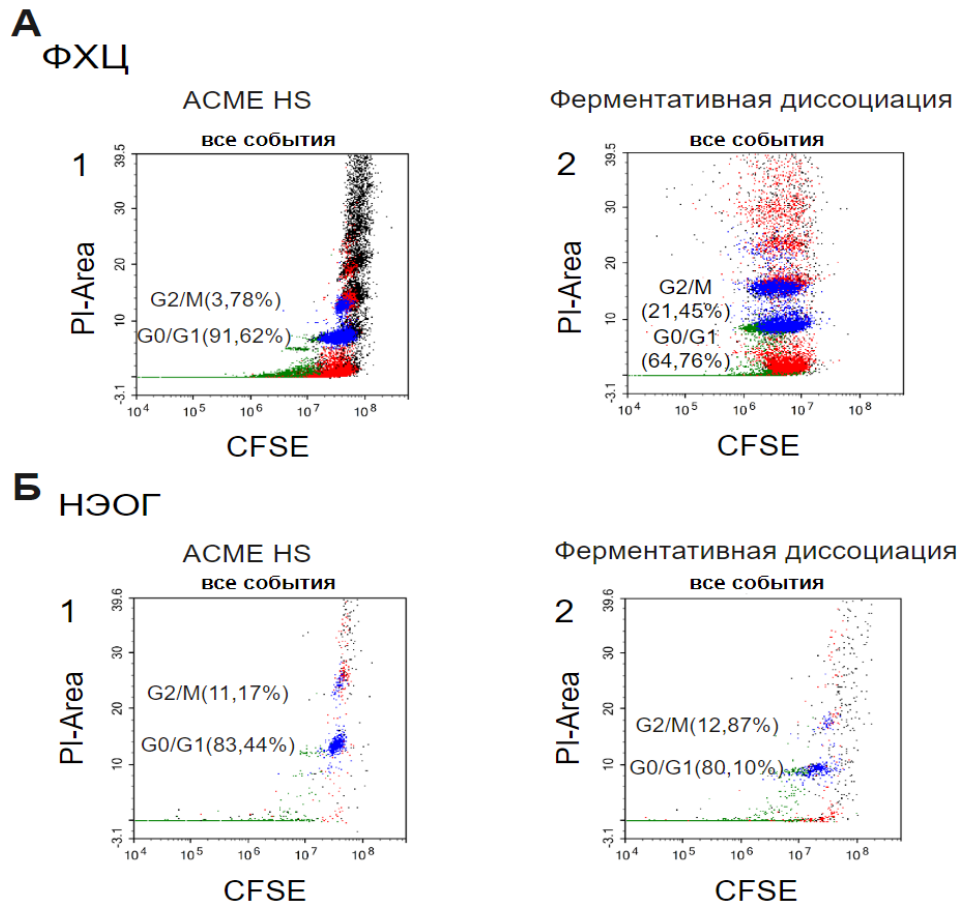
Для того чтобы определить природу дебриса, мы окрасили образцы 5(6)-Карбоксифлуоресцеин диацетат N-сукцинимидным эфиром (CFSE) (Рисунок 10). Данный краситель часто используется в протоколах проточной цитометрии для маркировки жизнеспособных клеток благодаря своей способности связываться с внутриклеточными молекулами, в первую очередь, с аминокетонами.

Помимо роли в окрашивании жизнеспособных клеток, CFSE может использоваться для идентификации мертвых клеток [130].

Как показано на Рисунке 10 А1-2, Б1-2, большинство предполагаемых фрагментов клеток, составляющих дебрис, и отмеченных зеленым цветом, оказались CFSE-положительными и PI-отрицательными, что говорит о том, что такие клеточные структуры, как правило, не содержат ядер.

При сравнении частот встречаемости дебриса и агрегатов, и анализа дот-плотов, было установлено, что и ACME HS, и ферментативный метод диссоциации демонстрировали сходное количество агрегатов и дебриса.

Несмотря на большое количество дебриса и агрегатов (ожидаемо в исследуемых образцах), с помощью проточной цитометрии мы убедились, что наши образцы содержат достаточное количество одиночных клеток, полученных методами ACME HS и ферментативной диссоциации (Рисунок 8 А1, Б1, В1, Г1).



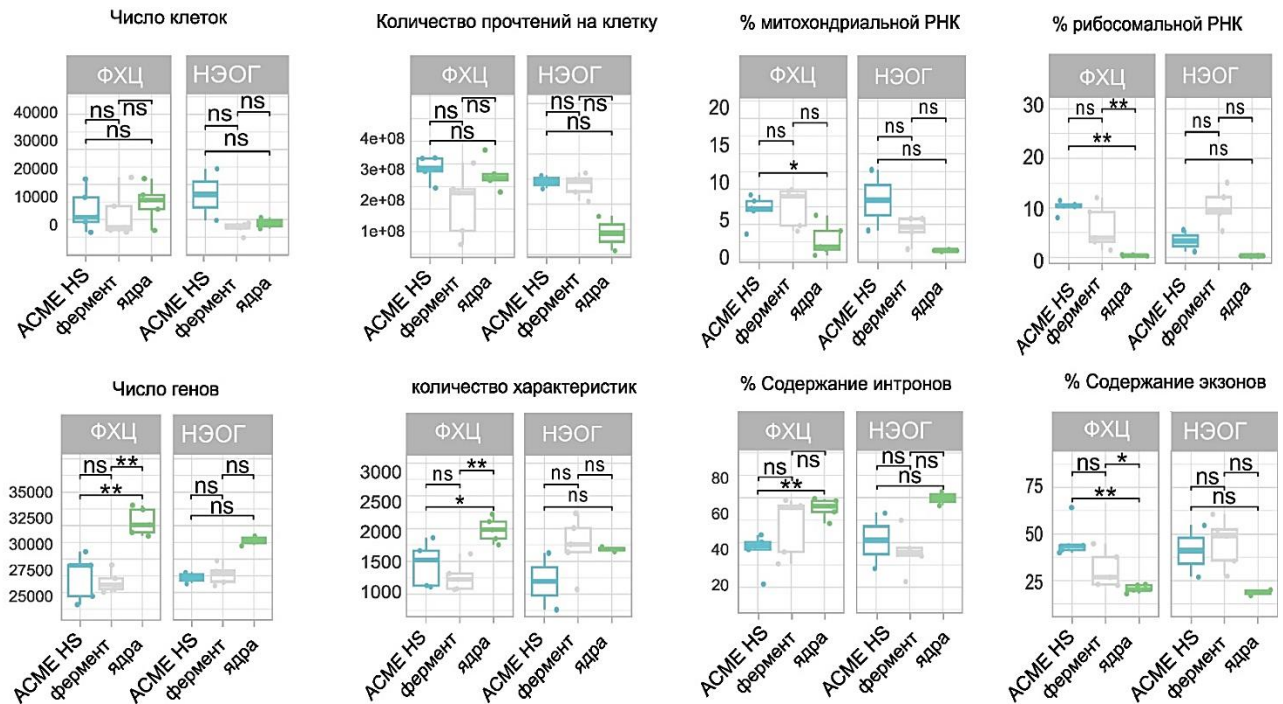
**Рисунок 10** – Определение природы дебриса с использованием окрашивания CFSE. Образцы были окрашены CFSE. **A1-2** и **B1-2** показывают, что большинство предполагаемых клеточных фрагментов (выделенных зеленым гейтом) являются CFSE-положительными и PI-отрицательными.

### 3.2.3. Общая характеристика кДНК-библиотек 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 11).

Мы обнаружили, что показатели метрик контроля качества полученных данных для ACME HS сопоставимы с таковыми для ферментативной диссоциации и для метода выделения ядер, а в некоторых случаях были практически идентичными. Выявлены некоторые различия в уровнях экспрессии рибосомальных генов между образцами ядерной экстракции и единичными клетками ФХЦ, полученными методами ACME HS и ферментативной диссоциации, как и в соотношении экзонов и

интронов (Рисунок 11). Как и ожидалось, данные, полученные при анализе ядер, продемонстрировали большее число идентифицированных генов. В то же время не было обнаружено существенных различий в параметрах качества, таких как общее количество клеток и количество прочтений в клетках среди всех образцов (Рисунок 11).

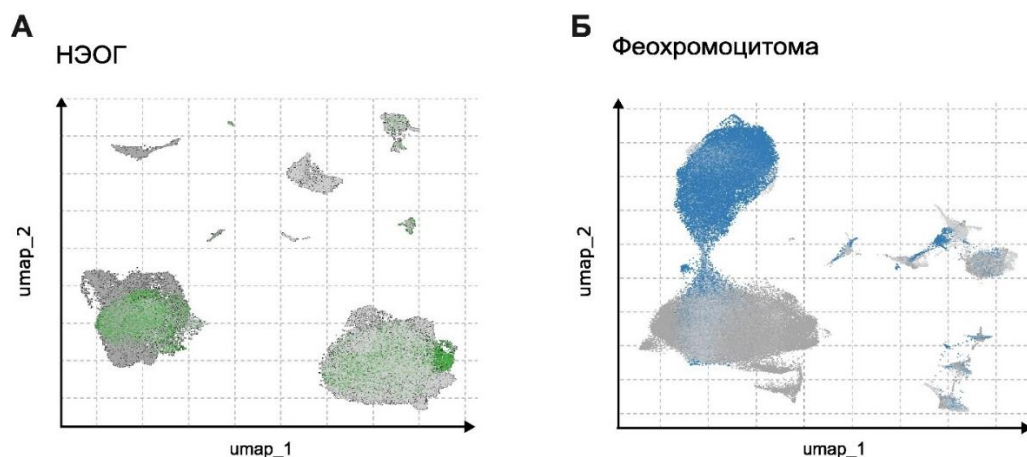


**Рисунок 11** – Стандартные метрики контроля качества наборов данных образцов при анализе транскриптомов единичных клеток (количество клеток; фракция идентифицированных прочтений в клетках; картирование экзонов/интронов; митохондриальные, рибосомальные гены; общее число обнаруженных генов и транскриптов на клетку) для наборов данных образцов, диссоциированных методами АСМЕ 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 –  $p > 0,05$ .

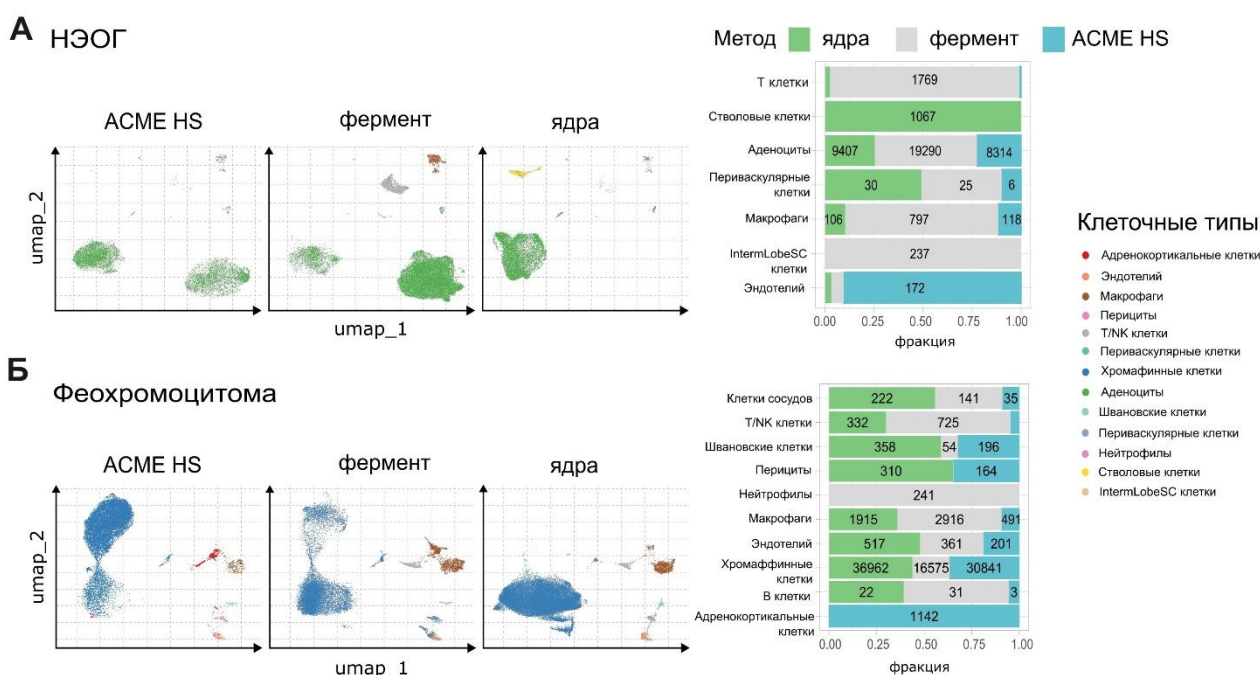
Для того, чтобы провести сравнительную оценку представленности различных клеточных типов в наборах данных, полученных методами ферментативной диссоциации, ядерной экстракции и АСМЕ HS, мы использовали Seurat v.4.9 [109] с целью создания интегрированных наборов данных и проведения клеточной аннотаций для каждого типа ткани. Была проведена интеграция наборов данных на основе метода АСМЕ HS, ферментативной диссоциации и ядерной экстракции. Данные для НЭОГ и ФХЦ представлены на Рисунке 12. Для наборов данных на основе трех методов диссоциации были определены основные



клеточные типы. Мы выяснили, что в данных ACME HS успешно идентифицируются тканеспецифические клетки, а именно, аденоциты и хромаффинные клетки, и другие неспецифические для ткани клетки (Рисунок 13).



**Рисунок 12** – UMAP интеграции наборов данных клеток НЭОГ (А) и ФХЦ (Б), полученных с помощью ACME HS, методом ферментативной диссоциации и ядерной экстракции. Клетки НЭОГ, полученные методом ACME HS, помечены зеленым цветом, а клетки ФХЦ в синий цвет. Клетки, полученные ферментативным методом, и ядра маркированы серым цветом

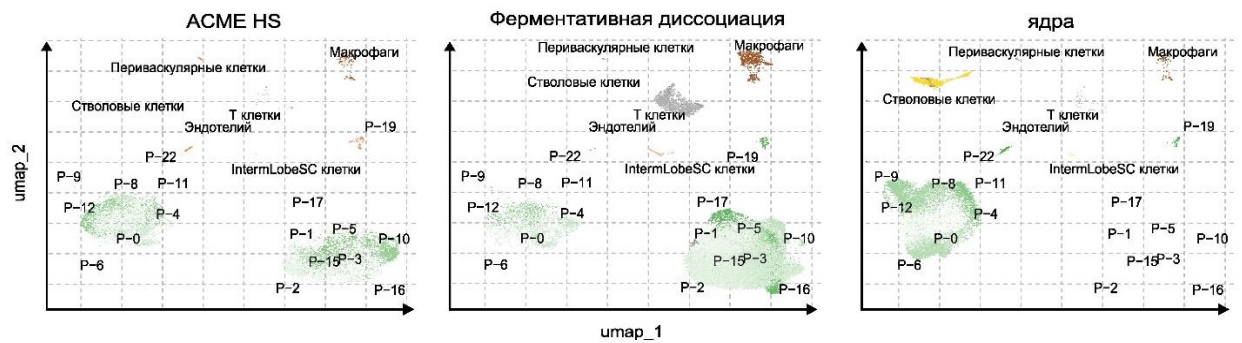


**Рисунок 13** – UMAP с аннотацией основных клеточных типов, идентифицированных в наборе данных клеток НЭОГ и ФХЦ. **А.** Соотношения клеточных типов, идентифицированных различными методами диссоциации (ACME HS, ферментативная и ядерная экстракция) для тканей НЭОГ. На диаграмме не указано количество клеток, составляющих менее 5% от общего числа. **Б.** Соотношения клеточных типов, идентифицированных различными методами диссоциации (ACME HS, ферментативная и ядерная экстракция) для

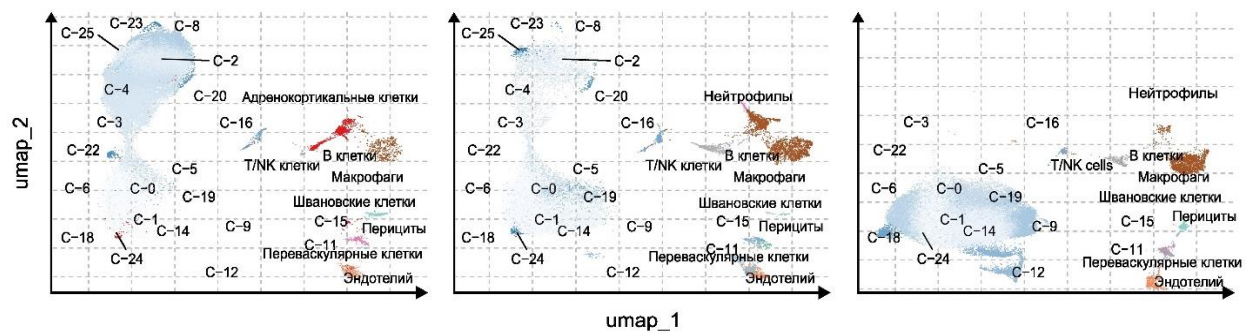
тканей ФХЦ. На диаграмме не указано количество клеток, составляющих менее 5% от общего числа

Гетерогенность основных клеточных типов оценивалась путем дальнейшей кластеризации интегрированных клеток (Рисунок 14).

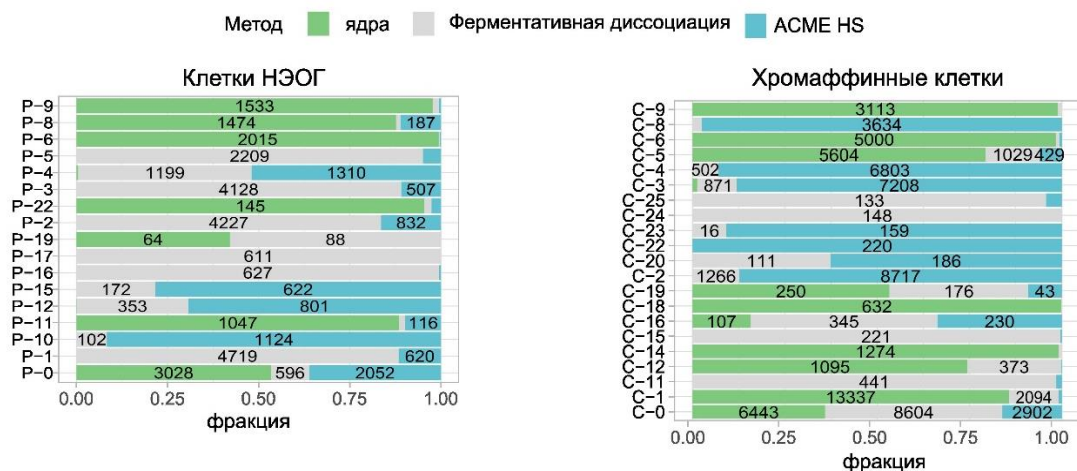
### А НЭОГ



### Б Феохромоцитома



### В

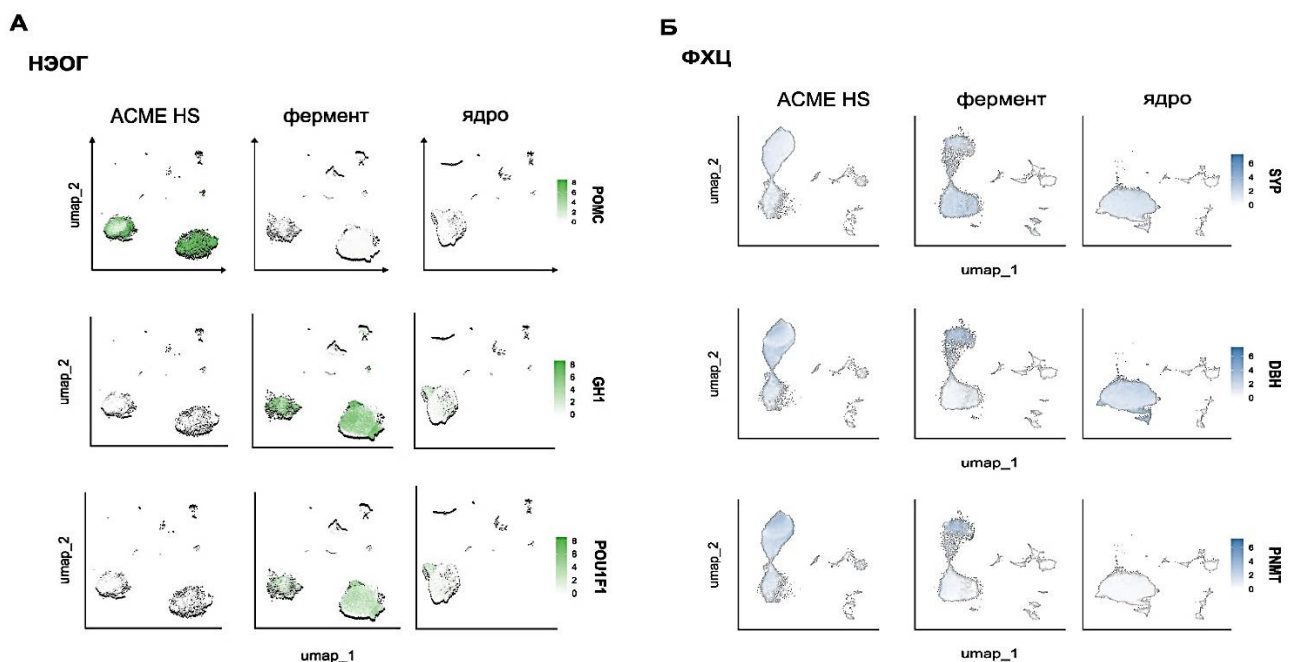


**Рисунок 14** – График UMAP, демонстрирующий гетерогенность основных типов клеток, полученных разными методами тканевой диссоциации. **А.** Визуализация основных клеточных субпопуляций и состояний для клеток НЭОГ. Интегрированные данные клеток гипофиза были кластеризованы. **Б.** Визуализация основных клеточных субпопуляций и состояний для клеток ФХЦ. Клетки, попадающие в небольшие кластеры (< 100 клеток), были объединены в отдельные минорные группы и исключены из анализа. **В.** Соотношение основных клеточных субкластеров в образцах НЭОГ и ФХЦ



Субкластеры с числом клеток менее 100 были исключены из анализа. Потеря многочисленных субкластеров наблюдалась в наборах данных ядер хромаффинных и гипофизарных клеток (С-2, С-4, С-8, С-20, С-23 и С-25 и Р-1, Р-2, Р-3, Р-5, Р-10, Р-15, Р-16 и Р-17 соответственно) (Рисунок 14). Несмотря на ожидаемую вариабельность клеточных субпопуляций, обусловленную особенностями тканей гипофиза и надпочечника, наиболее очевидная разница была обнаружена для образцов на основе ядерной экстракции.

### 3.2.4. Анализ экспрессии ключевых тканеспецифических генов в единичных клетках, полученных методом ACME HS



**Рисунок 15 – А.** Графики UMAP, демонстрирующие экспрессию выбранных генов в аденоцитах, в частности *POMC*, *GH1* и *POU1F1*. **Б.** Графики UMAP, демонстрирующие экспрессию выбранных генов, в частности, *SYP*, *DBH* и *PNMT* в хромаффинных клетках

Мы исследовали, насколько хорошо метод ACME HS сохраняет экспрессию генов, характерных для двух образцов тканей. В общей сложности было получено 94807 клеток и ядер из опухолей медуллярного слоя надпочечника ( $n = 15$ ) и 41418 клеток и ядер из НЭОГ ( $n = 9$ ) с 89% хромаффинных клеток и 79,6% гипофизарных клеток, соответственно (Рисунок 13). Эти клетки экспрессировали основные

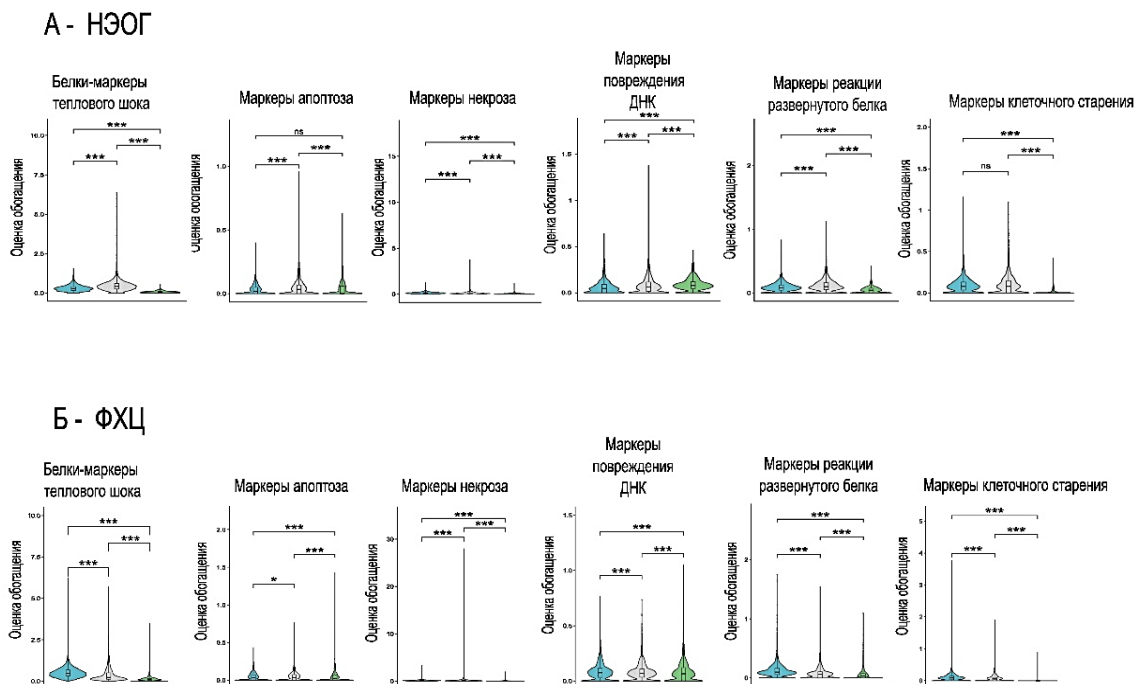
маркерные гены, которые обычно используют для идентификации тканей гипофиза и феохромоцитомы, такие как *POMC*, *GHI*, *POU1F1* (Рисунок 15 А) и *CHGA* [131], *PNMT* [132] (Рисунок 15 Б), соответственно.

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

Поскольку методы диссоциации и фиксации могут сопровождаться клеточным стрессом [133], о чем свидетельствуют изменения на транскриптомном уровне, мы изучили экспрессию ключевых маркеров стресса и клеточной гибели (Рисунок 16). В частности, экспрессия маркеров, связанных с апоптозом, некрозом, клеточным старением, повреждением ДНК, тепловым шоком и ответом развернутого белка (UPR) была оценена в наборах данных на основе ACME HS, ферментативной и ядерной диссоциации для всех анализируемых образцов тканей. Мы обнаружили, что экспрессия маркерного гена белка теплового шока является самой низкой в наборе данных ядерной экстракции и самой высокой в наборе данных ферментативной диссоциации. Все три метода показали низкий уровень экспрессии маркеров апоптоза в тканях опухолей надпочечника, при этом экспрессия этих маркеров была выше в ферментативно диссоциированных НЭОГ. Маркеры некроза также имели низкий уровень экспрессии для разных методов диссоциации, а самая высокая экспрессия была обнаружена в наборе данных, полученных ферментативным методом. Примечательно, что маркеры повреждения ДНК имели самый низкий уровень экспрессии в клетках, полученных методом ACME, для обоих опухолей. Кроме того, *ERN2*, маркер UPR, имел высокий уровень экспрессии в наборах данных НЭОГ, полученных с помощью методов ACME HS и ядерной экстракции. Экспрессия маркеров клеточного старения была выше в ACME HS диссоциированных образцах, чем в наборе ядерных данных, тем не менее, они значительно отличались от данных ферментативной диссоциации.

Данные и результаты, полученные при разработке метода диссоциации ACME HS, были опубликованы в [134].

Методы  ядерная экстракция  ферментативная диссоциация  ACME-HS



**Рисунок 16** – Относительная экспрессия маркеров теплового шока, апоптоза, некроза, повреждения ДНК, клеточного старения и ответа на неверный белковый фолдинг в наборах данных, полученных из опухолевых образцов НЭОГ и ФХЦ

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

Мы адаптировали протокол и доказали эффективность получения единичных клеток из свежемороженых 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): Р1-Р3, 3 кортикотропиномы (КА) Р4-Р6, 2 неактивные соматотропиномы (НСА): Р7-Р8, и 2 неактивные гонадотропиномы (НГА) Р9-Р10. Важность расширенного ИГХ-анализа пациентов с аденомой гипофиза была подробно рассмотрена<sup>1</sup>. Результаты исследования подтвердили выраженную гетерогенность опухолей

<sup>1</sup> Асаад В., Пачуашвили Н. В., Урсова 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, № 1. С. 13–22.

гипофиза и наличие экспрессии гормонов методом ИГХ-окрашивания, что свидетельствует о сложности их диагностики при использовании только клинко-гормональных методов. Комплексный иммуногистохимический анализ играет ключевую роль в точной классификации этих опухолей, что может способствовать совершенствованию диагностических и терапевтических подходов.

**Таблице 3** – 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	PTT1	TRIT	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	+	+	-	+	-	-

**Пациент № 1 (P8)**, женщина в возрасте 41 года. Из анамнеза известно, что в течение 8 лет предъявляет жалобы на частые выраженные головные боли, купирующиеся анальгетиками, изменения внешности, отеки, потливость, нарушение менструального цикла, выраженную слабость, повышенную утомляемость и храп во сне. Около 3 лет назад начала отмечать головные боли и изменения внешности. По результатам МРТ головного мозга и гипофиза с

контрастированием выявлено объемное образование, расположенное интраселлярно, размерами 45×35×24 мм, гомогенно накапливающее контрастное вещество. Данное образование расширяет турецкое седло, замещает гипофиз и воронку, распространяется латероселлярно в обе стороны в область кавернозных синусов, преимущественно вправо, муфтообразно охватывает кавернозные сегменты внутренних сонных артерий, супраселлярно оттесняет вверх перекрест зрительных нервов. В целях дообследования проведен гормональный анализ крови: АКТГ (утро) 34 пг/мл (7,9–66,1), кортизол (утро) 550 нмоль/л (150–660), ТТГ 1,51 мкМЕ/мл (0,35–4,95), ФСГ 0,46 мМЕ/мл (19,30–100,60), ЛГ 0,0 МЕ/л (14,20–52,30), прогестерон 1,67 нмоль/л (< 0,6), пролактин 208,6 мМЕ/л (109–557), ИФР-1 171,3 нг/мл (78–311) (Таблица 3).

На основании клинико-инструментальных данных установлен диагноз: гормонально-неактивная макроаденома гипофиза с интра-латеро-супраселлярным ростом, распространением в кавернозные синусы, больше справа, деформацией хиазмы. Гипогонадотропный гипогонадизм.

Выполнено хирургическое удаление опухоли – трансназальная аденомэктомия. По результатам гистологического исследования выявлены фрагменты нейро- и аденогипофиза с прилежащими участками аденомы гипофиза с выраженными дегенеративными изменениями. При иммуногистохимическом исследовании обнаружено очаговое неравномерной интенсивности окрашивание цитоплазмы опухолевых клеток с антителами к СТГ, экспрессия САМ 5.2 в виде фиброзных телец, экспрессия пролактина в единичных опухолевых клетках, индекс метки Ki67 = 9,2%, а также слабо выраженная очаговая экспрессия рецепторов соматостатина 2 подтипа (1 балл по IRS) (Таблица 3). Морфологическая картина и иммунофенотип опухоли соответствовали редкогранулированной гормонально-неактивной соматотропной опухоли гипофиза.

**Пациент № 2 (P10)**, мужчина 66 лет, впервые отметил появление постоянной головной боли и головокружение около года назад. Спустя 6 месяцев стал отмечать нарастание интенсивности головной боли, постоянную тошноту, рвоту после каждого приема пищи. Выполнено МРТ головного мозга с

контрастным усилением: гипофиз увеличен за счет образования, гантелевидной формы, размерами 34×28,5×26 мм с инфра-, супра- и латероселлярным распространением; структура образования достаточно однородная; верхняя часть образования компримирует хиазму, оттесняя ее кверху. В целях дообследования проведен гормональный анализ крови: ТТГ 4,96 мкМЕ/мл (0,27–4,2), св.Т4 0,38 нг/дл (0,8–2,1), пролактин 28,7 нг/мл (4,6–21,4), АКТГ 26,5 пг/мл (7,9–66,1), кортизол 5,3 мкг/дл (6,2–19,4), СТГ 0,184 нг/мл (0,02–1,23), ИФР-1 60,27 нг/мл (16–245), ЛГ 0,64 МЕ/л (1,14–8,75), ФСГ 0,82 мМЕ/мл (0,95–11,95), тестостерон 0,77 нмоль/л (12–23,4) (Таблица 3).

Выставлен диагноз: клинически гормонально-неактивная макроаденома гипофиза с инфра-, супра-, латероселлярным распространением. Хиазмальный синдром. Гипопитуитаризм: вторичная надпочечниковая недостаточность, вторичный гипотиреоз, гипогонадотропный гипогонадизм. Гиперпролактинемия, обусловленная «масс-эффектом» макроадеомы гипофиза.

Проведено хирургическое удаление опухоли. При гистологическом исследовании выявлены фрагменты аденомы гипофиза из клеток с хромофобной цитоплазмой, митозы не обнаружены, преимущественно солидного строения. По результатам ИГХ исследования: выявлена позитивная экспрессия в большинстве опухолевых клеток ЛГ и ФСГ, а также экспрессия АКТГ и ТТГ в единичных опухолевых клетках. Отмечается экспрессия факторов транскрипции SF-1 в опухоли и наличие единичных позитивно окрашенных клеток с антителами к PIT1. Экспрессия TRIT, СТГ и пролактина не выявлена. Индекс пролиферативной активности по Ki67 равен 3,2% (Таблица 3). Морфологическая картина и иммунофенотип опухоли соответствовали плюригормональной опухоли гипофиза.

**Пациент № 3 (P7)**, женщина 33 лет, обратилась с жалобами на отсутствие менструального цикла. По данным лабораторного исследования крови пролактин 81,24 нг/мл (5,18–26,53), ТТГ 3,27 мкЕд/мл (0,25–3,5), св.Т4 12,52 нг/дл (0,8–2,1), ЛГ 0,11 мЕд/мл (14,20–52,30), ФСГ 1,39 мЕд/мл (19,30–100,60). В связи с гиперпролактинемией пациентке назначался каберголин в дозе 0,5 мг по ½ таб. 2 раза в неделю, на фоне приема которого в течение 1 месяца уровень пролактина

снизился до 4,34 нг/мл, в связи с чем доза препарата была снижена до ¼ таб. 2 раза в неделю с последующей нормализацией уровня гормона в крови, на основании чего был сделан клинический вывод о повышении пролактина вследствие «масс-эффекта». При обследовании в стационаре ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России перед оперативным вмешательством: пролактин – 210,1 мЕд/л (94–500), ТТГ 1,869 мМЕ/л (0,25–3,5), АКТГ (утро) 20,54 пг/мл (7,2–63,3), кортизол (утро) 325 нмоль/л (171–536), ЛГ 4,94 Ед/л (2,6–12,1), ФСГ 5,93 Ед/л (1,9–11,7), СТГ 0,58 нг/мл (0,06–6,9) (Таблица 3).

Проведено МРТ гипофиза с контрастом: выявлено объемное интрасупраселлярное образование с минимальным латероселлярным выбуханием больше вправо, с четкими контурами, примыкающее к сифону правой внутренней сонной артерии без его вовлечения, верхними отделами компримирующее хиазму, достигая дна III желудочка, наибольшими размерами 27×31×22 мм.

Установлен диагноз: Макроаденома гипофиза с интра-, супраселлярным распространением, клинически гормонально неактивная. Нарушение менструального цикла репродуктивного периода вследствие гиперпролактинемии «масс-эффекта». Вторичная аменорея.

Выполнена трансназальная аденомэктомия. При гистологическом исследовании материал представлен фрагментами опухоли гипофиза из хромофобных клеток с формированием периваскулярных псевдорозеток и фрагментом аденогипофиза с фиброзированной стромой. Фигур митозов не выявлено. При ИГХ исследовании выявлена экспрессия PIT1 в опухоли и слабая экспрессия СТГ. Экспрессия TRIT, SF-1, пролактина, АКТГ, ТТГ, ЛГ, ФСГ не выявлена (Таблица 3). Индекс пролиферативной активности по Ki67 был равен 9,2%. Морфологическая картина и иммунофенотип опухоли соответствовали соматотропной опухоли гипофиза.

**Пациент № 4 (P4)**, женщина 62 лет, в течение 4 последних лет стала отмечать клинические проявления гиперкортицизма, в связи с чем обратилась к эндокринологу по месту жительства. По результатам гормонального исследования крови: кортизол после малой пробы с дексаметазоном составил 367 нмоль/л (норма

менее 50 нмоль/л), кортизол в слюне вечером 58 нмоль/л (норма до 9), АКТГ 98,7 пмоль/л (1,3–16,7) (Таблица 3). При проведении МРТ выявлена микроаденома гипофиза 8×8×6 мм. Таким образом, по данным лабораторного и инструментального исследования подтвержден диагноз болезни Иценко – Кушинга.

Проведено оперативное лечение в объеме трансназальной аденомэктомии. При морфологическом исследовании выявлены фрагменты опухоли из клеток с базофильной и светлой базофильной цитоплазмой, округлыми и овоидными базофильными ядрами с видимыми ядрышками в части ядер. Очагово опухолевые клетки формируют псевдожелезистые структуры вокруг тонкостенных кровеносных сосудов. Митотическая активность не определяется. При ИГХ исследовании выявлено выраженное окрашивание цитоплазмы практически всех опухолевых клеток с антителами к АКТГ, PIT1, TRIT и SAM5.2. Наблюдается экспрессия СТГ в опухоли. Экспрессия SF-1, пролактина, ТТГ, ЛГ и ФСГ не выявлена (Таблица 3). Индекс пролиферативной активности по Ki67 равен 3,2%. Морфологическая картина и иммунофенотип опухоли соответствовали плотноранулированной кортикотропной опухоли гипофиза с высокой экспрессией СТГ.

**Пациент № 5 (P1)**, женщина 54 лет, с 48 лет стала отмечать появление выраженных головных болей, отеки лица, укрупнение черт лица, увеличение размеров стоп и кистей. Выполнено МРТ головного мозга: выявлена опухоль гипофиза 13,6×13×13,2 см. По данным гормонального исследования: ИФР-1 757 мЕд/л (норма до 269), пролактин 578 нг/мл (норма до 557), СТГ 20 нг/мл (0,06–6,9), ТТГ 0,344 мМЕ/л (0,25–3,5), ЛГ 10,3 Ед/л (2,6–12,1), ФСГ 40,9 Ед/л (1,9–11,7) повышен – в связи с наступлением менопаузы 6 месяцев назад, св.ТЗ 4,48 пмоль/л (2,6–5,7), св.Т4 12,42 пмоль/л (9–19) (Таблице 3).

На основании клинико-инструментальных и лабораторных данных установлен диагноз: Акромегалия, активная стадия. Макроаденома гипофиза.

Выполнена трансназальная аденомэктомия. В гистологическом материале определяются фрагменты опухоли из небольших клеток с умеренным количеством



эозинофильной цитоплазмы, относительно мономорфными округлыми базофильными ядрами с мелкозернистым хроматином, видимыми ядрышками в части ядер. Митотическая активность не определяется. При ИГХ исследовании в большинстве опухолевых клеток выявлена экспрессия P1T1, слабое очаговое цитоплазматическое окрашивание СТГ и экспрессия АКТГ в единичных клетках, экспрессия САМ5.2 в виде фиброзных телец. Экспрессия SF-1, TP1T, пролактина, ТТГ, ЛГ и ФСГ в опухоли не выявлена (Таблица 3). Индекс пролиферативной активности по Ki67 равен 1,7%. Морфологическая картина и иммунофенотип опухоли соответствовали редкогранулированной соматотропной опухоли гипофиза.

**Пациент № 6 (Р6)**, женщина 48 лет, с 42 лет страдает болезнью Иценко – Кушинга, которая диагностирована около года назад: по данным малой дексаметазоновой пробы подавление кортизола отсутствует – кортизол 20,9 мкг/дл (норма менее 1,8), АКТГ 65 пг/мл (7,9–66,1). При дообследовании в ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России: кортизол (вечер) 662,6 нмоль/л (64–327), АКТГ (вечер) 44,06 пг/мл (2–25,5), АКТГ (утро) 35,72 пг/мл (7,2–63,3), кортизол (утро) 606,3 нмоль/л (171–536), ТТГ 1,501 мМЕ/л (0,25–3,5), св.Т4 11,09 пмоль/л(9–19), ФСГ 3,89 Ед/л (1,9–11,7), ЛГ 0,748 < Ед/л (2,6–12,1), пролактин 291,5 мЕд/л (94–500). По данным МРТ головного мозга выявлена микроаденома гипофиза 9×7×6 мм.

Проведена трансназальная аденомэктомия. В гистологическом материале определяются фрагменты опухоли с очагами кровоизлияний из укрупненных клеток с умеренным количеством эозинофильной цитоплазмы, округлыми и овоидными светлыми базофильными ядрами с мелкозернистым хроматином, видимыми ядрышками. При ИГХ исследовании в большинстве опухолевых клеток выявлена выраженная экспрессия P1T1, АКТГ и САМ 5.2, экспрессия SF-1, TP1T, СТГ, пролактина, ТТГ, ЛГ и ФСГ не выявлена (Таблица 3). Индекс пролиферативной активности по Ki67 равен 6,6%. Морфологическая картина и иммунофенотип опухоли соответствовали плотногранулированной кортикотропной опухоли гипофиза.

**Пациент № 7 (РЗ)**, женщина 60 лет, с 2016 г. беспокоят частые головные боли, онемение и увеличение кистей рук. В 2020 при обследовании впервые выявлена аденома гипофиза. Стала отмечать за собой изменения внешности, увеличение ушей, носа, стоп, а также постепенное снижение остроты зрения. По данным МРТ головного мозга - аденома гипофиза 10×12 мм с мелкими участками кистозной дегенерации по периферии, хиазма не изменена, зрительные нервы без особенностей, воронка гипофиза отклонена вправо, супраселлярная цистерна слева сужена. При гормональном обследовании: пролактин 743,2 мЕд/л (69–340), ТТГ 0,714 мМЕ/л (0,25–3,5), св.Т4 9,94 пмоль/л (9–19), СТГ 3,2 нг/мл (0,06–6,9), ИФР 1 539,8 нг/мл (17–238).

На основании клинико-инструментальных и лабораторных данных установлен диагноз: Акромегалия, активная фаза. Макроаденома гипофиза. Повышение уровня пролактина не была расценена как опухолевая.

Проведена трансназальная аденомэктомия. При гистологическом исследовании выявлены фрагменты аденомы гипофиза солидного строения из базофильных клеток. При выполнении ИГХ исследования опухоли выявлена позитивная экспрессия PIT1, SF-1, очаговое окрашивание цитоплазмы опухолевых клеток с антителами к СТГ, пролактину и САМ 5.2. Экспрессия других маркеров, таких как, TRIT, ЛГ, ФСГ, АКТГ и ТТГ не выявлена (Таблица 3). Индекс пролиферативной активности по Ki67 4,5%. Иммунофенотип соответствовал плюригормональной нейроэндокринной опухоли гипофиза.

**Пациент № 8 (Р9)**, женщина 78 лет, в течение 3 последних лет стала отмечать ухудшение зрения, к врачу не обращалась. Год назад в связи с резким ухудшением зрения, консультирована офтальмологом, выявлено сужение полей зрения. Пациентка направлена на МРТ головного мозга, которое выявило в хиазмально-селлярной области объемное образование неправильной формы, без четких контуров, неоднородно изо-гиперинтенсивного сигнала по T2-взвешенным изображениям (ВИ) и неоднородного изо-гипоинтенсивного сигнала по T1-ВИ, максимальными размерами до 34×26×37 мм, с компрессией лобных долей и частично III желудочка. По результатам гормональных исследований: пролактин 1500 мЕд/л (69–340), ЛГ 0,01

мМЕ/л (7,7–58,5), ФСГ 13,1 мМЕ/л (26,72–133,4), СТГ 0,13 нг/мл (0,06–6,9), ИФР-1 76,78 нг/мл (17–238), АКТГ 28,7 пг/мл (7,2–63,3), АКТГ (вечер) 27,6 пг/мл (2–25,5), кортизол (вечер) 87,37 нмоль/л (64–327), АКТГ (утро) 33,12 пг/мл (7,2–63,3), св.Т4 14,57 пмоль/л (9–19), ТТГ 0,001 мМЕ/л (0,4–4,0) (Таблица 3).

Выставлен диагноз: Макроаденома гипофиза, клинически гормонально неактивная с супраселлярным распространением в область хиазмы и дна III желудочка. Хиазмальный синдром. Гипопитуитаризм: смешанный гипотиреоз (первичный вследствие перенесенной тиреоидэктомии по поводу папиллярного рака щитовидной железы и вторичный вследствие аденомы гипофиза), медикаментозная компенсация. Гиперпролактинемия вследствие масс-эффекта.

В связи с большим размером аденомы гипофиза и развитием хиазмального синдрома выполнено нейрохирургическое лечение в объеме трансназальной аденомэктомии. При выполнении ИГХ исследования опухоли выявлена позитивная экспрессия ЛГ (до 20–30% опухолевых клеток) и ФСГ (до 30–40% опухолевых клеток), экспрессия других маркеров, таких как РIT1, ТRIT, СТГ, пролактин, АКТГ и ТТГ не выявлена (Таблица 3). Индекс пролиферативной активности по Ki67 равен 2,7%. Иммунофенотип соответствовал гонадотропиному.

**Пациент № 9 (P5)**, мужчина 28 лет, в течение последних 2 лет стал отмечать избыточный набор веса – 10 кг за год. Проконсультирован эндокринологом по месту жительства, назначено дообследование: пролактин до 406,8 мМЕ/л, АКТГ (утро) 77,93 пг/мл (7,2–63,3), анализ суточной мочи на кортизол 2783,61 мкг/сут (380,0–940,0), кортизол в слюне вечером – 9,58 нмоль/л (0,5–9,65), ТТГ 1,2 мМЕ/л (0,25–3,5), ЛГ 4,9 мМЕ/л (1,14–8,75), ФСГ 6,9 МЕ/л (0,95–11,95), СТГ 0,005 нг/мл (0,06–6,9), ИФР 1315,2 нг/мл (17–238) (в п/о периоде СТГ на фоне ОГТТ все точки <0,05 нг/мл), тестостерон 7,41 нг/мл (Таблице 3). МРТ гипофиза с контрастным усилением: солидное округлое образование размерами 1,3×2,1×1,3 см с признаками супраселлярного роста.

На основании клинико-инструментальных и лабораторных данных установлен диагноз: Болезнь Иценко – Кушинга, активная фаза. Макроаденома гипофиза с эндо-, супраселлярным ростом.

Выполнено трансназальное трансфеноидальное удаление аденомы гипофиза. При гистологическом исследовании выявлена опухоль из клеток с хромофобной цитоплазмой, местами формирующая псевдорозеточные структуры. При ИГХ исследовании выявлена позитивная окраска АКТГ и выраженная экспрессия САМ 5.2 в опухолевой ткани (Таблица 3).

Индекс пролиферативной активности по Ki67 равен 5%. Морфологическая картина и иммунофенотип соответствовала плотногранулированной кортикотропиоме.

**Пациент № 10 (P2)**, женщина 65 лет, около 5–7 лет назад стала отмечать изменения внешности, укрупнение кистей и стоп, увеличение размера обуви (с 38 размера до 40), увеличение межзубных промежутков, появление болей в суставах. По данным МРТ головного мозга в левом отделе аденогипофиза с распространением в основную пазуху определяется солидное образование, имеющее изоинтенсивный сигнал на T1- и T2-ВИ по сравнению с неизменной тканью аденогипофиза, латерально деформирующее медиальную стенку левого кавернозного синуса. Размер образования – 18×17×17 мм. По данным лабораторных исследований: СТГ 41,5 нг/мл (0,06–6,9), пролактин 853,7 мМЕ/л (69–340), АКТГ (утро) 46,9 пг/мл (7,2–63,3), ИФР 1703,6 нг/мл (17–238), ТТГ 0,765 мМЕ/л (0,25–3,5), св.Т4 13,66 пмоль/л (9–19), кортизол (утро) 698,6 нмоль/л (171–536) (Таблица 3).

Выставлен диагноз: Акромегалия, активная стадия. Макроаденома гипофиза с инфра-, латероселлярным распространением. Гиперпролактинемия вследствие «масс-эффекта».

Выполнено трансназальное трансфеноидальное удаление эндосупраселлярной аденомы гипофиза.

По гистологическим данным в послеоперационном материале определялись фрагменты аденомы гипофиза солидного строения из базофильных клеток.

Выполнено ИГХ исследование, которое показало неравномерное окрашивание цитоплазмы большинства опухолевых клеток антителами к СТГ и

CAM 5.2 (встречаются фиброзные тельца в небольшом количестве), наличие экспрессии пролактина в 5–10% опухолевых клеток.

Отмечена экспрессия PIT1 в опухоли (Таблица 3). Индекс пролиферативной активности по Ki67 был равен 1,6%.

Морфологическая картина и иммунофенотип соответствовала смешанной соматотропной и лактотропной нейроэндокринной опухоли гипофиза.

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

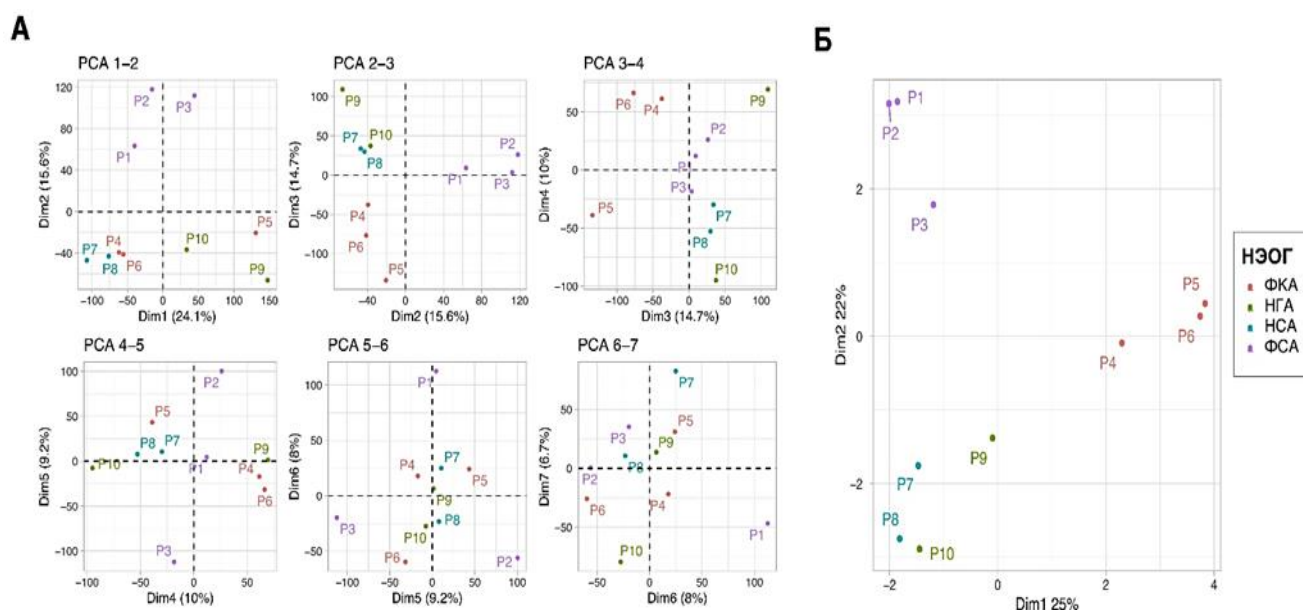
Для изучения транскриптомного профиля различных типов НЭОГ и проведения сравнительного анализа гормон-секретирующих и неактивных НЭОГ, мы провели анализ scRNA-seq 10 образцов НЭОГ. Все НЭОГ, включенные в исследование, были классифицированы на основании уровня гормонов в крови и ИГХ-окрашивания специфических факторов транскрипции и гормонов. Информация о пациентах представлена в Таблице 3. Общее количество единичных клеток составило 46571 для всех образцов НЭОГ.

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

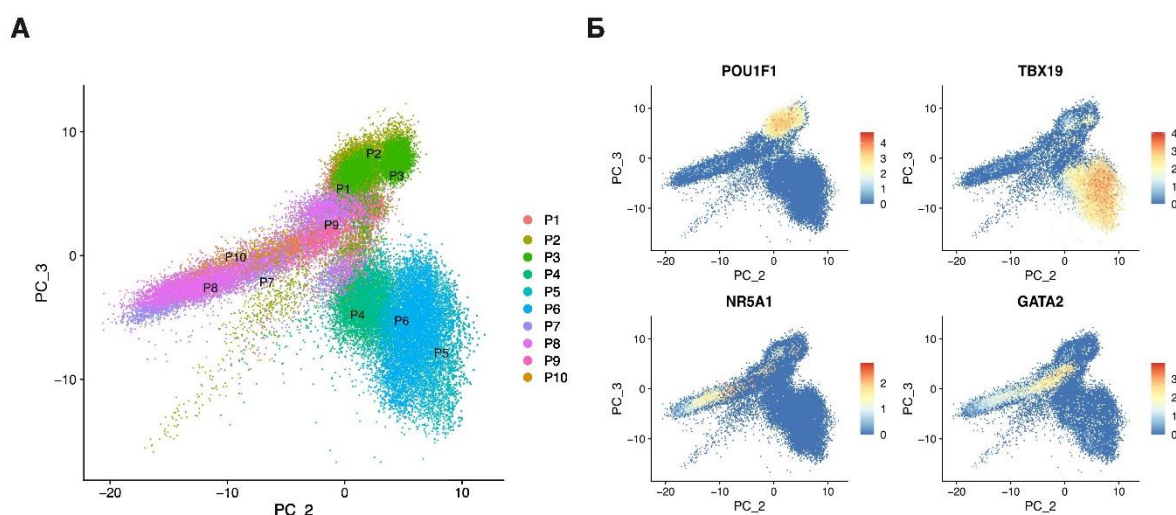
Для того, чтобы изучить транскриптомные профили и характеристики различных типов НЭОГ на уровне единичных клеток, мы проанализировали усредненную экспрессию генов с помощью метода главных компонент (PCA), представленного на Рисунке 17 А. Анализ многомерного масштабирования (MDS) был проведен для scRNA-seq данных полученных от всех образцов НЭОГ (Рисунок 17 Б) и идентифицировал сходства и различия между образцами в двумерном пространстве на основании их профиля экспрессии генов.

Мы обнаружили, что образцы одного и того же типа опухоли тесно сгруппированы друг с другом (Рисунки 17 Б, 18 А). Например, КА были тесно

сгруппированы вместе, в то время как СА образовывали отдельный от других типов кластер, что указывает на их уникальный профиль экспрессии. Напротив, аденомы НСА и НГА были расположены ближе друг к другу, хотя и с некоторым разделением, что свидетельствует о сходстве их общих профилей экспрессии генов. Мы также идентифицировали три клеточные линии тканей гипофиза по экспрессии основных факторов транскрипции *POU1F1*, *TBX19*, *NR5A1* и *GATA2* (Рисунок 18 Б).



**Рисунок 17** – (А) Анализ главных компонент (PCA), демонстрирующий распределение образцов НЭОГ на основании их транскриптомных профилей. (Б) Анализ многомерного масштабирования (MDS), показывающий различия и сходства между образцами в двумерном пространстве по их профилю экспрессии генов



**Рисунок 18** – 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 TPIT и *NR5A1/GATA2* для гонадотропной линии SF1 в единичных клетках с применением PCA

### **3.3.2. Классификация и характеристика клеточного состава нейроэндокринных опухолей гипофиза**

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 TPIT. Экспрессия факторов транскрипции и гормонов в каждом типе НЭОГ представлена на Рисунке 19. Экспрессия факторов транскрипции в каждом образце показана в приложении А. Обнаружено, что некоторые опухоли коэкспрессируют более одного ТФ или гормона, что указывает на существование плюри-гормональных по происхождению НЭОГ, что также было подтверждено при помощи ИГХ исследования (Таблица 3).

Для аннотации клеточных типов scRNA-seq данные были интегрированы с данными YAN и соавт. [3], в работе которых изучались различные типы НЭОГ человека. Однако этот интеграционный анализ оказался неэффективным для наших данных и показал низкую эффективность распознавания типов клеток. Мы построили нашу собственную интеграцию в соответствии со следующими параметрами:

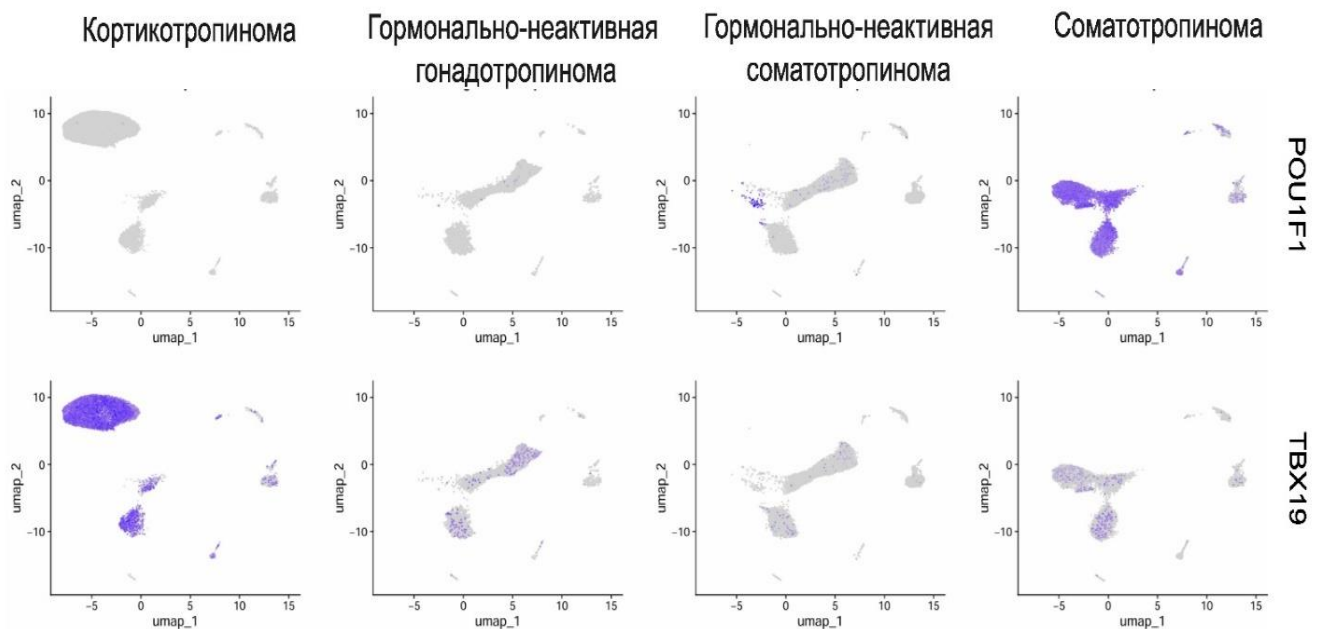
- 1) сделана интеграция и кластеризация с использованием только оригинальных данных, найдены гены с дифференциальной экспрессией для каждого кластера;
- 2) проведено автоматическое аннотирование клеточных типов с тканью мозга человека в качестве референсных данных;
- 3) соматотрофы, кортикотрофы и гонадотрофы определены по диагнозам, подтверждены наличием экспрессии соответствующих маркерных генов и разделены на подгруппы по соответствующим кластерам;

4) определены стадии клеточного цикла (кластер с пролиферирующими клетками не содержит G1);

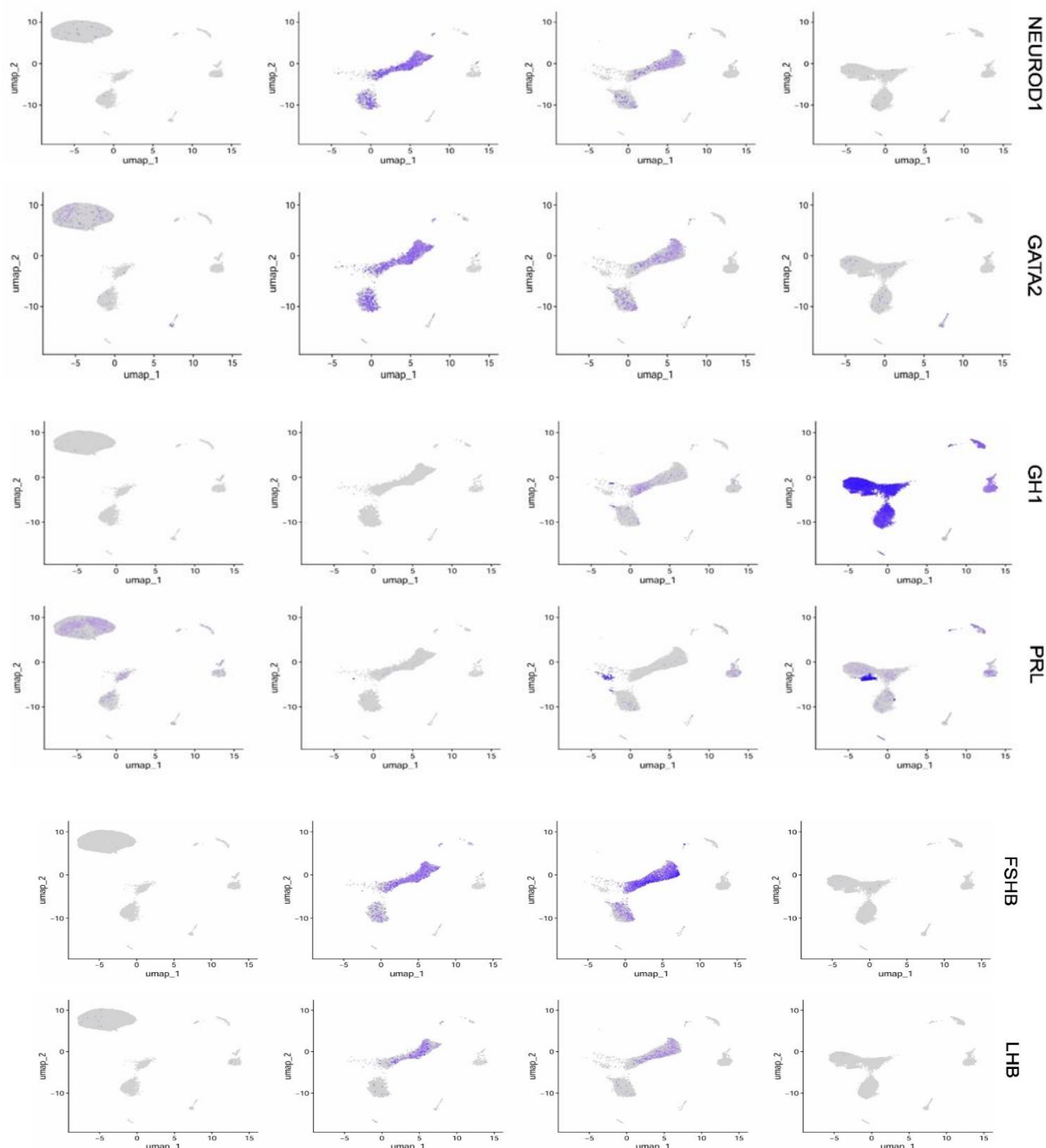
5) выполнен тест Фишера по кластерам, в котором оценивали долю дифференциально активных генов плюрипотентности (*POU5F1*, *SOX2*, *KLF4*, *MYC*, *NANOG*, *NOTCH3*, *CD44*, *CDKN1A*, *ITGA6*, *PODXL*, *FUT4*, *KIT*, *PROP1*, *LHX3*, *HES1*, *ZFP36L1*, *ANXA1*, *NFIB*, *ZNF521*, *ASCL1*, *NR2F2*) – определили кластер со стволовыми клетками;

6) клетки эндотелия, Т-клетки и макрофаги, полученные автоматическим классификатором, были подтверждены наличием экспрессии соответствующих специфичных маркерных генов;

7) кластер для лактотрофов определен по экспрессии *POU1F1*, а также *TLE*, *TIMP1*, *PRL*, *PEG10*, *SPE*, *SCG5*.





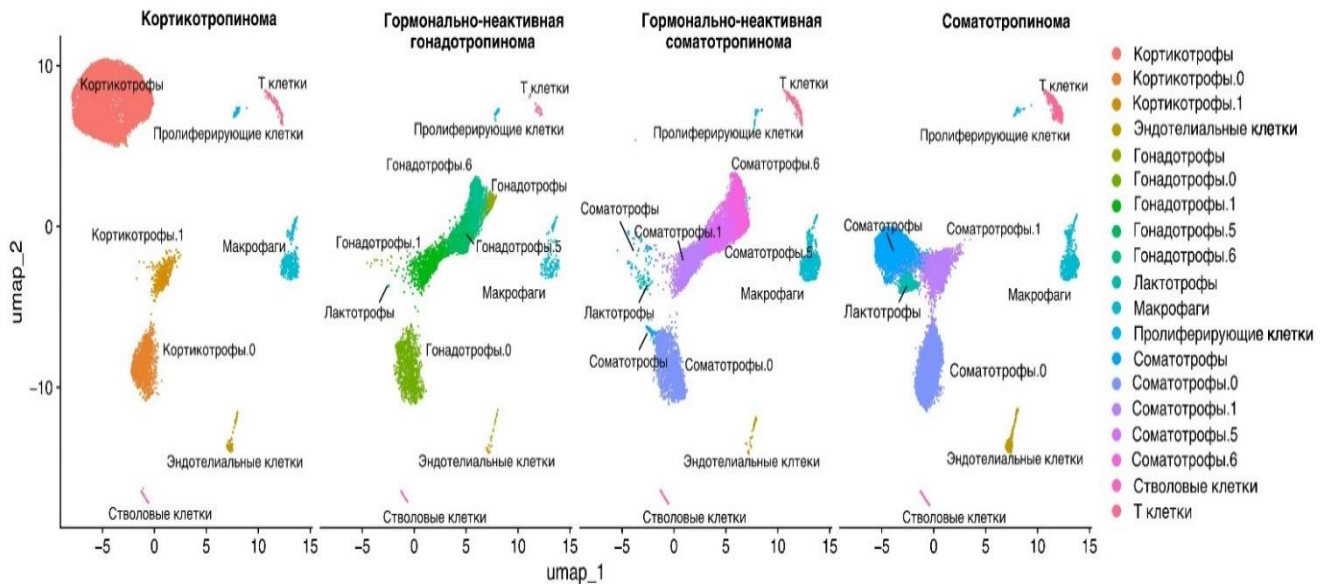


**Рисунок 19** – Графики UMAP, демонстрирующие экспрессию соответствующих генов в единичных клетках НЭОГ, в частности *POU1F1*, *PRL* и *GH* для линии PIT1; *NEUROD1*, *GATA2* и *LH/FSH* для линии SF1; *TBX19* и *POMC* для линии TRIT

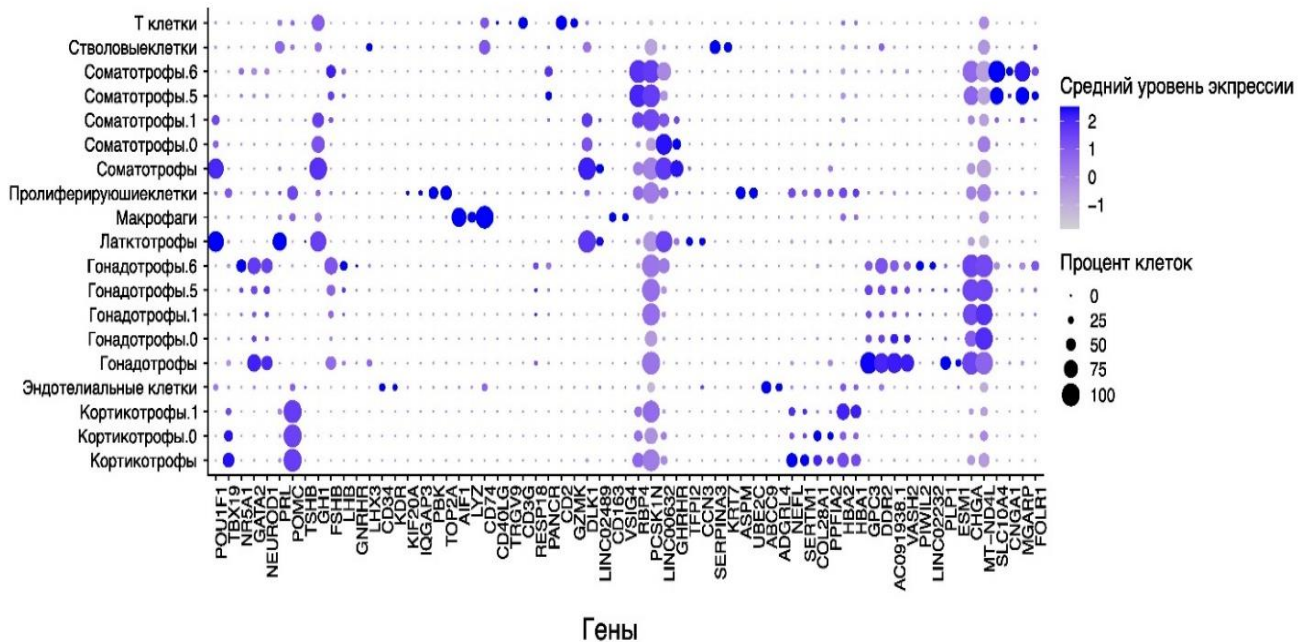
Затем была построена карта аннотации основных клеточных типов, на которой были выделены основные клеточные кластеры для каждого типа НЭОГ: гормон-секретирующие клетки гипофиза, стволовые клетки гипофиза, эндотелиальные клетки, пролиферирующие клетки и кластеры иммунных клеток (кластеры Т-клеток и макрофагов) (Рисунок 20 А). Экспрессия маркерных генов в

каждом типе клеток, идентифицированном в 4 типах НЭОГ, представлена на Рисунке 20 Б.

**А**



**Б**



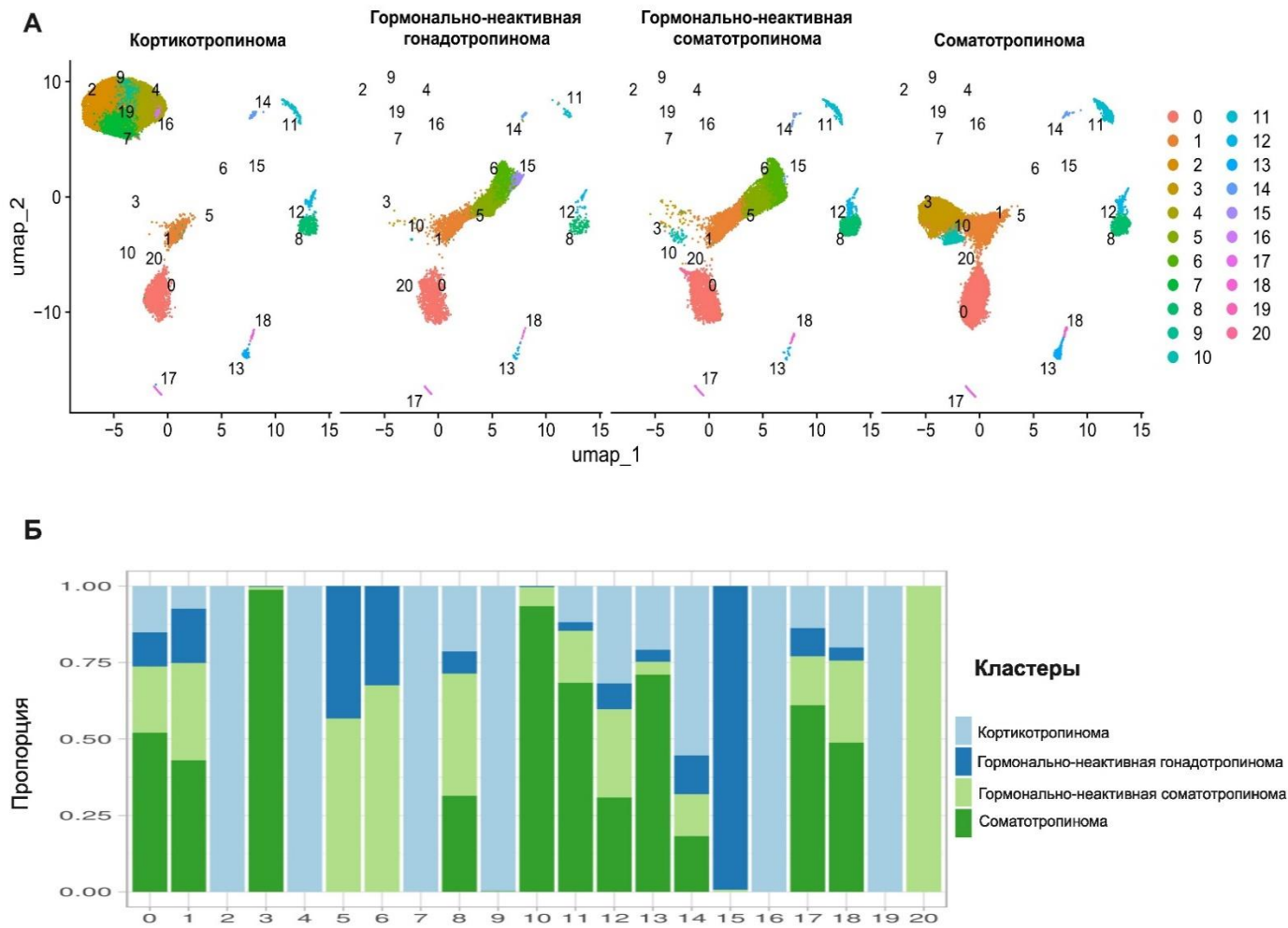
**Рисунок 20 – А. UMAP интеграции наборов данных клеток 10 НЭОГ. Б. Точечная диаграмма экспрессии маркерных генов в каждом типе клеток НЭОГ**

Гормон-секретирующие клетки гипофиза были изначально классифицированы на основе экспрессии классических маркерных генов, как описано в более ранних исследованиях [80, 81]: соматотрофы (*POU1F1*, *GH1*, *GHRHR*, *GH2*), кортикотрофы

(*POMC*, *TBX19*, *GAL*, *RAB3B*, *ASCL1*), гонадотрофы (*NR5A1*, *CGA*, *LHB*, *FSHB*, *TGFBR3L*, *CHGA*, *GNRHR*), лактотрофы (*POU1F1*, *PRL*, *DRD2*, *VGF*) и тиреотрофы (*POU1F1*, *TSHB*, *CGA*). Нами было отмечено, что гормон-секретирующие клетки в каждой опухоли представлены несколькими клеточными субпопуляциями. Например, гонадотрофы в образцах НГА были представлены субпопуляциями, обозначенными как Гонадотрофы.0, Гонадотрофы.1, Гонадотрофы.5 и Гонадотрофы.6 (Рисунок 20). Соматотрофы и кортикотрофы также имели отдельные субпопуляции в НСА, СА и КА (Рисунок 20). Присутствие данных субпопуляций в опухолях одного типа подчеркивает клеточную гетерогенность опухоли, которая может способствовать росту опухоли, ее инвазивности или устойчивости к лечению.

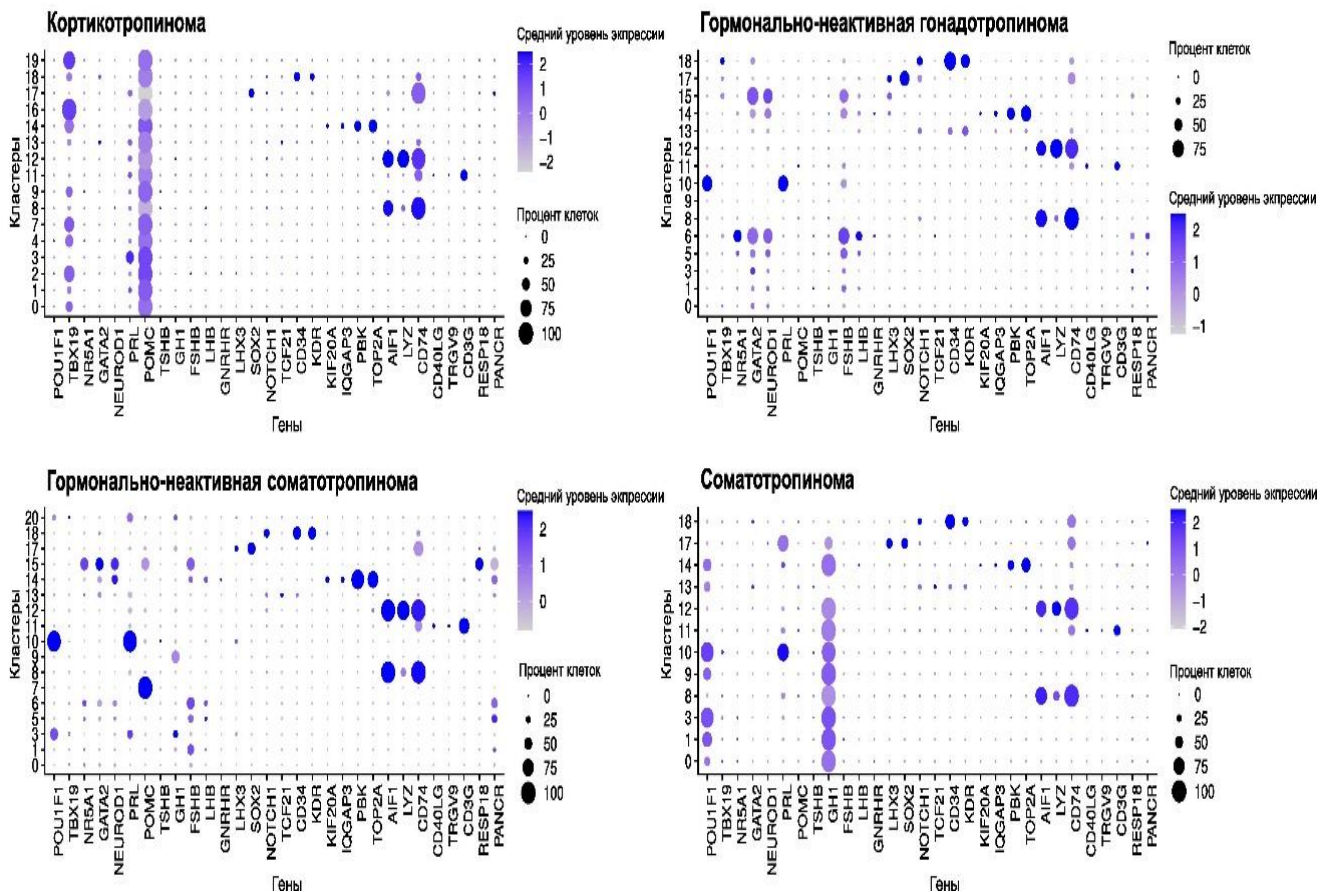
### **3.3.3. Обнаружение специфических клеточных кластеров для НСА и НГА**

С целью исследования гетерогенности и разнообразия опухолевых клеток в различных типах НЭОГ, мы проанализировали ДЭГ в данных опухолевых клетках. Проведенный анализ выявил 21 отдельный клеточный кластер в четырех типах НЭОГ (Рисунок 21). 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 ТФ и гормоны (PIT-1 – *GHI*, TPIT – *POMC* и SF1 – *GATA2/FSH/LH*, соответствующие СА/НСА, КА и НГА соответственно).



**Рисунок 21 – 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. **Б.** Соотношение основных клеточных кластеров в образцах НЭОГ

Полученные кластеры клеток были идентифицированы на основе профиля экспрессии генов основных гипофизарных ТФ и гормонов, а также экспрессии других маркерных генов для конкретных типов клеток, которые отличают их друг от друга (Рисунок 22).



**Рисунок 22** – Точечные диаграммы анализа дифференциальной экспрессии генов 21 кластера, обнаруженного в тканях НЭОГ. Показаны маркерные гены клеток гипофиза и других типов клеток

После этого мы определили ДЭГ в каждом кластере и идентифицировали клеточные типы, входящие в состав различных тканей НЭОГ, а также функции этих клеточных кластеров. В Приложении Б представлены 20 высокоэкспрессирующихся ДЭГ в каждом кластере. Анализируя высокоэкспрессирующиеся ДЭГ в кластерах, мы обнаружили, что клеточные кластеры отличаются по клеточному составу, функциям и роли в опухолевой ткани. В Таблице 4 представлена аннотация кластеров на основании анализа ДЭГ.

Ранее нами было отмечено, что НГА и НСА имеют схожие профили экспрессии генов (Рисунок 21 А, Б), 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* (Рисунок 10, Рисунок 22). Однако анализ ДЭГ выявил различия между этими кластерами. В кластере 6 наблюдалась более



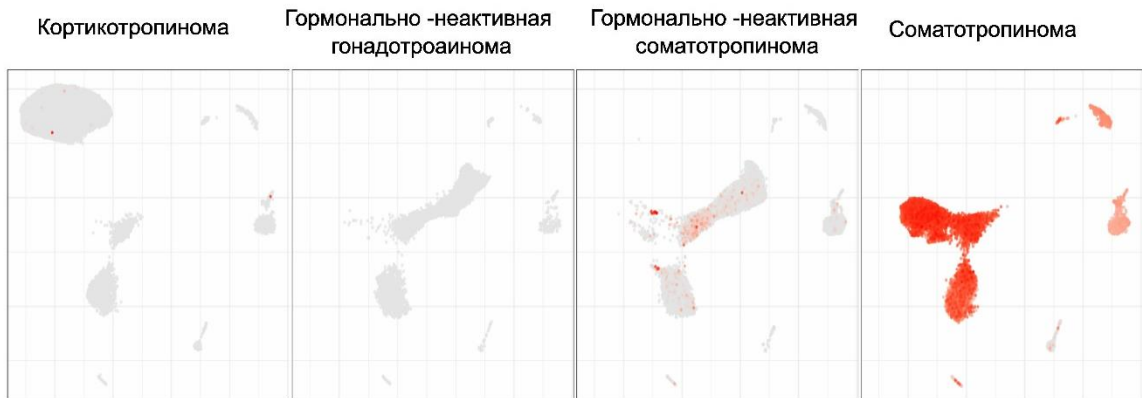
высокая экспрессия *NR5A1*, *FSHB* и *LHB* по сравнению с кластером 5. Кроме того, в кластере 5 отмечена повышенная экспрессия *NEUROD1*, маркера, связанного с промежуточным состоянием линий TPIT и SF1 [80, 81, 84], и *RESP18*, белка развития, участвующего в эмбриогенезе и регуляции кортикотрофов человека [135, 136]. Эти данные свидетельствуют о том, что гонадотрофы в кластере 5 менее дифференцированы по сравнению с гонадотрофами в кластере 6.

**Таблица 4** – Список основных генов, экспрессирующихся в каждом из аннотированных клеточных кластеров

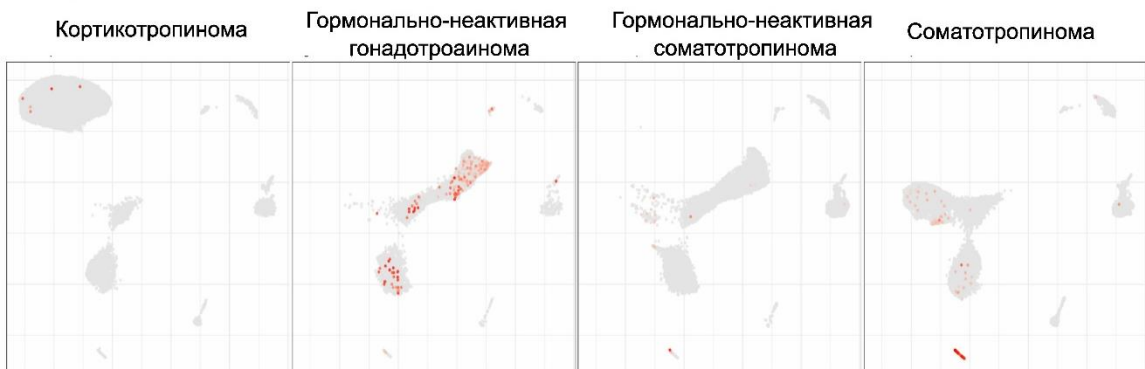
Номер кластера	Основные и маркерные экспрессируемые гены	Название кластера
0	Классические маркеры, специфичные для типа НЭОГ	Общие для гормон-секретирующих клеток
1	Классические маркеры, специфичные для типа НЭОГ	Общие для гормон-секретирующих клеток
2	<i>TBX19, POMC, SCTR, NEFL, BMP3, NDNF, PTTG1</i>	КА-специфический проопухолевый кластер
3	<i>POU1F1, GH</i>	Соматотрофы
4	<i>TBX19, POMC, CHRM2, EDN3, RSPO2, PCDH20</i>	КА-специфический проопухолевый кластер
5	<i>LHB, FSHB, NEUROD1, RESP18</i>	НГА-специфический кластер
6	<i>LHB, FSHB, NR5A1, MC3R</i>	НГА-специфический кластер
7	<i>TBX19, POMC, NPTX1, PCDH15, COL28A1, MINAR1</i>	КА-специфический противоопухолевый кластер
8	<i>LncRNA, AIF1, CD74</i>	Иммунные клетки
9	<i>TBX19, POMC, ALAS2, HBD, HBM, AHSP, HBA1/2, HBB</i>	Гемоглобин-экспрессирующий кластер кортикотрофов
10	<i>POU1F1, PRL</i>	Лактотрофы
11	<i>TRGV9, TRGV10, CD40LG, EOMES, IFNG, CD2</i>	Т-клетки
12	<i>CD74, HLA-DRA/DRB1, AIF1, TYROBP</i>	Иммунные клетки
13	<i>CD34, VEGFR2, HIGD1B, BGN, TDRD1, NOTCH3, DLX5</i>	Эндотелиальные клетки
14	<i>PBK, KIF20A, ASPM, CCNB2, HJUPR, CDC20, KIF23, MKI67, TOP2</i>	Пролиферирующие клетки
15	<i>SLR1, CGB7, ncRNA</i>	НГА-специфический кластер
16	<i>TBX19, POMC,</i>	КА-специфический кластер
17	<i>OCT4, SOX2, KLF4, NOTCH3, LHX3, CD44, c-MYC, NANOG,</i>	Стволовые клетки
18	<i>CD34, VEGFR2, ADGLR4, CLEC14A, Cdh5, MYCT1</i>	Эндотелиальные клетки
19	<i>TBX19, POMC, EP300, PMAIP1, MIF</i>	КА-специфический кластер
20	<i>CYP2C9, KCNQ1DN, WNK4, OR4K17, OR1J1, CLEC18B</i>	НСА-специфический кластер

Мы обнаружили, что *MC3R*, высоко экспрессирующийся в кластере 6, отсутствует во всех других кластерах, включая кластер 5. *MC3R* играет важную роль в регуляции веса, контроле аппетита, росте, половом созревании и циркадных ритмах [137]. Кроме того, только кластер 6 имел повышенную экспрессию *RERG-AS1* и *HMGA2-AS1*, что потенциально указывает на нарушения клеточной регуляции и может способствовать высокому потенциалу опухолевого роста [138, 139]. Интересно, что внутри этих кластеров были выявлены различия между образцами НСА и НГА. Например, ген *LHX3* экспрессировался только в кластерах 5 и 6 НГА (Рисунок 23).

### GN1



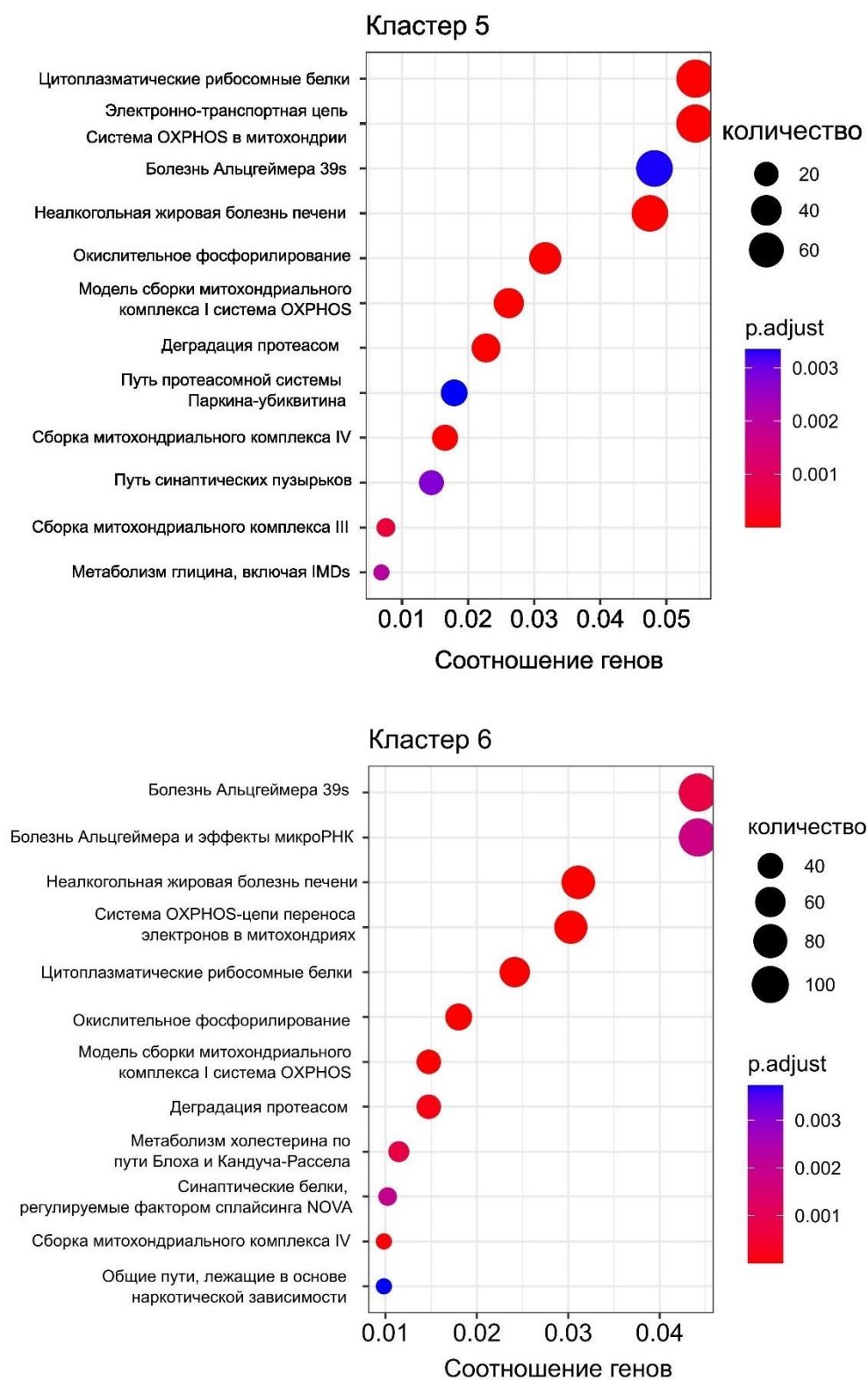
### LHX3



**Рисунок 23** – UMAP интеграции наборов данных клеток 10 НЭОГ. Дифференциальная экспрессия *GN* и *LHX3* в кластерах 5 и 6 опухолей НСА и НГА, соответственно

Более того, экспрессия *GN* была выше в кластерах 5 и 6 НСА по сравнению с аналогичными кластерами НГА, хотя все еще значительно ниже, чем экспрессия *GN* в кластерах СА (Рисунок 22). Анализ обогащенных генных путей (Pathway

enrichment analysis, PEA), также выявил различные сигнальные пути для кластеров 5 и 6 (Рисунок 24).

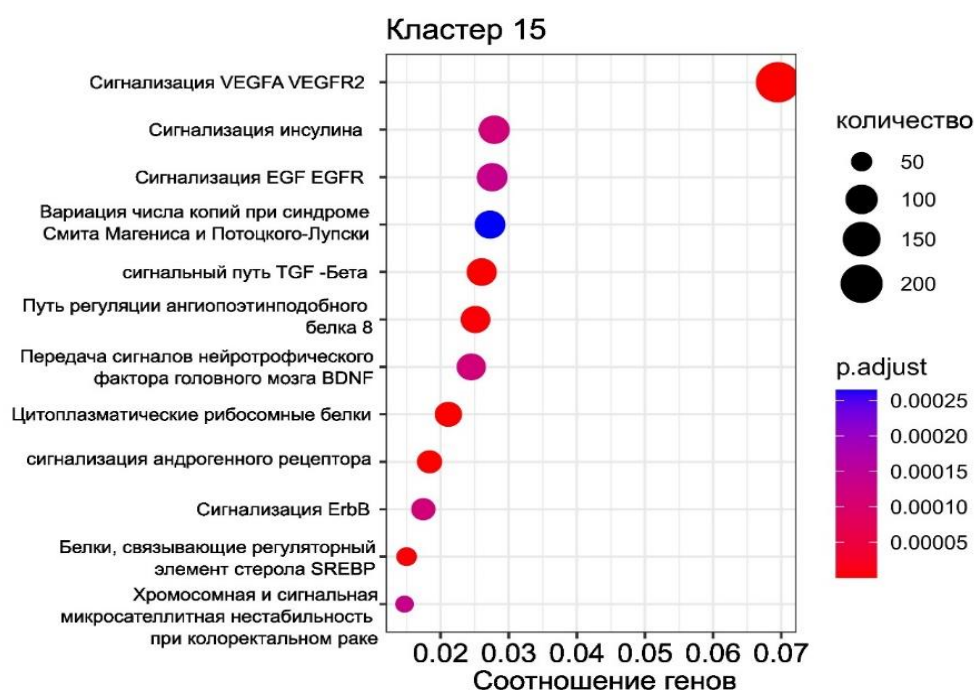


**Рисунок 24** – Активированные сигнальные пути в 5 и 6 НАГ-специфических кластерах. В обоих кластерах активирован путь деградации протеасомы.



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.

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 [140], и *CGB7*, ген кодирующий бета-субъединицу хорионического гонадотропина [141]. В кластере 15 также было отмечено высокое соотношение не кодирующих 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 [142] и модуляцию микроокружения развивающейся опухоли, в частности, через активацию деления фибробластов [143] (Рисунок 25).



**Рисунок 25** – Активированные сигнальные пути в специфичном кластере 15 для НГА

Дополнительные отличия между НСА и НГА были найдены в 3 клеточном кластере (Рисунок 21), который состоял из гормон-секретирующих клеток, в

частности, соматотрофов, о чем говорит высокий уровень экспрессии генов *POU1F1* и *GH* в этом кластере (Рисунок 22). Этот кластер также встречается в СА, но имеет большее количество клеток, чем представлено в кластерах НСА. Низкое количество клеток соматотрофов в НСА может быть обусловлено проблемами, возникшими на этапе хирургического вмешательства или низким качеством клеток соматотрофной опухоли, изначально полученных из послеоперационного материала. Оба образца НСА и СА также имели общий кластер 10, который представляет лактотрофы, экспрессирующие *POU1F1* и *PRL* (Рисунок 22). Повышенная экспрессия *PRL* в этих клетках, и высокий уровень пролактина в крови (Таблица 3) проявляется гиперпролактинемией, что не является результатом лактотрофной аденомы, а следствием блокирования гипофизарных дофаминовых путей (феномен стебельчатого участка опухоли), что было описано ранее [144–146].

Между кластерами НСА и СА были отмечены не только сходства, но также выявлен уникальный кластер, специфичный для НСА, – кластер 20 (Рисунок 21). Этот кластер отсутствует в образцах СА. Обнаружено, что в этом кластере активирован сигнальный путь ядерных рецепторов, а большинство транскриптов данного кластера представляют нкРНК или транскрипты неизвестной природы. Кроме того, в данном кластере наблюдалась высокая экспрессия генов *CYP2C9*, *KCNQ1DN*, *WNK4*, *OR4K17*, *OR1J1*, *CLEC18B*. На основании полученных результатов можно предположить, что данный кластер представляет клеточную популяцию, подвергшуюся метаболическому перепрограммированию.

### **3.3.4. Обнаружение специфических клеточных кластеров СА**

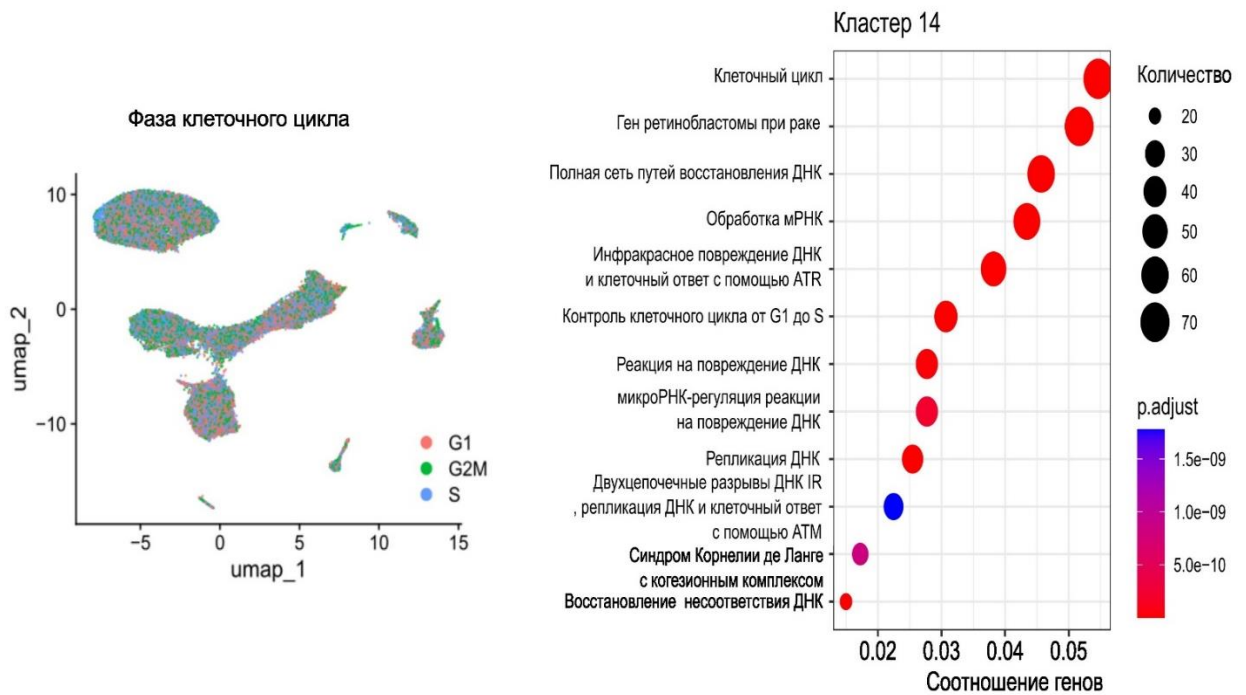
Нами были аннотированы специфические 2, 4, 7, 9, 16 и 19 кластеры в образцах КА (Рисунок 21). И хотя все эти кластеры экспрессируют *TBX19* и *POMC* (Рисунок 22), они имеют разные ДЭГ и отличаются по своим молекулярным функциям и типу регуляции, что свидетельствует о внутриопухолевой гетерогенности образцов. Кластеры 2 и 4 предположительно являются проопухолевыми, поскольку ДЭГ представляют собой гены рецепторов и белков

развития, такие как *SCTR*, *NEFL*, *BMP3* и *NDNF* в кластере 2 и гены *CHRM2*, *EDN3*, *RSPO2* и *PCDH20* в кластере 4. В кластере 2 также был отмечен высокий уровень экспрессии *PTTG1* – известного гена трансформации опухоли гипофиза, играющего роль в пролиферации клеток [147] и являющегося маркером агрессивности опухоли [84].

Кластер 7, напротив, был выделен как противоопухолевый, поскольку его ДЭГ играют роль в апоптозе (*NPTX1*) и дегенерации (*CTSE*), клеточной адгезии (*PCDH15* и *COL28A1*) и негативной регуляции клеточного роста и ангиогенеза (*MINAR1*). Еще одним обнаруженным кластером был кластер 9, в котором наблюдалась повышенная экспрессия глобиновых генов гемоглобина (*ALAS2*, *HBD*, *HBM*, *AHSP*, *HBA1/2*, *HBB* и другие). Два других СА-специфических кластера (16 и 19) были обогащены неизвестными нкРНК-транскриптами. В кластере 19 мы обнаружили значительное повышение экспрессии генов *EP300* и *PMAIP1*, а также высокую экспрессию *PMAIP1* и *MIF*. В ходе нашего исследования единичных клеток СА нами была выявлена высокая степень гетерогенности в популяции кортикотрофных клеток.

### **3.3.5. Обнаружение кластеров пролиферирующих и стволовых клеток в различных типах НЭОГ**

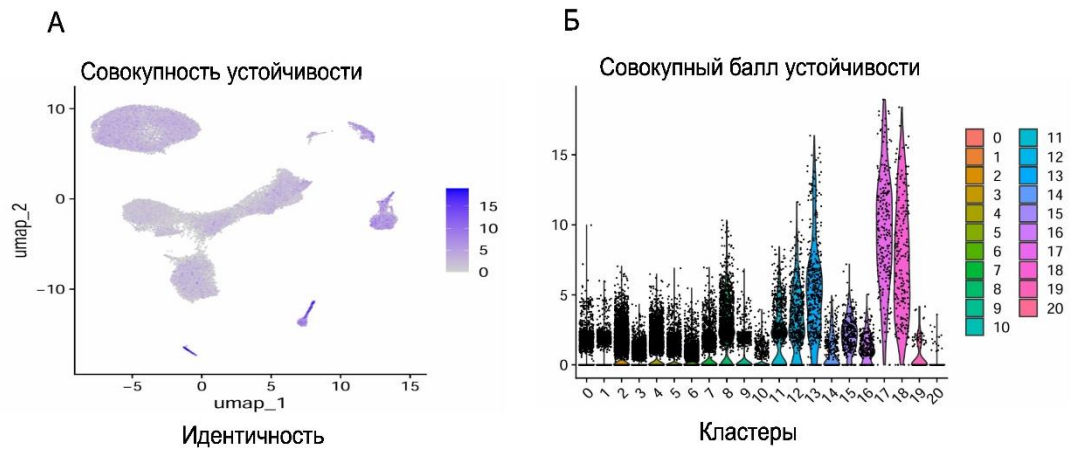
Пролиферирующие клетки НЭОГ ранее были описаны как небольшая часть опухолевых клеток [79] с высоким пролиферативным потенциалом [84] и агрессивным поведением, что позволяет предположить, что эти пролиферативные клетки способствуют злокачественному перерождению НЭОГ [79]. В исследуемых образцах нам удалось выделить кластер пролиферирующих клеток (кластер 14) (Рисунок 21), общий для всех типов НЭОГ. В этом кластере мы обнаружили активацию путей клеточного цикла (Рисунок 26). Анализ фаз клеточного цикла также показал, что клетки находятся в активных G2/M и S фазах, что свидетельствует о высоком пролиферативном потенциале этих клеток [148] (Рисунок 26).



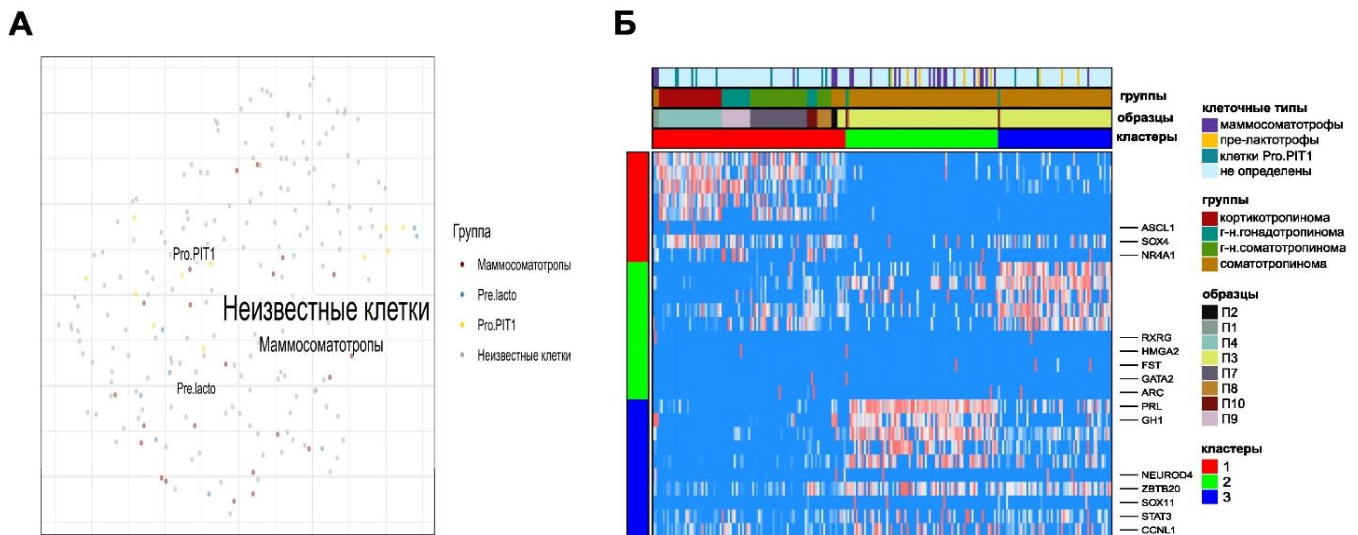
**Рисунок 26 – А.** Распределение фаз клеточного цикла в 10 образцах НЭОГ.  
**Б.** Сигнальные пути, характерные для 14 кластера пролиферирующих клеток

Одним из наиболее экспрессируемых генов в этом кластере являлся *PBK*, который также был идентифицирован в недавнем исследовании scRNA-seq [84] как новый маркер, который при повышенной экспрессии может стимулировать пролиферацию клеток НЭОГ и их способность к миграции, что коррелировало с плохим прогнозом для пациентов.

Стволовые клетки были определены на основании экспрессии стандартных маркеров: *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *NOTCH3*, *LHX3*, *CD44*, *c-MYC* и *NANOG*, а также кумулятивного показателя стволовости (Рисунок 27). В нашем исследовании кластер 17 (Рисунок 21) во всех типах НЭОГ был идентифицирован как кластер стволовых клеток, поскольку именно в этом кластере была обнаружена наиболее высокая экспрессия маркеров стволовых клеток. В кластере стволовых клеток нам удалось идентифицировать такие прогениторные клетки, как маммосоматотрофы, Pro.Pit1 и Pre.lacto (Рисунок 28А), которые были описаны в более ранних исследованиях [4, 45, 80, 81].



**Рисунок 27** – Идентификация кластера стволовых клеток в образцах НЭОГ. **А.** Кумулятивная экспрессия Stemness score в различных кластерах. **Б.** Экспрессия маркеров стволовых клеток в различных кластерах



**Рисунок 28** – Идентификация прогениторных клеток в скоплениях стволовых клеток. **А.** UMAP интеграция прогениторных клеток НЭОГ: маммосоматотрофы, Pre.Lacto и Pro.Pit1. **Б.** Тепловая карта экспрессии генов в идентифицированных прогениторных клетках

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 (Рисунок 28 Б). Примечательно, что в стволовых клетках НГА мы не обнаружили кластера прогениторных клеток.

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

В большинстве случаях НЭОГ являются доброкачественными новообразованиями и обычно демонстрируют меньшее количество CNV по сравнению с более агрессивными раковыми опухолями.

Для того чтобы выявить межопухолевую генетическую гетерогенность в наших образцах мы провели анализ CNV с помощью метода Numbat.

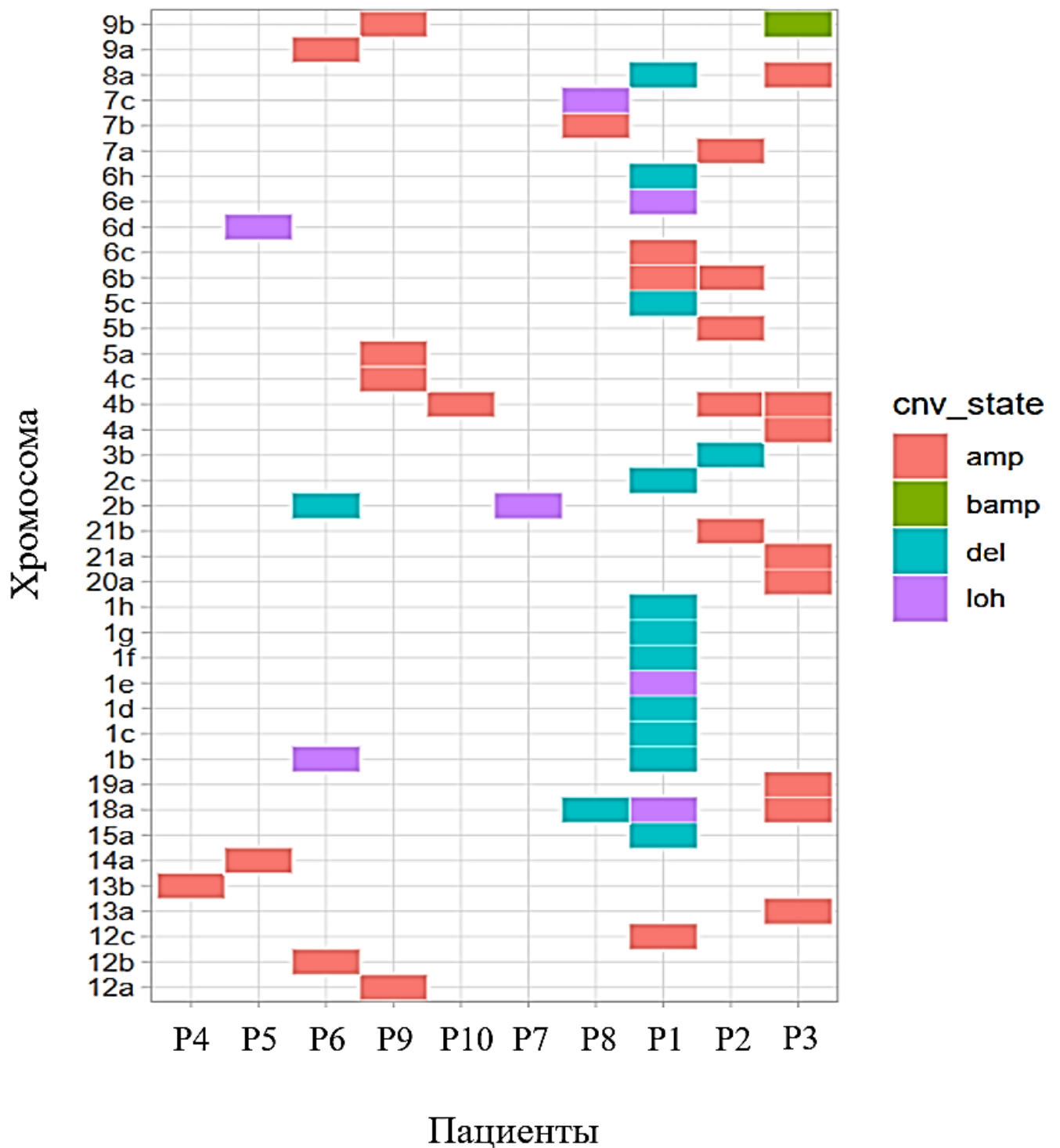
В каждом образце был идентифицирован как минимум один тип CNV. Мы обнаружили варианты амплификации (amp) в 90%, делеции (del) – в 40%, потери гетерозиготности (loh) – в 50% и биаллельную амплификацию (bamp) – в 10% исследованных образцов НЭОГ.

Наибольшее количество событий CNV мы обнаружили в образцах СА (Рисунок 29), что коррелирует с результатами другого scRNA-seq исследования различных типов НЭОГ, в котором было обнаружено наибольшее количество CNV в ацидофильной линии POU1F1 [79].

Наиболее распространенным типом CNV являлись amp (16 событий в СА, 5 событий в НГА, 4 события в КА и 1 событие в НСА), за ним следует del с 12 событиями в СА и по 1 событию в НСА и КА.

Мы обнаружили 2 области генома с наибольшим количеством CNV: 4b (2 amp в СА и 1 amp в НГА) и 18a (1 amp и 1 loh в СА, 1 del в КА). Тип CNV amp в области 6b был отмечен в двух из трех образцов СА.

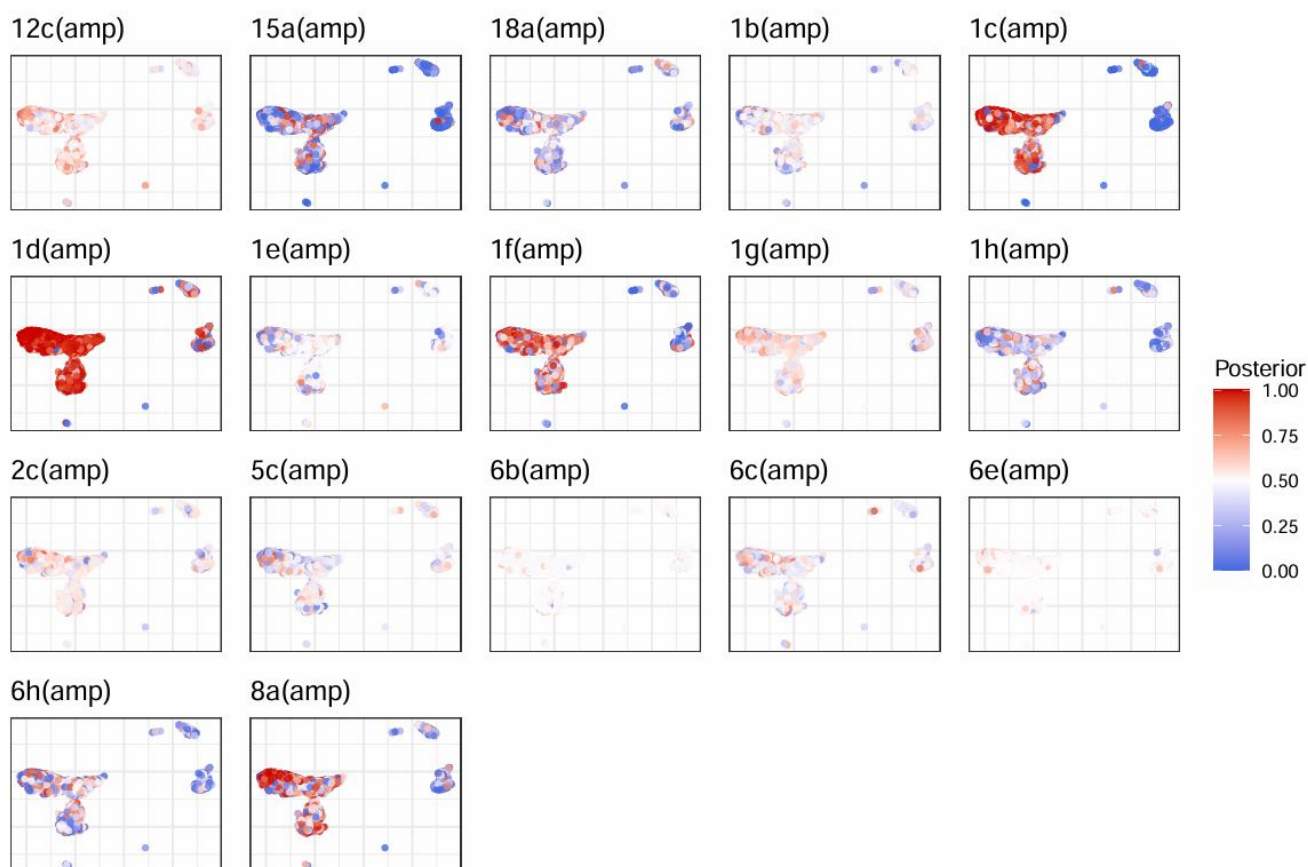
Интересно, что в НСА количество CNV было намного ниже, чем в СА, хотя оба подтипа опухоли относятся к линии POU1F1. Это указывает на разную степень гетерогенности для двух подтипов опухолей и позволяет предположить механизмы перестройки генома, не зависящие от типа опухолевых клеток.



**Рисунок 29** – CNV события в гормонально-активных и неактивных аденомах гипофиза. Ось X представляет набор пациентов

В результате анализа была выявлена значительная гетерогенность клеточных геномных вариаций для НЭОГ. Различные типы CNV были выявлены в разных частях хромосом и в различных клеточных кластерах в каждом образце опухоли. Пример показан на Рисунке 30.



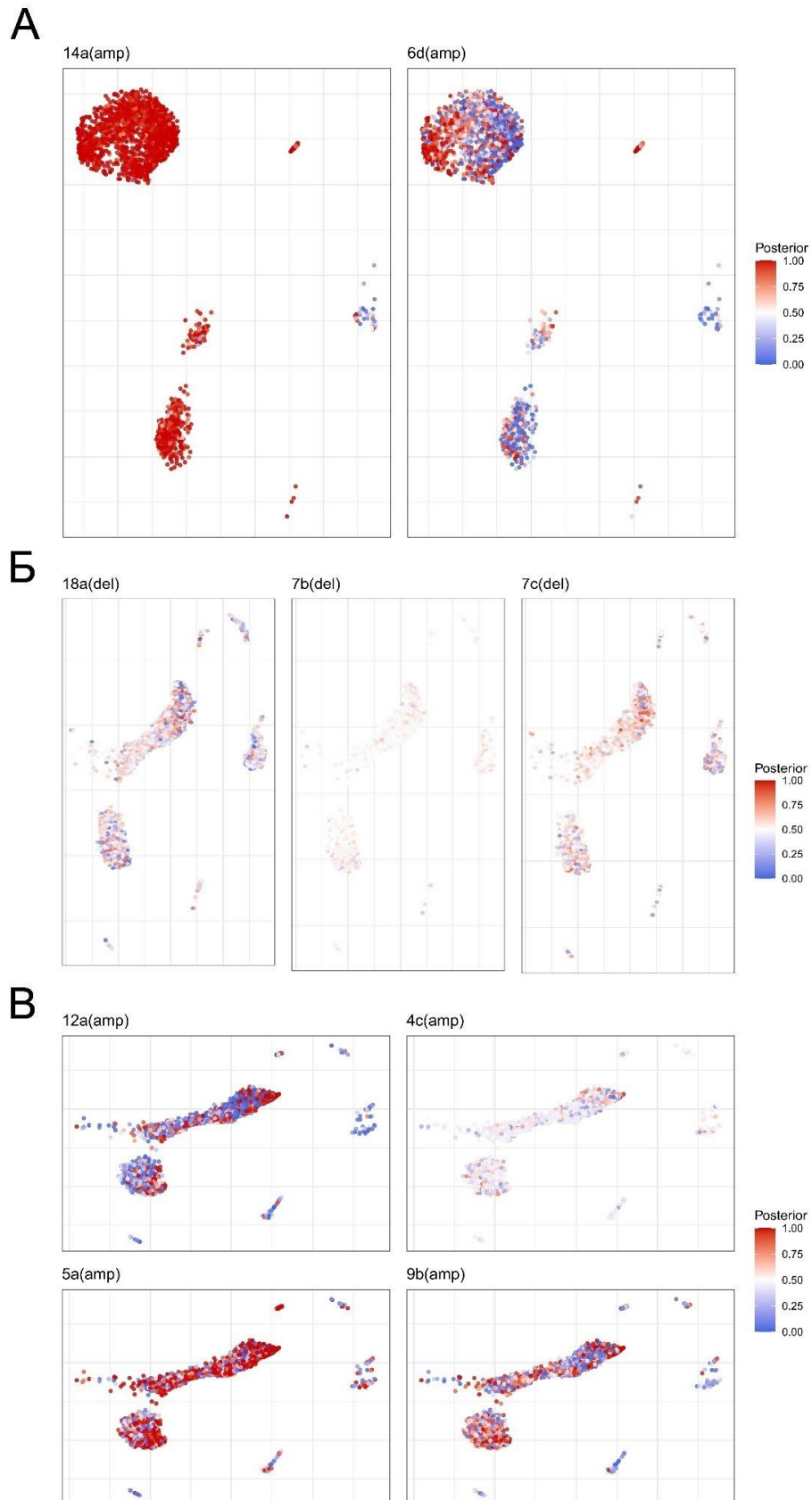


**Рисунок 30** – UMAP с аннотацией результатов анализа CNV, демонстрирующий различные события перестройки генома в разных кластерах клеток. Наибольшая генная перестройка отмечается в кластере 3 (см. Рисунок 21).

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.

В одном образце КА мы обнаружили повышенную частоту событий амплификаций в кластерах 2, 17, 19 (Рисунок 31), в то время как в других опухолях, НГА (Рисунок 31 Б) и НСА (Рисунок 31 В), четких кластер-специфических перестроек не было выявлено.



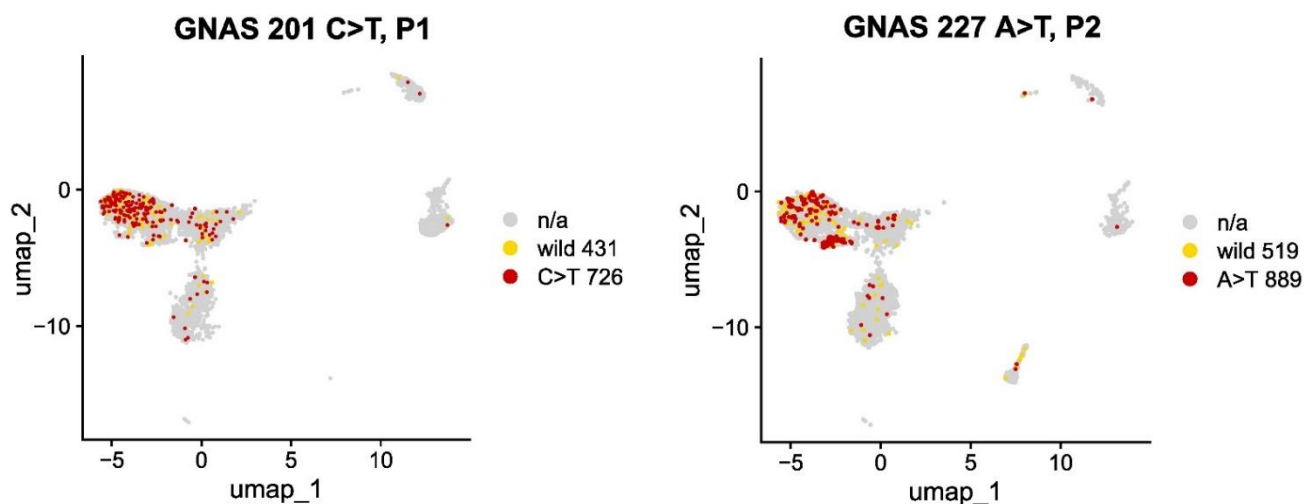


**Рисунок 31 – А.** UMAP с маркировкой CNV профиля образца кортикотропином (КА) КА. CNV профиль демонстрирует высокое количество геномных перестроек в кластерах 2, 17, 1 и 9. НСА и НГА (**Б** и **В**, соответственно) не было обнаружено CNV перестроек, специфичных для кластеров неактивных НЭОГ

### 3.5. 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 32. Наблюдались две различные мутации: замена С>Т в одном образце и замена А>Т 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.



**Рисунок 32** – UMAP вариантов патогенных мутаций в гене *GNAS* в образцах СА: 201А>Т и 227А>Т. Обе мутации локализованы преимущественно в клеточном кластере 3

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.

## Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе описана адаптированная методика диссоциации ACME HS для выделения единичных клеток из свежемороженых тканей НЭОГ и ФХЦ. Поскольку проведение секвенирования единичных клеток для свежих послеоперационных тканей часто представляется невозможным, использование свежемороженых тканей является ценной альтернативой. Метод ACME HS сочетает в себе диссоциацию на основе уксусной кислоты и фиксацию метанолом, позволяя сохранять интактными транскрипционные профили клеток. Метод ACME HS снижает число артефактов в транскриптоме, и сохраняет исходный клеточный состав тканей. Кроме того, ACME HS позволяет получать единичные клетки из замороженных образцов с сохраненной цитоплазмой, в отличие от методов ядерной экстракции, где цитоплазматическая мРНК, носящая важную информацию, является утраченной.

Представленная методика особенно эффективна для получения клеточных суспензий из сложных для диссоциации тканей, богатых липидами или содержащих фиброзы, которые плохо поддаются ферментативной диссоциации. Используя методы ACME HS, ферментативной диссоциации и метод выделения ядер, мы успешно изолировали 136,225 клеток из 24 нейроэндокринных новообразований, включая опухоли надпочечника и гипофиза.

При помощи проточной цитометрии мы смогли доказать, что при использовании метода ACME HS получается достаточное количество единичных клеток, а стандартные диаграммы распределения ДНК и определение фаз клеточного цикла подтверждают эффективность данного метода. Наличие дебриса, обычно характерного для апоптоза (sub-G1), может быть связано с этапами замораживания-размораживания образцов как в ферментативном, так и в ACME HS протоколах и не влияет на полученные результаты. Полученные данные сопоставимы с результатами исследования метода ACME, проведенного García-Castro и соавт. [149], которое показало, что, несмотря на большое количество дебриса метод ACME позволяет исследовать разнообразие типов клеток в различных тканях.

Изучив распределение маркеров ответа на клеточный стресс для различных методов диссоциации, мы пришли к выводу, что метод диссоциации ACME HS не имеет явных преимуществ в сравнении с методом выделения ядер. Однако, он представляется эффективным вариантом, когда ферментативная диссоциация свежих тканей невозможна, особенно учитывая, что метод ACME HS позволяет исследовать цитоплазматическую мРНК единственно возможным наилучшим способом.

Мы применили метод scRNA-seq для изучения транскриптомного профиля 4 различных типов НЭОГ, проанализировав 3 КА, 3 СА, 2 НСА и 2 НГА. Различные типы НЭОГ были ранее описаны методом scRNA-seq [3–5, 80–83, 102, 150]. Однако, мы впервые использовали данный метод в исследовании НСА, сравнив их с СА. Во всех наших образцах мы получили достаточное количество клеток высокого качества, что позволяет преодолеть ограничение, связанное с недостаточным количеством исходного материала для scRNA-seq исследований НЭОГ, отмеченное в некоторых работах [79].

Анализ scRNA-seq показал, что неактивные формы аденом гипофиза сходны по общему транскриптомному профилю. С другой стороны, функциональные (гормонально-активные) аденомы гипофиза продемонстрировали существенно отличающиеся транскриптомные профили. Некоторые из общих характеристик неактивных форм аденом гипофиза были описаны ранее. Например, считается, что НАГ более агрессивны, чем гормон-секретирующие аденомы гипофиза, с большей частотой рецидивов [51]. Было показано, что НАГ, в частности НКА и НСА, могут эволюционировать в функциональные аденомы гипофиза [151–153]. Кроме того, НАГ характеризуются снижением активности регуляции генов и путей, связанных с секрецией гормонов [45], и характером метилирования некоторых генов, таких как ингибитор циклин-зависимой киназы 2A (*CDKN2A*, или *P16*) [154].

Во всех образцах НЭОГ была выявлена экспрессия хотя бы одного из основных специфических факторов транскрипции клеточных линий гипофиза. Мы определили основные типы клеток во всех исследованных образцах, причем соотношение этих типов клеток в разных образцах было различным, как было

описано ранее [102]. Полученные нами результаты свидетельствуют как об общих, так и об уникальных особенностях типов НЭОГ, подчеркивая разнообразие и гетерогенную структуру ткани НЭОГ.

Выявление специфических для НАГ кластеров 5 и 6 в НСА и НГА, отсутствующих в КА и СА, подчеркивает уникальную биологию этих молчащих подвидов НЭОГ. Кластер 6 связан с более высокой дифференцировкой (*NR5A1*, *MC3R*), в то время как кластер 5 представляет клетки, находящиеся в промежуточном состоянии дифференцировки (*NEUROD1*, *RESP18*), что согласуется с моделью траектории развития, предложенной ранее [80, 135, 136]. Общие кластеры имеют тонкие различия, такие как экспрессия *LHX3* в НСА и более высокая экспрессия *GH* в НСА, что отражает их различную молекулярную идентичность. Уникальные кластеры, такие как специфический для НСА кластер 15 имеют высокий уровень экспрессии, ангиогенных и метастатических путей (*SLR1*, *CGB7*), что указывает на агрессивность и потенциальную роль в инициации опухоли [80]. Кластеры, секретирующие гормоны (например, соматотрофы, кластер 3; лактотрофы, кластер 10), подчеркивают разнообразие опухолей, при этом в НСА соматотрофы представлены меньше, возможно, из-за факторов отбора проб или качества ткани/клеток [155]. Гиперпролактинемия при НСА и СА согласуется с феноменом «масс-эффекта» на стебель гипофиза [144–146]. Обнаружение специфического для НСА кластера 20, богатого некодирующими РНК, указывает на наличие популяции недифференцированных клеток, потенциально имеющих отношение к развитию опухоли. Полученные результаты дают представление о подтипах НЭОГ, молекулярных механизмах и потенциальных терапевтических мишенях.

Выделение специфических для КА кластеров (2, 4, 7, 9, 16 и 19) подчеркивает внутриопухолевую гетерогенность кортикотропином. Хотя все кластеры имеют общие маркеры *TBX19* и *POMC* кортикотрофной линии, их различные профили экспрессии генов указывают на существенное функциональное разнообразие. Кластеры 2 и 4 являются проопухолевыми, с ДЭГ, связанными с пролиферацией и агрессивностью, включая ген *PTTG1* в кластере 2, известный маркер агрессивности

аденом гипофиза [3, 147]. Напротив, кластер 7 играет противоопухолевую роль, в нем присутствуют ДЭГ, связанные с апоптозом (*NPTX1*, *CTSE*) [156, 157], адгезией (*PCDH15*, *COL28A1*) [158, 159], и ингибированием роста (*MINARI*) [160]. Эта про- и противоопухолевая двойственность отражает сложный регуляторный ландшафт, присущий кортикотропиномам. Кластер 9, экспрессирующий глобиновые гены гемоглобина (*HBA*, *HBB*), может указывать на их новую роль в физиологии мозга и нейродегенеративных процессах, что согласуется с предыдущими количественными ПЦР-исследованиями мозга человека и крыс [161]. При этом, сигнальные пути, связанные с гипоксией не являются активированными в клетках 9-го кластера. Кластеры 16 и 19, обогащенные некодирующими РНК и экспрессирующие *PMAIP1*, предполагают апоптотическую активность [162–165]. Однако, наблюдаемое повышение уровня экспрессии гена *EP300* [166–168] в тех же кластерах и деградация транскрипта *PMAIP1* через белок Noxa, как показано в исследовании 2022 года [102], может способствовать уклонению от процесса апоптоза в аденомах при болезни Иценко – Кушинга. Эти данные в совокупности свидетельствуют о высокой степени гетерогенности образцов КА, в которых определяются про- и антиопухолевые и потенциальные апоптотические кластеры.

Наш анализ выявил две ключевые клеточные популяции в НЭОГ – пролиферирующие клетки (кластер 14) и стволовые клетки (кластер 17) – подчеркивая динамическое взаимодействие между пролиферацией и стволовыми клетками. Проллиферирующие клетки, которые ранее связывали с инициацией опухоли и которые чаще встречаются в образцах рецидивирующей болезни Иценко – Кушинга [82, 102] демонстрировали высокую экспрессию генов, связанных с клеточным циклом (*PBK*, *MKI67*, *TOP2*), что указывает на их высокий потенциал агрессивного роста. *PBK* связан с пролиферацией, миграцией и плохим прогнозом. Интересно, что данные пролиферирующие клетки которые экспрессируют различные транскрипционные факторы и гормоны являются специфичными для подтипа НЭОГ. Стволовые клетки (кластер 17) экспрессировали эпителиальные регуляторные маркеры (*BPIFA1*, *SCGB1A1*, *MUC16*), что указывает на смешанный фенотип [80, 169–173]. Их присутствие во

всех типах НЭОГ согласуется с предыдущими результатами исследований гипофизов плода и взрослого человека, указывающих на их участие в развитии и опухолевом генезе. Этот кластер также включал популяции предшественников, такие как маммосоматотрофы и другие клетки PIT1-линии, что указывает на роль в дифференцировке клеток и поддержании линии.

Анализ scRNA-seq позволил изучить микроокружение НЭОГ и выявить два эндотелиальных кластера с различными ролями. Кластер 13, экспрессирующий гены, связанные с опухолевой прогрессией и ЭМП (*HIGD1B*, *BGN*, *NOTCH3*, *TCF21*), вероятно, опосредует взаимодействие опухоли со стромой и процесс метастазирования. Кластер 18, обогащенный генами, связанными с ангиогенезом (*ADGRL4*, *CLEC14A*) и *MYCT1*, поддерживает рост и васкуляризацию опухоли. [174, 175].

НЭОГ, как правило, являются доброкачественными опухолями, и их геномные особенности отражают относительно небольшое количество крупномасштабных хромосомных перестроек по сравнению со злокачественными опухолями, такими как глиобластомы или меланомы. Они часто диплоидны или почти-диплоидны (near-diploid), и их бремя CNV может быть ниже, чем в более агрессивных раковых опухолях. Поэтому для обнаружения CNV в данных НЭОГ scRNA-seq может потребоваться высокая глубина секвенирования и надежные вычислительные инструменты. Точное определение CNV по данным scRNA-seq является сложной задачей, поскольку экспрессия РНК зачастую не связана напрямую с изменениями ДНК. Вычислительные инструменты часто используют изменения в совокупной экспрессии генов в геномных регионах [176–178]. Гетерогенность опухоли может быть представлена как внутриопухолевая (intra-tumor) или межопухолевая (inter-tumor) гетерогенность, основанная на транскриптомных и генетических вариациях в опухолевых клетках. Не исключение и НЭОГ, особенности меж- и внутриопухолевой гетерогенности выявляются в различных исследованиях, причем использование метода scRNA-seq значительно упрощает исследование этой гетерогенности [3, 4, 79].

В наших образцах мы обнаружили наибольшее количество CNV-событий в СА, что согласуется с результатами предыдущих исследований, показавших наибольшее количество CNV в ацидофильной линии клеток гипофиза [79] и особенно в лактотрофах [178]. Примечательно, что наиболее распространенным состоянием CNV среди различных типов НЭОГ является геномная амплификация, за которой следуют геномные делеции. На примере СА мы показали, что в кластере 3 заметно больше событий амплификации в хромосомных участках 15a, 1c, 1d и 1f по сравнению с другими кластерами, что свидетельствует о потенциальной роли этого кластера в прогрессии опухоли. Мутация *GNAS* является ключевым фактором в изучении НЭОГ, особенно СА. Мы обнаружили 2 типа мутаций *GNAS* в 2 СА из 3: 201 C>T и редкую мутацию 227 A>T. Обе мутации нарушают нормальный цикл ГТФазы  $Gs\alpha$ , фиксируя ее во включенном состоянии и вызывая чрезмерную активацию цАМФ-зависимых путей [179]. Мы определили кластеры клеток, в которых происходили мутации *GNAS*. Эти мутации происходили в основном в кластере 3, и в очень меньшей степени в соматотрофах, расположенных в кластерах 0 и 1, которые являются общими для всех типов НЭОГ, и демонстрируют специфический для типа профиль экспрессии. Это еще раз подтверждает роль кластера 3 в опухолевом генезе.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

НЭОГ – это разнообразная группа, как правило, доброкачественных опухолей, возникающих из клеток гипофиза и играющих центральную роль в регуляции эндокринных функций. Эти опухоли очень гетерогенны и значительно различаются по своей гормональной активности и клинической картине. Некоторые НЭОГ являются гормонально-неактивными и бессимптомными, в то время как другие гормонально активны, что приводит к таким патологиям, как синдром Иценко – Кушинга, акромегалия или гиперпролактинемия. Разнообразные клинические особенности и возможность агрессивного роста или рецидивирования некоторых НЭОГ делают их изучение крайне важным для разработки стратегии терапии.

Понимание молекулярных основ этих опухолей необходимо для изучения механизмов, обуславливающих их гетерогенность. В отличие от других традиционных транскриптомных методов, scRNA-seq позволяет исследовать опухоль на уровне единичных клеток, выявляя разнообразные клеточные популяции внутри опухоли и ее микроокружения. Такой подход с высоким разрешением помогает выявить различные профили экспрессии генов, изучить пластичность опухолевых клеток и раскрыть взаимодействие с окружающими стромальными и иммунными клетками. scRNA-seq позволяет выявить новые биомаркеры, улучшить классификацию подтипов НЭОГ и разработать целевые терапевтические стратегии для более эффективного лечения этих сложных и клинически изменчивых опухолей.

Существующие методы диссоциации солидных тканей в исследованиях scRNA-seq не гарантируют выделение неповрежденных единичных клеток, особенно в чувствительных и сложных эндокринных тканях человека. Большинство исследований полагаются на ферментативную диссоциацию свежих образцов или выделение ядер из замороженных образцов. Выделение целых интактных клеток из свежемороженых образцов, обычно собираемых в биобанках, остается сложной задачей.

В нашем оптимизированном методе диссоциации ACME HS мы объединили диссоциацию на основе уксусной кислоты и фиксацию на основе метанола для получения транскрипционных профилей отдельных клеток из свежемороженых образцов тканей. Мы наглядно продемонстрировали, что scRNA-профилирование цельноклеточных суспензий, полученных с помощью ACME HS и ферментативных методов, значительно превосходит snRNA-профилирование в плане анализа экспрессии маркерных генов и опухолевого генеза, демонстрируя при этом промежуточные сопоставимые показатели в большинстве проведенных анализов. Кроме того, модифицированный протокол ACME HS так же позволяет успешно криоконсервировать диссоциированные/фиксированные клетки без ущерба для выхода и целостности мРНК. Насколько нам известно, это первое исследование об успешном применении техники ACME HS для тканей человека, и мы считаем, что этот протокол должен значительно продвинуть исследования РНК единичных опухолевых клеток человека.

В нашей работе мы подробно проанализировали транскриптомы 10 образцов активных и неактивных НЭОГ разных типов методом scRNA-seq. Мы показали, что транскрипционный профиль неактивной формы НЭОГ сходен и ближе друг к другу, чем сходство между неактивной и ее аналогом активной формой той же опухоли, что свидетельствует о внутри-опухолевой гетерогенности НЭОГ. Это было продемонстрировано при сравнении неактивной и активной форм СА и указывает на общие регуляторные механизмы, лежащие в основе неактивной клинической картины этих опухолей.

Проведя более глубокий анализ транскриптомов НЭОГ, мы выявили кластеры клеток, которые являются общими для различных типов НЭОГ. Мы также выявили уникальные клеточные кластеры с разным составом и функциями, специфичными для разных типов НЭОГ.

Клеточные кластеры, обогащенные протеасомными путями деградации белков недифференцированных гонадотрофов, встречаются только в двух формах неактивных НЭОГ (НГА и НСА). В частности, эти данные о НСА коррелируют с предыдущими предположениями о том, что НСА являются источником всех НАГ.

В в этих кластерах обнаружен дифференциальный профиль экспрессии для разных типов НЭОГ. В нашей работе мы предположили, что НГА-специфичный клеточный кластер 15 и НСА-специфичный клеточный кластер 20 являются кластерами инициализации опухоли на основании экспрессии генов, связанных с опухолеобразованием, или обогащенных сигнальных путей, обнаруженных в этих кластерах. В клеточной популяции кортикотрофных клеток были выявлены противоопухолевые и проопухолевые кластеры на основании наибольшего количества дифференциально экспрессируемых генов в этих кластерах.

Кроме того, был определен кластер клеток, экспрессирующих гены гемоглобина, что может быть связано с условиями гипоксии в опухолевых тканях, как предполагали предыдущие исследования (Richter F. et al., 2009) на мозге мышей и крыс. Подобное описание гетерогенной структуры КА ранее не приводилось. Кроме того, мы выделили кластеры пролиферирующих клеток на основе их генов и путей. В кластерах стволовых клеток мы определили прогениторные клетки, такие как маммосоматотрофы, Pro.Pit1 и Pre. Lacto, которые были более многочисленны в образцах СА.

Мы также изучили события перестройки генома в различных образцах НЭОГ и обнаружили, что наибольшее соотношение наблюдается в СА (66,6% случаев перестроек генома, которые были обнаружены у всех 4 изученных типов НЭОГ), причем события амплификации генома являются наиболее распространенными – 54% из замеченных случаев. Фактически на уровне отдельных клеток мы убедились, что мутации гена *GNAS* являются кластер-специфичными, когда 2 типа мутаций *GNAS* были обнаружены только в кластере 3 СА. Этот анализ позволил предположить, что кластер 3 в СА является инициатором опухоли из-за большого количества событий перестройки в этом кластере и различных мутаций *GNAS*, происходящих в этих клетках.

Наше исследование двух различных типов активных НЭОГ и 2 неактивных форм НЭОГ на уровне одной клетки с помощью scRNA-seq позволило получить ценные сведения о транскриптомике НЭОГ, возможных причинах отсутствия

клинически-значимой гормональной экспрессии, что поможет улучшить диагностику и оптимизировать лечение пациентов.

## 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 высокогетерогенную 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 РВК в удаленных образцах аденом гипофиза с помощью антител к РВК 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АКТГ – Адrenокортикотропный гормон

АДГ – Антидиуретический гормон

АСС – Аналоги соматостатина

БПВ – Беспрогрессивная выживаемость

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ВИ – Взвешенное изображение

ГТФаза – Большое семейство ферментов гидролаз, которые связывают и гидролизуют гуанозинтрифосфат (GTP)

ДЭГ – Дифференциально экспрессирующиеся гены

ИГХ – Иммуногистохимия

ИФР1 – Инсулиноподобный фактор роста 1-го типа

КА – Функциональные (гормонально-активные) кортикотропные аденомы

ЛГ – Лютеинизирующий гормон

МЭН – Множественная эндокринная неоплазия

МРЛ – Мелкоклеточный рак легкого

МСГ – Меланоцитстимулирующий гормон

МРТ – Магнитно-резонансная томография

НЭН – Нейроэндокринные новообразования

НК – Нейроэндокринные клетки

НЭО – Нейроэндокринные опухоли (высокодифференцированные)

НЭК – Нейроэндокринные карциномы (низкодифференцированные)

НСА – Гормонально-неактивные соматотропные аденомы

НГА – Гормонально-неактивные гонадотрофные аденомы

НАГ – Гормонально-неактивные аденомы гипофиза

НКА – Гормонально-неактивные кортикотропные аденомы

НЭОГ – Нейроэндокринные опухоли гипофиза

ПГ – Параганглиома

ПДГ – Передняя доля гипофиза

ПРЛ – Пролактин

РНКаЗ – Рибонуклеазы

СТГ – Соматотропный гормон

СА – Функциональные (гормонально-активные) соматотропные аденомы

ТТГ – Тиреотропный гормон

ФХЦ – Феохромоцитома

ФСГ – Фолликулостимулирующий гормон

ЭМП – Эпителиально-мезенхимальный переход

ACME HS – ACetic-MEthanol High Salt (Уксусно-метанольная диссоциация)

BSA – Bovine serum flbumin (Бычий сывороточный альбумин)

BRAF – B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase (Протоонкогена B-Raf, серин/треониновая протеинкиназа)

CNV – Copy number variations (Вариации числа копий)

CAF – Cancer-associated fibroblast (Опухоль-ассоциированные фибробласты)

CFSE – Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (Сукцинимидиловый эфир (5,6)-карбоксифлуоресцеина диацетата)

DPBS – Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Фосфатный забуференный солевой раствор Дульбекко)

ECM – Extracellular matrix (Внеклеточный матрикс)

FBS – Fetal bovine serum (Фетальная бычья сыворотка)

FGFR1 – Fibro blast growth factor receptor 1 (Рецептор фактора роста фибробластов 1)

FACS – Fluorescence-activated cell sorting (Флуоресцентно-активированная сортировка клеток)

GFP-NET – Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (Гастроэнтеропанкреатические нейроэндокринные опухоли)

GSEA – Gene set enrichment analysis (Аанализ обогащения набора генов)

HIF-1 $\alpha$  – Hypoxia-inducible factor 1-alpha (Фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа)

HRAS – Transforming protein p21 (Трансформирующий белок p21)

ILC – Innate lymphoid cell (Лимфоидные клетки врождённого иммунитета)

PBS – Phosphate buffered saline (Фосфатный буферный солевой раствор)

POMC – Proopiomelanocortin (Проопиомеланокортин)

PCA – Principal component analysis (Анализ главных компонент)



pVHL – Von Hippel–Lindau tumor suppressor (Белок-онкосупрессор (антионкобелок)  
Вон Хиппеля – Линдау)

PI – Propidium iodide (Пропидия йодид)

MACS – Magnetic-activated cell sorting (Магнитно-активированная сортировка клеток)

MDS – Multidimensional scaling (Анализ многомерного масштабирования)

MCC – Merkel cell carcinoma (Карцинома Меркеля)

MAX – MYC Associated Factor X (Фактор X, связанный с MYC)

MERTK – MER Proto-Oncogene, Tyrosine kinase (Протоонкоген MER, тирозинкиназа)

MEN2A – Multiple endocrine neoplasia Type 2A (Синдром множественных эндокринных неоплазии 2A типа)

MAIT – Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells (Инвариантные Т-клетки, связанные со слизистой оболочкой)

NGS – Next generation sequencing (Секвенирование нового поколения)

NF1 – Neurofibromin 1 (Нейрофибромин 1)

QC – Quality control (Контроля качества)

RIN – RNA-integrity number (Индекс целостности РНК)

RET – Proto-oncogene, a tyrosine kinase receptor (Протоонкоген – рецептор тирозинкиназы)

SNV – Single nucleotide variations (Варианты одного нуклеотида)

SSTR – Somatostatin receptor (Рецептор соматостатина)

scRNA-seq – Single-cell RNA sequencing (Секвенирование РНК единичных клеток)

SDHA, SDHB, SDHC и SDHD – Succinate dehydrogenase complex, subunits A (flavo-protein variant), B, C and D (Сукцинатдегидрогеназа Субъединицы А – флавопротеин, В, С и D)

TMEM127 – Transmembrane protein 127 (Трансмембранный белок 127)

VEGFA – Vascular endothelial growth factor A (Фактор роста эндотелия сосудов А)

VEGFR2 – Vascular endothelial growth factor receptor 2 (Рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2)

3xSSC\* – Saline-sodium citrate buffer (Цитратно-солевой буфер)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang, X. Bulk tissue cell type deconvolution with multi-subject single-cell expression reference / X. Wang, J. Park, K. Susztak [et al.] // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. 380.
2. Dai, C. How to Classify and Define Pituitary Tumors: Recent Advances and Current Controversies / C. Dai, J. Kang, X. Liu [et al.] // *Front Endocrinol. (Lausanne)*. – 2021. – Vol. 12. – P. 604644.
3. Yan, N. Single-cell transcriptomic analysis reveals tumor cell heterogeneity and immune microenvironment features of pituitary neuroendocrine tumors / N. Yan, W. Xie, D. Wang [et al.] // *Genome Medicine*. – 2024. – Vol. 16, № 1. – P. 2.
4. Lin, S. Single-cell transcriptomics reveal distinct immune-infiltrating phenotypes and macrophage–tumor interaction axes among different lineages of pituitary neuroendocrine tumors / S. Lin, Y. Dai, C. Han, [et al.] // *Genome Medicine*. – 2024. – Vol. 16, № 1. – P. 60.
5. Lyu, L. Single-cell sequencing of PIT1-positive pituitary adenoma highlights the pro-tumour microenvironment mediated by IFN- $\gamma$ -induced tumour-associated fibroblasts remodelling / L. Lyu, Y. Jiang, W. Ma [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 2023. – Vol. 128, № 6. – P. 1117–1133.
6. Stefàno, E. An Overview of Altered Pathways Associated with Sensitivity to Platinum-Based Chemotherapy in Neuroendocrine Tumors: Strengths and Prospects / E. Stefàno, F. De Castro, A. Ciccicarese, [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25, № 16. – P. 8568.
7. White, B. E. Incidence and survival of neuroendocrine neoplasia in England 1995–2018: A retrospective, population-based study / B. E. White, B. Rous, K. Chandrakumaran [et al.] // *Lancet Reg. Health Eur*. – 2022. – Vol. 23. – P. 100510.
8. Oronsky, B. Nothing But NET: A Review of Neuroendocrine Tumors and Carcinomas / B. Oronsky, P. C. Ma, D. Morgensztern, C. A. Carter // *Neoplasia*. – 2017. – Vol. 19, № 12. – P. 991–1002.
9. Rindi, G. Overview of the 2022 WHO Classification of Neuroendocrine Neoplasms / G. Rindi, O. Mete // *Endocr. Pathol.* – 2022. – Vol. 33, № 1. – P. 115–154.
10. Khatami, F. Multiple Endocrine Neoplasia Syndromes from Genetic and Epigenetic Perspectives / F. Khatami, S. M. Tavangar // *Biomark. Insights*. – 2018. – Vol. 13. – P. 1177271918785129.
11. Gut, P. Familial syndromes associated with neuroendocrine tumours / P. Gut, H. Komarowska, A. Czarnywojtek, [et al.] // *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*. – 2015. – Vol. 19, № 3. – P. 176–183.
12. Guerrero-Pérez, F. 3P association (3PAs): Pituitary adenoma and pheochromocytoma/paraganglioma. A heterogeneous clinical syndrome associated with different gene mutations / F. Guerrero-Pérez, C. Fajardo, E. Torres Vela [et al.] // *Eur. J. Intern. Med.* – 2019. – Vol. 69. – P. 14–19.
13. Pitsava, G. Carney Triad, Carney-Stratakis Syndrome, 3PAS and Other Tumors Due to SDH Deficiency / G. Pitsava, N. Settas, F. R. Faucz, C. A. Stratakis // *Front Endocrinol. (Lausanne)*. – 2021. – Vol. 12. – P. 680609.
14. Bouillaud, F. Inhibition of Succinate Dehydrogenase by Pesticides (SDHIs) and Energy Metabolism / F. Bouillaud // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 4. – P. 4045.
15. Van Vranken, J. G. Protein-mediated assembly of succinate dehydrogenase and its cofactors / J. G. Van Vranken, U. Na, D. R. Winge, J. Rutter // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 50, № 2. – P. 168–80.
16. Cowman, S. J. Revisiting the HIF switch in the tumor and its immune microenvironment / S. J. Cowman, M. Y. Koh // *Trends Cancer*. – 2022. – Vol. 8, № 1. – P. 28–42.
17. Lanzaro, F. Childhood Multiple Endocrine Neoplasia (MEN) Syndromes: Genetics, Clinical Heterogeneity and Modifying Genes / F. Lanzaro, D. De Biasio, F. G. Cesaro, E. Stampone // *J. Clin. Med.* – 2024. – Vol. 13, № 18.
18. Durma, A. D. Epidemiology of Neuroendocrine Neoplasms and Results of Their Treatment with [177Lu]Lu-DOTA-TATE or [177Lu]Lu-DOTA-TATE and [90Y]Y-DOTA-TATE – A Six-Year

- Experience in High-Reference Polish Neuroendocrine Neoplasm Center / A. D. Durma, M. Saracyn, M. Kołodziej [et al.] // *Cancers*. – 2023. – Vol. 15, № 22. – P. 5466.
19. Dasari, A. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States / A. Dasari, C. Shen, D. Halperin [et al.] // *JAMA Oncol.* – 2017. – Vol. 3, № 10. – P. 1335-1342.
  20. Ito, T. JNETS clinical practice guidelines for gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: diagnosis, treatment, and follow-up: a synopsis / T. Ito, T. Masui, I. Komoto [et al.] // *J. Gastroenterol.* – 2021. – Vol. 56, № 11. – P. 1033–1044.
  21. Sultana, Q. A Comprehensive Review on Neuroendocrine Neoplasms: Presentation, Pathophysiology and Management / Q. Sultana, J. Kar, A. Verma // *J. Clin. Med.* – 2023. – Vol. 12, № 15.
  22. Rogoza, O. Role of Somatostatin Signalling in Neuroendocrine Tumours / O. Rogoza, K. Megnis, M. Kudrjavceva, [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 3.
  23. Gomes-Porras, M. Somatostatin Analogs in Clinical Practice: a Review / M. Gomes-Porras, J. Cárdenas-Salas, C. Álvarez-Escolá // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, № 5.
  24. Rinke, A. Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group / A. Rinke, H. H. Müller, C. Schade-Brittinger, [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27, № 28. – P. 4656–63.
  25. Caplin, M. E. Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors / M. E. Caplin, M. Pavel, J. B. Ćwikła [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2014. – Vol. 371, № 3. – P. 224–233.
  26. Al Subhi, A. R. Systematic Review: Incidence of Pheochromocytoma and Paraganglioma Over 70 Years / A. R. Al Subhi, V. Boyle, M. S. Elston // *Journal of the Endocrine Society*. – 2022. – Vol. 6, № 9. – P. bvac105.
  27. Waguespack, S. G. A Current Review of the Etiology, Diagnosis, and Treatment of Pediatric Pheochromocytoma and Paraganglioma / S. G. Waguespack, T. Rich, E. Grubbs [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2010. – Vol. 95, № 5. – P. 2023–2037.
  28. Jasim, S. Metastatic pheochromocytoma and paraganglioma: Management of endocrine manifestations, surgery and ablative procedures, and systemic therapies / S. Jasim, C. Jimenez // *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2020. – Vol. 34, № 2. – P. 101354.
  29. Zandee, W. T. Treatment of inoperable or metastatic paragangliomas and pheochromocytomas with peptide receptor radionuclide therapy using <sup>177</sup>Lu-DOTATATE / W. T. Zandee, R. A. Feelders, D. A. Smit Duijzentkunst [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* – 2019. – Vol. 181, № 1. – P. 45–53.
  30. King, K. S. Familial pheochromocytomas and paragangliomas / K. S. King, K. Pacak // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2014. – Vol. 386, № 1-2. – P. 92–100.
  31. Corrigendum to: Personalized Management of Pheochromocytoma and Paraganglioma // *Endocr. Rev.* – 2022. – Vol. 43, № 2. – P. 437–439.
  32. Basolo, F. The 5(th) edition of WHO classification of tumors of endocrine organs: changes in the diagnosis of follicular-derived thyroid carcinoma / F. Basolo, E. Macerola, A. M. Poma, L. Torregrossa // *Endocrine*. – 2023. – Vol. 80, № 3. – P. 470–476.
  33. Turkova, H. Characteristics and outcomes of metastatic sdhb and sporadic pheochromocytoma/paraganglioma: an national institutes of health study / H. Turkova, T. Prodanov, M. Maly [et al.] // *Endocr. Pract.* – 2016. – Vol. 22, № 3. – P. 302–34.
  34. Bima, C. Clinical and Pathological Tools for Predicting Recurrence and/or Metastasis in Patients with Pheochromocytoma and Paraganglioma / C. Bima, F. Bioletto // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10, № 8.
  35. Bima, C. Clinical and Pathological Tools for Predicting Recurrence and/or Metastasis in Patients with Pheochromocytoma and Paraganglioma / C. Bima, F. Bioletto, C. Lopez [et al.] // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10, № 8. – P. 1813.
  36. Stenman, A. The Value of Histological Algorithms to Predict the Malignancy Potential of Pheochromocytomas and Abdominal Paragangliomas-A Meta-Analysis and Systematic Review of the Literature / A. Stenman, J. Zedenius, C. C. Juhlin // *Cancers (Basel)*. – 2019. – Vol. 11, № 2.

37. de Bresser, C. J. M. The Molecular Classification of Pheochromocytomas and Parangliomas: Discovering the Genomic and Immune Landscape of Metastatic Disease / C. J. M. de Bresser, R. R. de Krijger // *Endocr. Pathol.* – 2024. – Vol. 35, № 4. – P. 279–292.
38. Kimura, N. Pathological grading for predicting metastasis in phaeochromocytoma and paraganglioma / N. Kimura, R. Takayanagi, N. Takizawa [et al.] // *Endocr. Relat. Cancer.* – 2014. – Vol. 21, № 3. – P. 405–414.
39. Elder, E. E. KI-67 AND hTERT expression can aid in the distinction between malignant and benign pheochromocytoma and paraganglioma / E. E. Elder, D. Xu, A. Höög [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2003. – Vol. 16, № 3. – P. 246–55.
40. Tsukamoto, T. Imaging of pituitary tumors: an update with the 5th WHO Classifications – part 1. Pituitary neuroendocrine tumor (PitNET)/pituitary adenoma / T. Tsukamoto, Y. Miki // *Japanese Journal of Radiology.* – 2023. – Vol. 41, № 8. – P. 789–806.
41. Kamel-ElSayed, S. A. Physiology, Pituitary Gland / S. A. Kamel-ElSayed, M. W. Fahmy, J. Schwartz. – Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2023.
42. Gargya, S. CAD System Design for Pituitary Tumor Classification based on Transfer Learning Technique / S. Gargya, S. Jain // *Current Medical. Imaging.* – 2024. – Vol. 20.
43. Roncaroli, F. / F. Roncaroli, C. A. Donofrio, L. Walker [et al.]. – DOI 10.1016/j.mpdhp.2024.10.001// *Diagnostic Histopathology.* – 2024.
44. Daly, A. F. The Epidemiology of Pituitary Adenomas / A. F. Daly, A. Beckers // *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* – 2020. – Vol. 49, № 3. – P. 347–355.
45. Asaad, W. scRNA sequencing technology for PitNET studies / W. Asaad, M. Utkina, A. Shcherbakova, [et al.] // *Frontiers in Endocrinology.* – 2024. – Vol. 15.
46. Graffeo, C. S. Pituitary Adenoma Incidence, Management Trends, and Long-term Outcomes: A 30-Year Population-Based Analysis / C. S. Graffeo, K. J. Yagnik, L. P. Carlstrom [et al.] // *Mayo Clin. Proc.* – 2022. – Vol. 97, № 10. – P. 1861–1871.
47. Tsukamoto, T. Imaging of pituitary tumors: an update with the 5th WHO Classifications-part 1. Pituitary neuroendocrine tumor (PitNET)/pituitary adenoma / T. Tsukamoto, Y. Miki // *Jpn. J. Radiol.* – 2023. – Vol. 41, № 8. – P. 789–806.
48. Chen, J. Pituitary Adenoma in Pediatric and Adolescent Populations / J. Chen, R. E. Schmidt, S. Dahiya // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2019. – Vol. 78, № 7. – P. 626–632.
49. Kolitz, T. Refractory nonfunctioning pituitary adenomas / T. Kolitz, Y. Greenman // *Pituitary.* – 2023. – Vol. 26, № 3. – P. 278–280.
50. Trouillas, J. How to Classify the Pituitary Neuroendocrine Tumors (PitNET)s in 2020 / J. Trouillas, M. L. Jaffrain-Rea, A. Vasiljevic [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2020. – Vol. 12, № 2.
51. Drummond, J. Clinical and Pathological Aspects of Silent Pituitary Adenomas / J. Drummond, F. Roncaroli, A. B. Grossman, M. Korbonits // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2019. – Vol. 104, № 7. – P. 2473–2489.
52. Goyal-Honavar, A. Practical approaches to diagnosing PitNETs/adenomas based on cell lineage / A. Goyal-Honavar, G. Chacko // *Brain Pathology.* – 2025 Jan. – Vol. 1 (35). – P. e13298.
53. Tritos, N. A. Diagnosis and Management of Pituitary Adenomas: A Review / N. A. Tritos, K. K. Miller // *JAMA.* – 2023. – Vol. 329, № 16. – P. 1386–1398.
54. Ostrom, Q. T. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018 / Q. T. Ostrom, G. Cioffi, K. Waite [et al.] // *Neuro Oncol.* – 2021. – Vol. 23, № 12, Suppl. 2. – P. iii1–iii105.
55. Dumitriu-Stan, R.-I. Plurihormonal Pituitary Neuroendocrine Tumors: Clinical Relevance of Immunohistochemical Analysis / R.-I. Dumitriu-Stan, I.-F. Burcea, R., Dobre [et al.] // *Diagnostics.* – 2024. – Vol. 14, № 2. – P. 170.
56. Katznelson, L. Acromegaly: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline / L. Katznelson, E. R. Laws Jr., S. Melmed, [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* – 2014. – Vol. 99, № 11. – P. 3933–3951.
57. Tortosa, F. Atypical pituitary adenomas: 10 years of experience in a reference centre in Portugal / F. Tortosa, S. M. Webb // *Neurologia.* – 2016. – Vol. 31, № 2. – P. 97–105.

58. Jaffrain-Rea, M. L. A critical reappraisal of MIB-1 labelling index significance in a large series of pituitary tumours: secreting versus non-secreting adenomas / M. L. Jaffrain-Rea, D. Di Stefano, G. Minniti [et al.] // *Endocr. Relat. Cancer*. – 2002. – Vol. 9, № 2. – P. 103–113.
59. Molitch, M. E. Diagnosis and Treatment of Pituitary Adenomas: A Review / M. E. Molitch // *Jama*. – 2017. – Vol. 317, № 5. – P. 516–524.
60. Rogoza, O. Role of Somatostatin Signalling in Neuroendocrine Tumours / O. Rogoza, K. Megnis, M., Kudrjavceva [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23, № 3. – P. 1447.
61. Jovic, D. Single-cell RNA sequencing technologies and applications: A brief overview / D. Jovic, X. Liang, H. Zeng [et al.] // *Clin. Transl. Med.* – 2022. – Vol. 12, № 3. – P. e694.
62. Haque, A. A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications / A. Haque, J. Engel, S. A. Teichmann, T. Lönnberg // *Genome Medicine*. – 2017. – Vol. 9, № 1. – P. 75.
63. Li, X. From bulk, single-cell to spatial RNA sequencing / X. Li, C.-Y. Wang // *International Journal of Oral Science*. – 2021. – Vol. 13, № 1. – P. 36.
64. Tang, F. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell / F. Tang, C. Barbacioru, Y. Wang [et al.] // *Nature Methods*. – 2009. – Vol. 6, № 5. – P. 377–382.
65. Jaitin, D. A. Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types / D. A. Jaitin, E. Kenigsberg, H. Keren-Shaul [et al.] // *Science*. – 2014. – Vol. 343, № 6172. – P. 776–9.
66. Deng, Q. Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells / Q. Deng, D. Ramsköld, B. Reinius, R. Sandberg // *Science*. – 2014. – Vol. 343, № 6167. – P. 193–196.
67. Yan, L. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells / L. Yan, M. Yang, H. Guo [et al.] // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 20, № 9. – P. 1131–9.
68. Zhou, Y. Single-cell RNA sequencing reveals spatiotemporal heterogeneity and malignant progression in pancreatic neuroendocrine tumor / Zhou Y., Liu S., Liu C. [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* – 2021. – Vol. 17, № 14. – C. 3760–3775.
69. Ye, Z. Single-cell sequencing reveals the heterogeneity of pancreatic neuroendocrine tumors under genomic instability and histological grading / Z. Ye, Y. Zhou, Y. Hu [et al.] // *iScience*. – 2024. – Vol. 27, № 9.
70. Hong, Y. C. Single-cell analysis of castration-resistant prostate cancers to identify potential biomarkers for diagnosis and prognosis of neuroendocrine prostate cancer / Y. C Hong., T. Y. Hu, C. S. Hsu [et al.] // *Am. J. Cancer Res.* – 2023. – Vol. 13, № 10. – P. 4560–4578.
71. Rao, M. Comparative single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) reveals liver metastasis-specific targets in a patient with small intestinal neuroendocrine cancer / M. Rao, K. Oh, R. Moffitt, [et al.] // *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.* – 2020. – Vol. 6, № 2.
72. Zhong, C. Single-Cell Transcriptome Analysis of Small Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Endometrium Reveals ISL1 as a Potential Biomarker for Diagnosis and Treatment / C. Zhong, Y.-e. Guo, Q. Yang [et al.] // *FBL*. – 2024. – Vol. 29, № 3.
73. Lenders, N. F. The evolution in pituitary tumour classification: a clinical perspective / N. F. Lenders, P. E. Earls [et al.] // *Endocr. Oncol.* – 2023. – Vol. 3, № 1. – P. e220079.
74. Mantovani, G. Stem Cells in Pituitary Tumors: Experimental Evidence Supporting Their Existence and Their Role in Tumor Clinical Behavior / G. Mantovani, E. Giardino, D. Treppiedi [et al.] // *Frontiers in Endocrinology*. – 2019. – Vol. 10.
75. Manoranjan, B. The identification of human pituitary adenoma-initiating cells / Manoranjan B., Mahendram S., Almenawer S. A. [et al.] // *Acta Neuropathologica Communications*. – 2016. – Vol. 4, № 1. – P. 125.
76. Zhan, X. Desiderio D. M. Heterogeneity analysis of the proteomes in clinically nonfunctional pituitary adenomas / X. Zhan, X. Wang, Y. Long, D. M. Desiderio // *BMC Medical Genomics*. – 2014. – Vol. 7, № 1. – P. 69.

77. Kolodziejczyk, A. A. The technology and biology of single-cell RNA sequencing / A. A. Kolodziejczyk, J. K. Kim, V. Svensson [et al.] // *Mol. Cell.* – 2015. – Vol. 58, № 4. – P. 610–20.
78. Wu, J. Identification of biomarkers associated with the invasion of nonfunctional pituitary neuroendocrine tumors based on the immune microenvironment / J. Wu, J. Guo, Q. Fang, [et al.] // *Front Endocrinol. (Lausanne).* – 2023. – Vol. 14. – P. 1131693.
79. Cui, Y. Single-cell transcriptome and genome analyses of pituitary neuroendocrine tumors / Y. Cui, C. Li, Z. Jiang [et al.] // *Neuro. Oncol.* – 2021. – Vol. 23, № 11. – P. 1859–1871.
80. Zhang, S. Single-cell transcriptomics identifies divergent developmental lineage trajectories during human pituitary development / S. Zhang, Y. Cui, X. Ma [et al.] // *Nature Communications.* – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 5275.
81. Zhang, Q. Single-cell sequencing identifies differentiation-related markers for molecular classification and recurrence prediction of PitNET / Q. Zhang, B. Yao, X., Long [et al.] // *Cell Rep. Med.* – 2023. – Vol. 4, № 2. – P. 100934.
82. Zhang, D. Single-cell RNA sequencing in silent corticotroph tumors confirms impaired POMC processing and provides new insights into their invasive behavior / D. Zhang, W. Hugo, M. Bergsneider [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* – 2022. – Vol. 187, № 1. – P. 49–64.
83. Zhang, D. A human ACTH-secreting corticotroph tumoroid model: Novel Human ACTH-Secreting Tumor Cell in vitro Model / D. Zhang, W. Hugo, P. Redublo [et al.] // *EBioMedicine.* – 2021. – Vol. 66. – P. 103294.
84. Yan, N. Single-cell transcriptomic analysis reveals tumor cell heterogeneity and immune microenvironment features of pituitary neuroendocrine tumors / N. Yan, W. Xie, D. Wang [et al.] // . – 2024. – Vol. 16, № 1. – P. 2.
85. Hedlund, E. Single-cell RNA sequencing: Technical advancements and biological applications / E. Hedlund, Q. Deng // *Mol. Aspects Med.* – 2018. – Vol. 59. – P. 36–46.
86. Su, M. Data analysis guidelines for single-cell RNA-seq in biomedical studies and clinical applications / M. Su, T. Pan, Q.-Z. Chen [et al.] // *Military Medical Research.* – 2022. – Vol. 9, № 1. – P. 68.
87. Slovin, S. Single-Cell RNA Sequencing Analysis: A Step-by-Step Overview / S. Slovin, A. Carissimo, F. Panariello [et al.] // *Methods Mol. Biol.* – 2021. – Vol. 2284. – P. 343–365.
88. Melmed, S. Pituitary-Tumor Endocrinopathies / S. Melmed // *N. Engl. J. Med.* – 2020. – Vol. 382, № 10. – P. 937–950.
89. Asa, S. L. The pathogenesis of pituitary tumors / S. L. Asa, S. Ezzat // *Annu. Rev. Pathol.* – 2009. – Vol. 4. – P. 97–126.
90. Chang, M. Genetic and Epigenetic Causes of Pituitary Adenomas / M. Chang, C. Yang, X. Bao, R. Wang // *Frontiers in Endocrinology.* – 2021. – Vol. 11.
91. Tatsi, C. Large Genomic Aberrations in Corticotropinomas Are Associated With Greater Aggressiveness / C. Tatsi, N. Pankratz, J. Lane [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2019. – Vol. 104, № 5. – P. 1792–1801.
92. Yang, Q. Molecular Network Basis of Invasive Pituitary Adenoma: A Review / Q. Yang, X. Li // *Front Endocrinol. (Lausanne).* – 2019. – Vol. 10. – P. 7.
93. Burcea, I. Updates in aggressive pituitary tumors / I. Burcea, C. Poiana // *Acta Endocrinol. (Buchar).* – 2020. – Vol. 16, № 2. – P. 267–273.
94. Micko, A. S. Invasion of the cavernous sinus space in pituitary adenomas: endoscopic verification and its correlation with an MRI-based classification / A. S. Micko, A. Wöhrer, S. Wolfsberger, E. Knosp // *J. Neurosurg.* – 2015. – Vol. 122, № 4. – P. 803–11.
95. Asmaro, K. Cytodifferentiation of pituitary tumors influences pathogenesis and cavernous sinus invasion / K. Asmaro, M. Zhang, A. J. Rodrigues [et al.] // *J. Neurosurg.* – 2023. – Vol. 139, № 5. – P. 1216–1224.
96. Principe, M. Immune Landscape of Pituitary Tumors Reveals Association Between Macrophages and Gonadotroph Tumor Invasion / M. Principe, M. Chanal, M. D. Ilie [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2020. – Vol. 105, № 11.

97. Hassan, M. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer / M. Hassan, H. Watari, A. AbuAlmaaty [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 150845.
98. Pfeffer, C. M. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy / C. M. Pfeffer, A. T. K. Singh // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, № 2.
99. Taghavi, S. F. Evaluating the expression pattern of the opioid receptor in pituitary neuroendocrine tumors (PitNET) and the role of morphine and naloxone in the regulation of pituitary cell line growth and apoptosis / S. F. Taghavi, Z. Shahsavari, F. Adjaminezhad-Fard [et al.] // *Biomed. Pharmacother.* – 2023. – Vol. 157. – P. 114022.
100. Guo, L. PER2 integrates circadian disruption and pituitary tumorigenesis / L. Guo, H. Cen, J. Weng [et al.] // *Theranostics.* – 2023. – Vol. 13, № 8. – P. 2657–2672.
101. Shen, D. W. MicroRNA-543 promotes cell invasion and impedes apoptosis in pituitary adenoma via activating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway by negative regulation of Smad7 / D. W. Shen, Y. L. Li, Y. J. Hou [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2019. – Vol. 83, № 6. – P. 1035–1044.
102. Asuzu, D. T. Pituitary adenomas evade apoptosis via noxa deregulation in Cushing's disease / D. T. Asuzu, R. Alvarez, P. A. Fletcher, [et al.] // *Cell Rep.* – 2022. – Vol. 40, № 8. – P. 111223.
103. Dengler, M. A. The Phenotype High Noxa mRNA/Low NOXA Protein Levels Constitutes a Critical Achilles Heel Of Mantle Cell Lymphoma (MCL) Cells / M. A. Dengler, A. Weilbacher, M. Gutekunst [et al.] // *Blood.* – 2013. – Vol. 122, № 21. – P. 644–644.
104. Guadagno, E. Ki67 in endocrine neoplasms: to count or not to count, this is the question! A systematic review from the English language literature / E. Guadagno, E. D'Avella, P. Cappabianca, [et al.] // *J. Endocrinol. Invest.* – 2020. – Vol. 43, № 10. – P. 1429–1445.
105. Iglesias, P. Prevalence, Clinical Features, and Natural History of Incidental Clinically Non-Functioning Pituitary Adenomas / P. Iglesias, K. Arcano, V. Triviño [et al.] // *Horm. Metab. Res.* – 2017. – Vol. 49, № 9. – P. 654–659.
106. Salehi, F. Ki-67 in pituitary neoplasms: a review--part I / F. Salehi, A. Agur, B. W. Scheithauer [et al.] // *Neurosurgery.* – 2009. – Vol. 65, № 3. – P. 429–437; discussion 437.
107. Dubois, S. Relevance of Ki-67 and prognostic factors for recurrence/progression of gonadotropic adenomas after first surgery / S. Dubois, S. Guyétant, P. Menei [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* – 2007. – Vol. 157, № 2. – P. 141–147.
108. Naritaka, H. Morphological Characterization and Subtyping of Silent Somatotroph Adenomas / H. Naritaka, T. Kameya, Y. Sato [et al.] // *Pituitary.* – 1999. – Vol. 1, № 3. – P. 233–241.
109. Hao, Y. Dictionary learning for integrative, multimodal and scalable single-cell analysis / Y. Hao, T., Stuart M. H. Kowalski [et al.] // *Nature Biotechnology.* – 2024. – Vol. 42, № 2. – P. 293–304.
110. Wolock, S. L. Scrublet: Computational Identification of Cell Doublets in Single-Cell Transcriptomic Data / S. L. Wolock, R. Lopez, A. M. Klein // *Cell Systems.* – 2019. – Vol. 8, № 4. – P. 281–291.e9.
111. Young, M. D. SoupX removes ambient RNA contamination from droplet-based single-cell RNA sequencing data / M. D. Young, S. Behjati // *GigaScience.* – 2020. – Vol. 9, № 12. – P. giaa151.
112. Yang, S. Decontamination of ambient RNA in single-cell RNA-seq with DecontX / S. Yang, S. E. Corbett, Y. Koga [et al.] // *Genome Biology.* – 2020. – Vol. 21, № 1. – P. 57.
113. Kildisiute, G. Tumor to normal single-cell mRNA comparisons reveal a pan-neuroblastoma cancer cell / G. Kildisiute, W. M. Kholosy // *Sci. Adv.* – 2021. – Vol. 7, № 6.
114. Jansky, S. Single-cell transcriptomic analyses provide insights into the developmental origins of neuroblastoma / S. Jansky, A. K. Sharma, V. Körber [et al.] // *Nature Genetics.* – 2021. – Vol. 53, № 5. – P. 683–693.
115. Zhang, Z. Single nucleus transcriptome and chromatin accessibility of postmortem human pituitaries reveal diverse stem cell regulatory mechanisms / Z. Zhang, M. Zamojski, G. R. Smith [et al.] // *Cell Rep.* – 2022. – Vol. 38, № 10. – P. 110467.
116. Han, L. Single cell transcriptomics identifies a signaling network coordinating endoderm and mesoderm diversification during foregut organogenesis / L. Han, P. Chaturvedi, K. Kishimoto [et al.] // *Nature Communications.* – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 4158.

117. Torgersen, S. Metal particles and tissue changes adjacent to miniplates A retrieval study / S. Torgersen, N. R. Gjerdet, E. S. Erichsen, G. Bang // *Acta Odontologica Scandinavica*. – 1995. – Vol. 53, № 2. – P. 65–71.
118. Korsunsky, I. Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony / I. Korsunsky, N. Millard, J. Fan [et al.] // *Nature Methods*. – 2019. – Vol. 16, № 12. – P. 1289–1296.
119. La Manno, G. RNA velocity of single cells / G. La Manno, R. Soldatov, A. Zeisel [et al.] // *Nature*. – 2018. – Vol. 560, № 7719. – P. 494–498.
120. Bergen, V. Generalizing RNA velocity to transient cell states through dynamical modeling / V. Bergen, M. Lange, S. Peidli [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2020. – Vol. 38, № 12. – P. 1408–1414.
121. Wu, T. ClusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data / T. Wu, E. Hu, S. Xu [et al.] // *The Innovation*. – 2021. – Vol. 2, № 3.
122. Agrawal, A. WikiPathways 2024: next generation pathway database / A. Agrawal, H. Balci, K. Hanspers [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2024. – Vol. 52, № D1. – P. D679–D689.
123. Kiraz, Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis / Y. Kiraz, A. Adan, M. Kartal Yandim, Y. Baran // *Tumor Biology*. – 2016. – Vol. 37, № 7. – P. 8471–8486.
124. Nikolettou, V. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy / V. Nikolettou, M. Markaki, K. Palikaras, N. Tavernarakis // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. – 2013. – Vol. 1833, № 12. – P. 3448–3459.
125. Kanehisa, M. KEGG: integrating viruses and cellular organisms / M., Kanehisa M. Furumichi, Y. Sato [et al.] // *Nucleic. Acids. Research*. – 2021. – Vol. 49, № D1. – P. D545–D551.
126. Kanehisa, M. New approach for understanding genome variations in KEGG / M. Kanehisa, Y. Sato, M. Furumichi [et al.] // *Nucleic. Acids. Research*. – 2019. – Vol. 47, № D1. – P. D590–D595.
127. Yer, E. N. Identification and expression profiling of all Hsp family member genes under salinity stress in different poplar clones / E. N. Yer, M. C. Baloglu, S. Ayan // *Gene*. – 2018. – Vol. 678. – P. 324–336.
128. Kampinga, H. H. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins / H. H. Kampinga, J. Hageman, M. J. Vos [et al.] // *Cell Stress and Chaperones*. – 2009. – Vol. 14, № 1. – P. 105–111.
129. Darzynkiewicz, Z. Critical aspects in analysis of cellular DNA content / Z. Darzynkiewicz // *Curr. Protoc. Cytom.* – 2011. – Vol. Chapter 7. – P. 7.2.1–7.2.8.
130. Dumitriu, I. E. 5,6-Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester-Labeled Apoptotic and Necrotic as Well as Detergent-Treated Cells Can Be Traced in Composite Cell Samples / I. E. Dumitriu, W. Mohr, W. Kolowos [et al.] // *Analytical. Biochemistry*. – 2001. – Vol. 299, № 2. – P. 247–252.
131. Mete, O. Overview of the 2022 WHO Classification of Paragangliomas and Pheochromocytomas / O. Mete, S. L. Asa // *Endocr. Pathol.* – 2022. – Vol. 33, № 1. – P. 90–114.
132. Konosu-Fukaya, S. Catecholamine-Synthesizing Enzymes in Pheochromocytoma and Extraadrenal Paraganglioma / S. Konosu-Fukaya, K. Omata, Y. Tezuka [et al.] // *Endocr. Pathol.* – 2018. – Vol. 29, № 4. – P. 302–309.
133. Machado, L. Stress relief: emerging methods to mitigate dissociation-induced artefacts / L. Machado, F., Relaix P. Mourikis // *Trends in Cell Biology*. – 2021. – Vol. 31, № 11. – P. 888–897.
134. Utkina, M. Comparative evaluation of ACetic – MEthanol high salt dissociation approach for single-cell transcriptomics of frozen human tissues / M. Utkina, A. Shcherbakova, R. Deviatiiarov, [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2025. – Vol. 12.
135. Atari, E. Regulated Endocrine-Specific Protein-18, an Emerging Endocrine Protein in Physiology: A Literature Review / E. Atari, M. C. Perry, P. A. Jose, S. Kumarasamy // *Endocrinology*. – 2019. – Vol. 160, № 9. – P. 2093–2100.
136. Bloomquist, B. T. RESP18, a novel endocrine secretory protein transcript, and four other transcripts are regulated in parallel with pro-opiomelanocortin in melanotropes / B. T. Bloomquist, D. N. Darlington, R. E. Mains, B. A. Eipper // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269, № 12. – P. 9113–9122.
137. Yanik T., Durhan S. T. Specific Functions of Melanocortin 3 Receptor (MC3R) / T. Yanik, S. T. Durhan // *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* – 2023. – Vol. 15, № 1. – P. 1–6.



138. Ros, G. HMGA2 Antisense Long Non-coding RNAs as New Players in the Regulation of HMGA2 Expression and Pancreatic Cancer Promotion / G Ros., S. Pegoraro, P. De Angelis [et al.] // *Front Oncol.* – 2019. – Vol. 9. – P. 1526.
139. Finlin, B. S. RERG Is a Novel ras-related, Estrogen-regulated and Growth-inhibitory Gene in Breast Cancer / B. S. Finlin, C.-L. Gau, G. A. Murphy [et al.] // *Journal of Biological Chemistry.* – 2001. – Vol. 276, № 45. – P. 42259–42267.
140. Weichand, B. S1PR1 on tumor-associated macrophages promotes lymphangiogenesis and metastasis via NLRP3/IL-1 $\beta$  / B. Weichand, R. Popp, S. Dziumbila [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2017. – Vol. 214, № 9. – P. 2695–2713.
141. Policastro, P. The beta subunit of human chorionic gonadotropin is encoded by multiple genes / P. Policastro, C. E. Ovitt, M. Hoshina, [et al.] // *Journal of Biological Chemistry.* – 1983. – Vol. 258, № 19. – P. 11492–11499.
142. Senger, D. R. Vascular endothelial growth factor: much more than an angiogenesis factor / D. R. Senger // *Mol. Biol. Cell.* – 2010. – Vol. 21, № 3. – P. 377–9.
143. Yaqoob, U. Neuropilin-1 stimulates tumor growth by increasing fibronectin fibril assembly in the tumor microenvironment / U. Yaqoob, S. Cao, U. Shergill [et al.] // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72, № 16. – P. 4047–4059.
144. Bergsneider, M. The pituitary stalk effect: is it a passing phenomenon? / M. Bergsneider, L. Mirsadraei, W. H., Yong [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2014. – Vol. 117, № 3. – P. 477–484.
145. Lees, P. D. Hyperprolactinemia, intrasellar pituitary tissue pressure, and the pituitary stalk compression syndrome / P. D. Lees, J. D. Pickard // *J. Neurosurg.* – 1987. – Vol. 67, № 2. – P. 192–196.
146. Turkington, R. W. Elevated Serum Prolactin Levels after Pituitary-Stalk Section in Man / R. W. Turkington, L. E. Underwood, J. J. V. Wyk // *New England Journal of Medicine.* – 1971. – Vol. 285, № 13. – P. 707–710.
147. Tfelt-Hansen, J. The emerging role of pituitary tumor transforming gene in tumorigenesis / J. Tfelt-Hansen, D. Kanuparthi, N. Chattopadhyay // *Clin. Med. Res.* – 2006. – Vol. 4, № 2. – P. 130–7.
148. Stark, G. R. Analyzing the G2/M checkpoint / G. R. Stark, W. R. Taylor // *Methods Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 280. – P. 51–82.
149. García-Castro, H. ACME dissociation: a versatile cell fixation-dissociation method for single-cell transcriptomics / H. García-Castro, N. J. Kenny, M. Iglesias [et al.] // *Genome Biology.* – 2021. – Vol. 22, № 1. – P. 89.
150. Cui, Y. Single-cell transcriptome and genome analyses of pituitary neuroendocrine tumors / Y. Cui, C. Li, Z. Jiang [et al.] // *Neuro-Oncology.* – 2021. – Vol. 23, № 11. – P. 1859–1871.
151. McCormack, A. Treatment of aggressive pituitary tumours and carcinomas: results of a European Society of Endocrinology (ESE) survey 2016 / A. McCormack, O. M. Dekkers, S. Petersenn, [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* – 2018. – Vol. 178, № 3. – P. 265–276.
152. Li, Z. Characteristics and treatment of a silent somatotroph tumor that had transformed to a functional type: a case report and literature review / Z. Li, Y. Wu, J. Sun [et al.] // *Gland. Surgery.* – 2024. – Vol. 13, № 7. – P. 1322–1330.
153. Daems, T. Modification of hormonal secretion in clinically silent pituitary adenomas / T. Daems, J. Verhelst, A. Michotte [et al.] // *Pituitary.* – 2009. – Vol. 12, № 1. – P. 80–86.
154. Jiang, X. The molecular pathogenesis of pituitary adenomas: an update / X. Jiang, X. Zhang // *Endocrinol. Metab. (Seoul).* – 2013. – Vol. 28, № 4. – P. 245–54.
155. Chacko, A. G. Hemorrhagic necrosis of pituitary adenomas / A. G. Chacko, G. Chacko, M. S. Seshadri, M. J. Chandy // *Neurol. India.* – 2002. – Vol. 50, № 4. – P. 490–3.
156. Zhao, Y. As a downstream target of the AKT pathway, NPTX1 inhibits proliferation and promotes apoptosis in hepatocellular carcinoma / Y. Zhao, Y. Yu, W. Zhao [et al.] // *Biosci. Rep.* – 2019. – Vol. 39, № 6.
157. Fløyel, T. Cathepsin C Regulates Cytokine-Induced Apoptosis in  $\beta$ -Cell Model Systems / T. Fløyel, C. Frørup, J. Størling, F. Pociot // *Genes. (Basel).* – 2021. – Vol. 12, № 11.

158. Murcia, C. L. Expression of Pcdh15 in the inner ear, nervous system and various epithelia of the developing embryo / C. L. Murcia, R. P. Woychik // *Mechanisms of Development*. – 2001. – Vol. 105, № 1. – P. 163–166.
159. Li, L. COL28 promotes proliferation, migration, and EMT of renal tubular epithelial cells / L. Li, H. Ye, Q. Chen, L. Wei // *Ren. Fail.* – 2023. – Vol. 45, № 1. – P. 2187236.
160. Ho, R. X. MINAR1 is a Notch2-binding protein that inhibits angiogenesis and breast cancer growth / R. X. Ho, R. D. Meyer, K. B. Chandler [et al.] // *J. Mol. Cell Biol.* – 2018. – Vol. 10, № 3. – P. 195–204.
161. Richter, F. Neurons express hemoglobin alpha- and beta-chains in rat and human brains / F. Richter, B. H. Meurers, C. Zhu [et al.] // *J. Comp. Neurol.* – 2009. – Vol. 515, № 5. – P. 538–547.
162. Ling, Y. The mechanism of mitochondrial metabolic gene PMAIP1 involved in Alzheimer's disease process based on bioinformatics analysis and experimental validation / Y. Ling, L. Hu, J. Chen [et al.] // *Clinics*. – 2024. – Vol. 79. – P. 100373.
163. Zhao, X. Parthenolide induces apoptosis via TNFRSF10B and PMAIP1 pathways in human lung cancer cells / X., Zhao X. Liu, L. Su // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2014. – Vol. 33, № 1. – P. 3.
164. Gao, Y. PMAIP1 regulates autophagy in osteoblasts via the AMPK/mTOR pathway in osteoporosis / Y. Gao, A. Huang, Y. Zhao, Y. Du // *Human. Cell*. – 2024. – Vol. 37, № 4. – P. 1024–1038.
165. Zheng, Y.-J. Silencing lncRNA LOC101928963 Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis in Spinal Cord Glioma Cells by Binding to PMAIP1 / Y.-J. Zheng, T.-S., Liang J. Wang, [et al.] // *Molecular Therapy Nucleic Acids*. – 2019. – Vol. 18. – P. 485–495.
166. Gronkowska, K. Genetic dysregulation of EP300 in cancers in light of cancer epigenome control-targeting of p300-proficient and -deficient cancers / K. Gronkowska, A. Robaszkiewicz // *Molecular Therapy Oncology*. – 2024. – Vol. 32, № 4.
167. Ring, A. EP300 knockdown reduces cancer stem cell phenotype, tumor growth and metastasis in triple negative breast cancer / A. Ring, P., Kaur J. E. Lang // *BMC Cancer*. – 2020. – Vol. 20, № 1. – P. 1076.
168. Bi, Y. EP300 as an oncogene correlates with poor prognosis in esophageal squamous carcinoma / Y. Bi, P. Kong, L. Zhang [et al.] // *J. Cancer*. – 2019. – Vol. 10, № 22. – P. 5413–5426.
169. Tsou, Y. A. The Role of BPIFA1 in Upper Airway Microbial Infections and Correlated Diseases / Y. A. Tsou, M. C. Tung, K. A. Alexander, W. D. Chang // *Biomed. Res. Int.* – 2018. – Vol. 2018. – P. 2021890.
170. De Smet, E. G. Association of innate defense proteins BPIFA1 and BPIFB1 with disease severity in COPD / E. G. De Smet, L. J. M. Seys, F. M., Verhamme [et al.] // *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. – 2017. – Vol. 131. – P. 11–27.
171. Bonser, L. R. Airway Mucus and Asthma: The Role of MUC5AC and MUC5B / L. R. Bonser, D. J. Erle // *J. Clin. Med.* – 2017. – Vol. 6, № 12.
172. Ye, D. Z. Foxa1 and Foxa2 Control the Differentiation of Goblet and Enteroendocrine L- and D-Cells in Mice / D. Z. Ye, K. H. Kaestner // *Gastroenterology*. – 2009. – Vol. 137, № 6. – P. 2052–2062.
173. Rawlins, E. L. The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium / E. L. Rawlins, T. Okubo, Y. Xue [et al.] // *Cell Stem. Cell*. – 2009. – Vol. 4, № 6. – P. 525–534.
174. Xu, J. MYCT1 in cancer development: Gene structure, regulation, and biological implications for diagnosis and treatment / J. Xu, Y. Sun, W. Fu, S. Fu // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2023. – Vol. 165. – P. 115208.
175. Kabir, A. U. Dual role of endothelial Myct1 in tumor angiogenesis and tumor immunity / A. U. Kabir, M. Subramanian // *Sci. Transl. Med.* – 2021. – Vol. 13, № 583.
176. Tatsi, C. The Genetics of Pituitary Adenomas / C. Tatsi, C. A. Stratakis // *J. Clin. Med.* – 2019. – Vol. 9, № 1.
177. Bi, W. L. Genomic landscape of intracranial meningiomas / W. L. Bi, M. Abedalthagafi, P. Horowitz [et al.] // *J. Neurosurg.* – 2016. – Vol. 125, № 3. – P. 525–535.

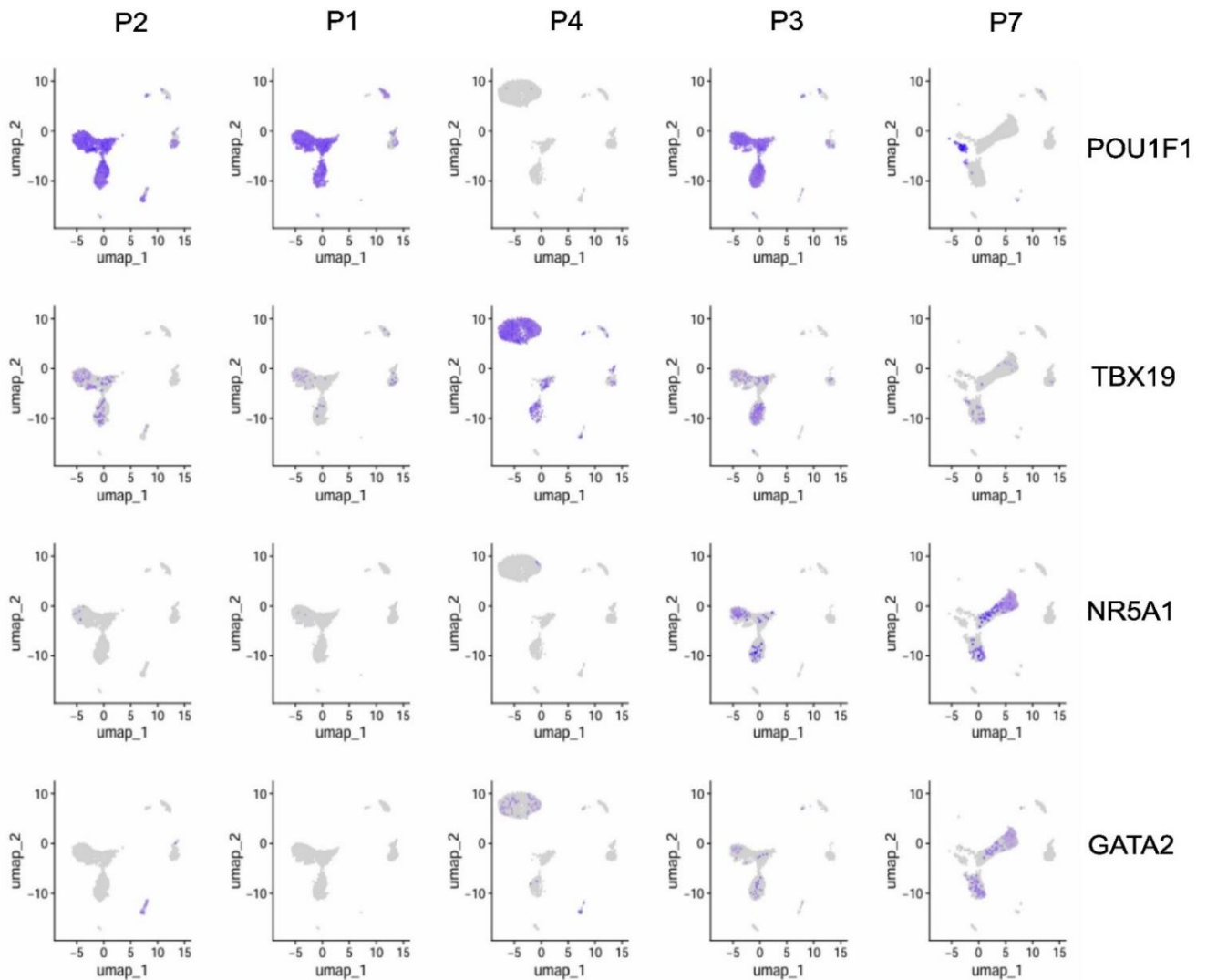
178. Lasolle, H. Chromosomal instability in the prediction of pituitary neuroendocrine tumors prognosis / H. Lasolle, M.-H. Elsensohn, A. Wierinckx [et al.] // *Acta Neuropathologica Communications*. – 2020. – Vol. 8, № 1. – P. 190.

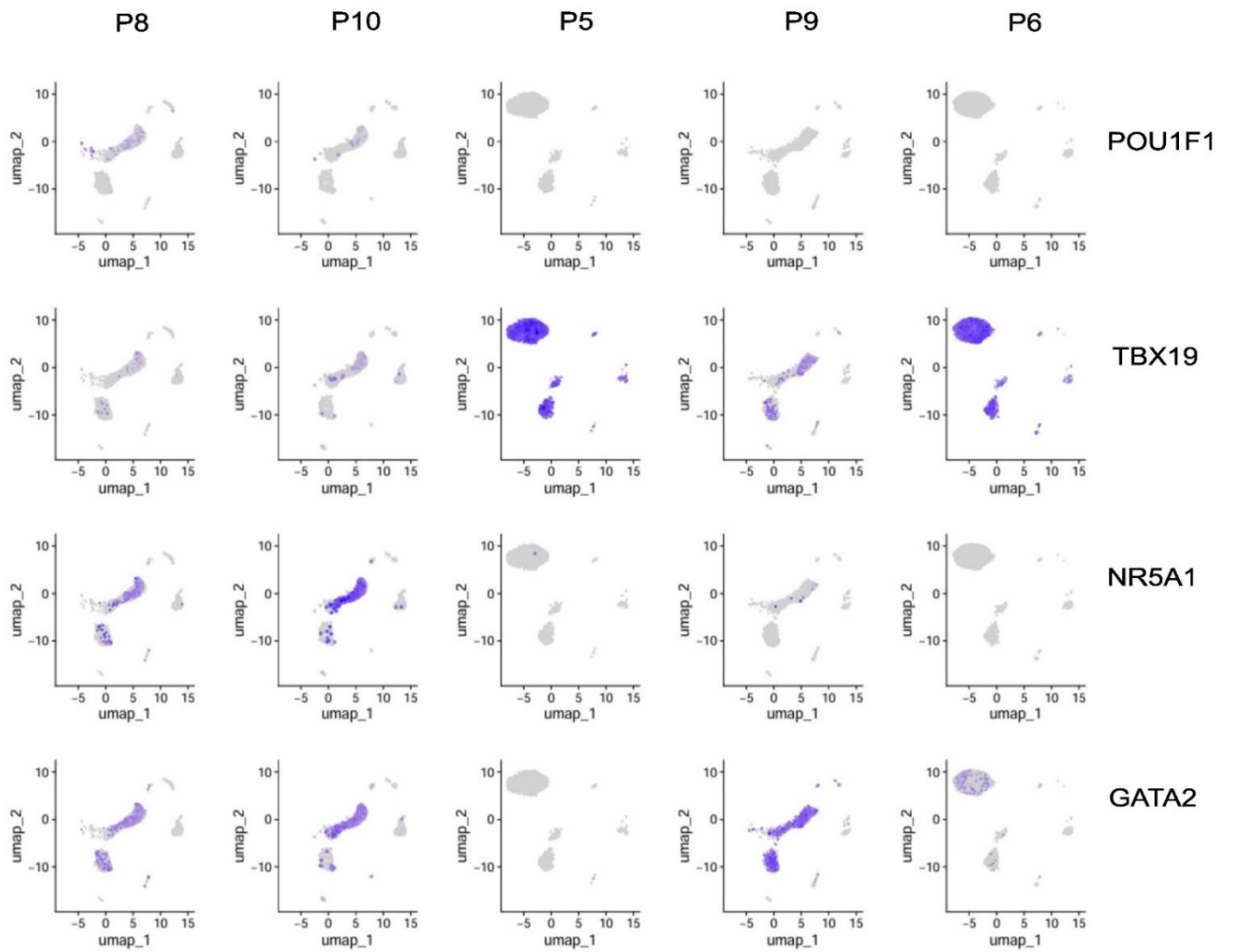
179. Ramms, D. J. Gas-Protein Kinase A (PKA) Pathway Signalopathies: The Emerging Genetic Landscape and Therapeutic Potential of Human Diseases Driven by Aberrant G $\alpha$ s-PKA Signaling / D. J., Ramms F. Raimondi, N. Arang [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2021. – Vol. 73, № 4. – P. 155–197.

## Приложение А

(обязательное).

**Экспрессия основных факторов транскрипции в тканях гипофиза: *POU1F1* для ацидофильной линии (PIT-1), *TBX19* для кортикотропной линии (T-PIT), и *NR5A1* и *GATA2* для гонадотропной линии (SF-1).**





**Рисунок А.1** – Экспрессия основных факторов транскрипции в тканях гипофиза: *POU1F1* для ацидофильной линии (PIT-1), *TBX19* для кортикотропной линии (T-PIT), *NR5A1* и *GATA2* для гонадотропной линии (SF-1)

**Приложение Б  
(обязательное).**

**20 высоко-экспрессирующихся ДЭГ в каждом кластере**

**Таблица Б.1 – 20 высоко-экспрессирующихся ДЭГ в каждом кластере**

<i>Ген</i>	<i>p_val</i>	<i>avg_log2FC</i>	<i>pct.1</i>	<i>pct.2</i>	<i>p_val_adj</i>	<i>Кластер</i>
AC010478.1	1,97E-45	3,274140014	0,037	0,015	7,21971E-41	0
AC092445.1	5,91E-90	3,256192322	0,041	0,011	2,16399E-85	0
AC025871.3	1,41E-21	3,107229885	0,011	0,003	5,1692E-17	0
KCNT2	.3,	3,03750502	0,084	0,024	7,9725E-161	0
TRIM71	6,48E-36	3,011744946	0,018	0,005	2,3725E-31	0
AC011752.1	6,95E-18	2,839926346	0,01	0,003	2,54313E-13	0
ADAMTS19	4,78E-52	2,826508244	0,035	0,013	1,75134E-47	0
AMH	1,05E-66	2,823533975	0,043	0,015	3,84667E-62	0
VWA3A	1,6E-107	2,786258153	0,074	0,026	5,7337E-103	0
LINC02389	9,1E-14	2,774938311	0,013	0,005	3,32909E-09	0
LINC00599	3,81E-11	2,737034955	0,014	0,007	1,39389E-06	0
AC090983.1	7,43E-17	2,723896209	0,013	0,005	2,72112E-12	0
AL513128.1	2,66E-19	2,718488783	0,015	0,005	9,74036E-15	0
COL11A1	8E-50	2,700606602	0,034	0,012	2,92827E-45	0
NTN5	1,47E-26	2,656356555	0,025	0,01	5,38815E-22	0
AP001922.6	7,79E-13	2,640528242	0,01	0,004	2,85096E-08	0
PAPLN	3,14E-92	2,638664965	0,064	0,023	1,1484E-87	0
MIR124-2HG	2E-26	2,62649873	0,027	0,012	7,32676E-22	0
PAPPA-AS1	1,1E-16	2,597164382	0,015	0,006	4,02385E-12	0
VWA5B1	2,5E-37	2,595970669	0,042	0,02	9,15447E-33	0
IGLC2	0,005876	2,643431	0,009	0,013	1	1
CRYGD	1,19E-05	2,130757	0,028	0,02	0,435293	1
GRP	2,79E-10	2,03897	0,041	0,027	1,02E-05	1
C2orf80	3,25E-43	1,85752	0,1	0,056	1,19E-38	1
PLAC9	0,000156	1,782904	0,039	0,031	1	1
GNG3	3,66E-25	1,733216	0,15	0,115	1,34E-20	1

Продолжение таблицы Б.1

<i>Ген</i>	<i>p_val</i>	<i>avg_log2FC</i>	<i>pct.1</i>	<i>pct.2</i>	<i>p_val_adj</i>	<i>Кластер</i>
CSRP2	2,71E-51	1,654465	0,181	0,122	9,91E-47	1
FSHB	3,2E-101	1,630444	0,171	0,085	1,16E-96	1
C5orf66-AS1	7,76E-27	1,610943	0,157	0,119	2,84E-22	1
C1QL1	0,006232	1,607627	0,007	0,01	1	1
PCSK1N	0	1,589763	0,957	0,801	0	1
CD79B	1,97E-52	1,471029	0,15	0,089	7,22E-48	1
IGKC	2,84E-10	1,424231	0,041	0,064	1,04E-05	1
MGARP	2,08E-22	1,41215	0,134	0,099	7,62E-18	1
VMO1	3,91E-55	1,40535	0,179	0,115	1,43E-50	1
GSTP1	0	1,404514	0,785	0,602	0	1
WFDC2	2,5E-107	1,372298	0,371	0,279	9,2E-103	1
IGLC1	7,13E-10	1,371623	0,002	0,01	2,61E-05	1
NME2	1,6E-294	1,317991	0,576	0,437	5,8E-290	1
CALB2	7,17E-05	1,301523	0,082	0,07	1	1
DHRS7C	0	4,605912	0,13	0,005	0	2
APCDD1L-DT	0	4,391952	0,186	0,009	0	2
SCTR	9,9E-270	4,189069	0,046	0,002	3,6E-265	2
AC013275.1	6,32E-80	4,036276	0,013	0,001	2,31E-75	2
VSTM2B	6,4E-140	3,925168	0,024	0,001	2,4E-135	2
APCDD1L	8,4E-142	3,74126	0,026	0,002	3,1E-137	2
AC087591.1	1,21E-49	3,660038	0,01	0,001	4,41E-45	2
NEFL	0	3,484089	0,812	0,126	0	2
BMP3	2,3E-168	3,464777	0,032	0,002	8,4E-164	2
GPR26	1,3E-152	3,343942	0,028	0,002	4,9E-148	2
HS3ST6	3,52E-78	3,314348	0,014	0,001	1,29E-73	2
AIRE	6,25E-53	3,273926	0,011	0,001	2,29E-48	2
AC093585.1	4,51E-61	3,184197	0,012	0,001	1,65E-56	2
EXOC3L4	1,2E-85	3,108414	0,016	0,001	4,39E-81	2
PPP1R17	0	3,066344	0,271	0,021	0	2

Продолжение таблицы Б.1

<i>Ген</i>	<i>p_val</i>	<i>avg_log2FC</i>	<i>pct.1</i>	<i>pct.2</i>	<i>p_val_adj</i>	<i>Кластер</i>
MCCD1	0	3,062556	0,061	0,003	0	2
NEFM	0	3,035973	0,673	0,088	0	2
NDNF	0	3,035806	0,374	0,035	0	2
GRIN2B	0	3,015858	0,15	0,013	0	2
LCN1	0	2,990083	0,113	0,008	0	2
CSH2	4,5E-169	4,493239	0,022	0	1,6E-164	3
AL109610.1	4,58E-87	4,063035	0,011	0	1,67E-82	3
AC005914.1	1,4E-137	3,92193	0,02	0,001	5,1E-133	3
GH1	0	3,439072	0,99	0,238	0	3
SHISA3	3,1E-145	3,347046	0,026	0,001	1,1E-140	3
NRAP	8,6E-189	3,339358	0,029	0,001	3,2E-184	3
RGS6	6,5E-274	3,329672	0,044	0,002	2,4E-269	3
AC093791.1	2,7E-105	3,319411	0,016	0,001	9,9E-101	3
GH2	0	3,301539	0,106	0,004	0	3
LINC02475	0	3,234029	0,221	0,015	0	3
PTF1A	0	3,22278	0,064	0,003	0	3
CFAP77	2,13E-65	3,177574	0,01	0	7,81E-61	3
SALL3	8,04E-89	3,108454	0,014	0,001	2,94E-84	3
CREB3L1	0	3,101628	0,073	0,004	0	3
DLK1	0	3,100346	0,989	0,206	0	3
CT69	3,1E-199	3,05265	0,034	0,002	1,1E-194	3
LINC00488	5,79E-78	3,013272	0,015	0,001	2,12E-73	3
LINC02489	0	3,001252	0,361	0,023	0	3
CD79B	0	2,977392	0,511	0,044	0	3
HS3ST2	2,8E-121	2,952865	0,021	0,001	1E-116	3
CHRM2	7E-148	4,711219	0,023	0,001	2,5E-143	4
FAM240A	3,34E-65	4,591542	0,01	0	1,22E-60	4
EDN3	2,6E-163	4,491605	0,025	0,001	9,6E-159	4
C8orf87	1,01E-70	4,401075	0,011	0	3,69E-66	4



Продолжение таблицы Б.1

<i>Ген</i>	<i>p_val</i>	<i>avg_log2FC</i>	<i>pct.1</i>	<i>pct.2</i>	<i>p_val_adj</i>	<i>Кластер</i>
PTGFR	0	4,385935	0.11	0,004	0	4
AL355306.2	9,8E-206	4,348238	0,03	0,001	3,6E-201	4
LINC00378	3,29E-87	4,33331	0,013	0	1,2E-82	4
RSPO2	9,7E-135	4,151945	0,022	0,001	3,6E-130	4
XKR3	2,9E-113	4,131414	0,018	0,001	1,1E-108	4
TACR3	0	4,125589	0,084	0,004	0	4
CST1	5,3E-205	4,077175	0,041	0,003	1,9E-200	4
CYP3A4	0	3,97122	0,101	0,005	0	4
VWC2	0	3,965451	0,094	0,004	0	4
PCDH20	0	3,960926	0,197	0,014	0	4
C6	1,05E-81	3,957034	0,014	0,001	3,84E-77	4
TRDN	0	3,956544	0,328	0,031	0	4
AC105460.2	2,3E-165	3,939	0,027	0,001	8,5E-161	4
BMP7	0	3,926313	0,078	0,004	0	4
GP2	5,22E-60	3,895988	0,011	0,001	1,91E-55	4
AZGP1	9,3E-143	3,847374	0,029	0,002	3,4E-138	4
FOLR1	0	3,254214	0,223	0,03	0	5
GUCA1C	0	3,167252	0,142	0,017	0	5
LHB	1,1E-257	3,036935	0,117	0,02	4,1E-253	5
GATA3-AS1	0	3,018945	0,242	0,034	0	5
FAM242C	9,7E-211	3,012025	0,07	0,009	3,6E-206	5
TAC4	0	2,997423	0,138	0,021	0	5
AANAT	2,3E-89	2,929699	0,035	0,005	8,43E-85	5
NPPC	2,2E-108	2,923128	0,041	0,006	7,9E-104	5
VSNL1	3,72E-27	2,911815	0,016	0,003	1,36E-22	5
RAMP1	0	2,901582	0,235	0,034	0	5
BPIFA2	5,35E-36	2,896687	0,019	0,004	1,96E-31	5
MGARP	0	2,889039	0,456	0,073	0	5
PLA2G1B	3,3E-212	2,887108	0,099	0,018	1,2E-207	5

Продолжение таблицы Б.1

<i>Ген</i>	<i>p_val</i>	<i>avg_log2FC</i>	<i>pct.1</i>	<i>pct.2</i>	<i>p_val_adj</i>	<i>Кластер</i>
PANCR	0	2,876353	0,197	0,032	0	5
RESP18	1,1E-97	2,842888	0,048	0,009	4,02E-93	5
C16orf74	5,6E-155	2,818487	0,067	0,011	2E-150	5
AC098798,1	1,2E-157	2,768236	0,074	0,013	4,4E-153	5
CRABP1	0	2,763072	0,215	0,038	0	5
SLC10A4	0	2,761023	0,44	0,076	0	5
TNFRSF11B	1,48E-46	2,742089	0,023	0,004	5,41E-42	5
AL354771.1	1,77E-97	5,336899	0,011	0	6,48E-93	6
HMGA2-AS1	1,5E-155	3,753456	0,024	0,001	5,5E-151	6
MC3R	2,9E-111	3,693691	0,016	0	1,1E-106	6
LINC01456	9,75E-81	3,659066	0,012	0	3,57E-76	6
SLITRK3	0	3,442517	0,051	0,001	0	6
KCNQ5-AS1	2,6E-212	3,375585	0,038	0,001	9,4E-208	6
LINC02612	0	3,237225	0,089	0,003	0	6
AL133163.3	1,6E-153	3,210266	0,026	0,001	6E-149	6
PGR	0	3,13954	0,167	0,005	0	6
FSHB	0	3,09425	0,567	0,066	0	6
CNGA1	0	3,083624	0,232	0,011	0	6
RERG-AS1	1,03E-73	3,052327	0,011	0	3,75E-69	6
NR5A1	0	3,028954	0,301	0,015	0	6
C7	0	3,024356	0,236	0,014	0	6
RLN3	1,2E-103	2,98035	0,018	0,001	4,3E-99	6
NR0B1	0	2,965912	0,146	0,006	0	6
LHB	0	2,959731	0,228	0,015	0	6
PNMA6F	0	2,945355	0,111	0,004	0	6
SPINK4	4,64E-71	2,9442	0,019	0,001	1,7E-66	6
AL354771.1	1,77E-97	5,336899	0,011	0	6,48E-93	6
HMGA2-AS1	1,5E-155	3,753456	0,024	0,001	5,5E-151	6
AC013391.3	0	3,943556	0,2	0,022	0	7

Продолжение таблицы Б.1

<i>Ген</i>	<i>p_val</i>	<i>avg_log2FC</i>	<i>pct.1</i>	<i>pct.2</i>	<i>p_val_adj</i>	<i>Кластер</i>
AC092944.3	1,16E-24	3,561746	0,013	0,002	4,24E-20	7
ADRA2B	9,44E-21	3,417811	0,01	0,001	3,46E-16	7
AC069277.1	5E-118	3,3745	0,064	0,01	1,8E-113	7
LINC01035	6,6E-35	3,32636	0,017	0,002	2,41E-30	7
DNAJC22	1,8E-18	3,270911	0,013	0,003	6,57E-14	7
PROSER2-AS1	9,38E-19	3,207035	0,012	0,002	3,43E-14	7
AC135782.1	2,64E-32	3,182626	0,018	0,003	9,66E-28	7
PKD1L1	1,9E-112	3,156082	0,083	0,017	7,1E-108	7
AC079298.3	2,48E-54	3,150584	0,029	0,004	9,08E-50	7
COL28A1	0	3,045064	0,668	0,13	0	7
AC100803.4	1,5E-304	2,979484	0,208	0,041	5,4E-300	7
ACTN2	1,61E-25	2,953182	0,017	0,003	5,89E-21	7
NPTX1	0	2,890527	0,391	0,076	0	7
POTEJ	5,09E-15	2,857658	0,011	0,002	1,86E-10	7
CTSE	1,36E-33	2,848776	0,025	0,005	4,97E-29	7
PCDH15	1,57E-11	2,794084	0,011	0,003	5,76E-07	7
MINAR1	1E-261	2,789865	0,221	0,052	3,8E-257	7
RAB7B	1,3E-100	2,785652	0,065	0,012	4,7E-96	7
LINC01645	9,8E-154	11,74064	0,016	0	3,6E-149	8
LINC02705	1,43E-90	11,10854	0,01	0	5,25E-86	8
AP000439.2	0	10,95548	0,047	0	0	8
AC110995.1	0	10,65719	0,068	0	0	8
AC011139.1	0	10,49711	0,046	0	0	8
AP005530.1	5,3E-198	10,49369	0,021	0	2E-193	8
LILRB5	0	10,41248	0,081	0	0	8
CYTL1	0	10,16173	0,137	0	0	8
FOLR2	0	10,12618	0,484	0,001	0	8
P2RY12	0	9,949487	0,196	0	0	8
AC243960.3	9,6E-104	9,823401	0,012	0	3,5E-99	8

Продолжение таблицы Б.1

<i>Ген</i>	<i>p_val</i>	<i>avg_log2FC</i>	<i>pct.1</i>	<i>pct.2</i>	<i>p_val_adj</i>	<i>Кластер</i>
SPP1	0	9,687677	0,231	0,002	0	8
CD5L	2,2E-121	9,653738	0,02	0	8,2E-117	8
	0	9,599443	0,054	0	0	8
CCL13	1,1E-169	9,553541	0,033	0	4,1E-165	8
AL162414.1	2,1E-148	9,519982	0,017	0	7,8E-144	8
SLC2A5	0	9,342414	0,169	0	0	8
APOE	0	9,233368	0,953	0,007	0	8
SLC1A3	0	9,164214	0,448	0,002	0	8
TMIGD3	0	9,138037	0,129	0,001	0	8
HBD	9,42E-20	3,250511	0,039	0,012	3,45E-15	9
HBM	7,11E-10	3,043279	0,029	0,011	2,6E-05	9
AGTR1	2,88E-07	2,826862	0,011	0,003	0,010539	9
GNG8	0,001116	2,816033	0,011	0,005	1	9
AHSP	2,74E-08	2,760846	0,021	0,008	0,001002	9
ALAS2	4,64E-10	2,709256	0,014	0,004	1,7E-05	9
CA1	3,61E-13	2,676276	0,029	0,01	1,32E-08	9
AL096865.1	3,61E-18	2,622915	0,029	0,007	1,32E-13	9
AZGP1	2,64E-07	2,571163	0,014	0,005	0,009679	9
BMP7	3,56E-18	2,507576	0,037	0,011	1,3E-13	9
FZD9	2,1E-09	2,485079	0,022	0,008	7,7E-05	9
AL355306.2	3,69E-05	2,427684	0,011	0,004	1	9
VWC2	3,02E-21	2,418255	0,042	0,013	1,11E-16	9
TRIM29	0,000453	2,409504	0,019	0,009	1	9
MUCL1	7,18E-10	2,406873	0,018	0,005	2,63E-05	9
HBG2	4,64E-07	2,401566	0,01	0,003	0,01698	9
BBOX1	1,13E-28	2,398524	0,082	0,03	4,13E-24	9
RSPO2	3,68E-06	2,369201	0,01	0,003	0,134746	9
STXBP6	3,07E-12	2,360906	0,037	0,014	1,12E-07	9
HBD	9,42E-20	3,250511	0,039	0,012	3,45E-15	9

Продолжение таблицы Б.1

<i>Ген</i>	<i>p_val</i>	<i>avg_log2FC</i>	<i>pct.1</i>	<i>pct.2</i>	<i>p_val_adj</i>	<i>Кластер</i>
PRL	0	10,20391	0,768	0,064	0	10
AC003092.2	6,61E-77	6,629619	0,012	0	2,42E-72	10
CCN3	0	5,766306	0,266	0,006	0	10
AC003092.1	2,2E-147	5,702974	0,028	0	8,1E-143	10
PDGFRA	3,3E-111	5,277455	0,032	0,001	1,2E-106	10
TFPI2	0	5,224339	0,303	0,013	0	10
CST6	0	5,202571	0,244	0,01	0	10
PGM5P4-AS1	6E-140	5,157063	0,035	0,001	2,2E-135	10
TRPM8	5,9E-170	4,984152	0,048	0,001	2,2E-165	10
LHX9	9,5E-119	4,983268	0,035	0,001	3,5E-114	10
HTR4	1E-178	4,96312	0,044	0,001	3,6E-174	10
NTS	1,8E-149	4,860681	0,152	0,017	6,7E-145	10
AL033539.2	4E-155	4,773222	0,052	0,002	1,5E-150	10
PCK1	0	4,555444	0,243	0,013	0	10
ANGPT1	0	4,554134	0,407	0,02	0	10
AL033504.1	3,01E-57	4,424408	0,015	0,001	1,1E-52	10
TMEM132D	6,6E-87	4,411199	0,026	0,001	2,42E-82	10
THBS2	0	4,360029	0,387	0,024	0	10
LINC01485	2,1E-124	4,336462	0,041	0,001	7,8E-120	10
CALCR	7,08E-65	4,329147	0,024	0,001	2,59E-60	10
CD40LG	0	12,48713	0,068	0	0	11
TRGV9	5,1E-168	12,43479	0,017	0	1,9E-163	11
KIR2DL3	1E-108	12,06796	0,011	0	3,8E-104	11
TRGV10	5,8E-133	11,59474	0,014	0	2,1E-128	11
LINC00892	0	11,4542	0,058	0	0	11
EOMES	0	11,14044	0,085	0	0	11
IL2RB	0	11,09501	0,174	0	0	11
GZMK	0	11,08151	0,338	0	0	11
IFNG	3,8E-207	11,02733	0,024	0	1,4E-202	11

Продолжение таблицы Б.1

<i>Ген</i>	<i>p_val</i>	<i>avg_log2FC</i>	<i>pct.1</i>	<i>pct.2</i>	<i>p_val_adj</i>	<i>Кластер</i>
FCRL3	0	10,94821	0,043	0	0	11
CD2	0	10,72573	0,576	0,001	0	11
CD3G	0	10,712	0,454	0,001	0	11
KLRB1	0	10,63535	0,3	0	0	11
CD3E	0	10,62341	0,415	0,001	0	11
FGFBP2	0	10,59546	0,105	0	0	11
CD3D	0	10,50506	0,502	0,001	0	11
CCR9	3,7E-149	10,41737	0,02	0	1,4E-144	11
SH2D1A	0	10,41236	0,122	0	0	11
LINC02446	1,6E-164	10,26848	0,023	0	5,8E-160	11
TRAT1	0	10,24749	0,099	0	0	11
CD74	0	4,194687	0,949	0,048	0	12
HLA-DRA	0	4,496764	0,927	0,04	0	12
HLA-DRB1	0	4,512127	0,911	0,042	0	12
CYBA	0	4,378444	0,917	0,058	0	12
TYROBP	0	4,481238	0,853	0,033	0	12
VIM	0	4,953036	0,838	0,037	0	12
HLA-DPA1	0	4,387396	0,829	0,042	0	12
HLA-DRB5	0	4,363018	0,821	0,041	0	12
CTSS	0	5,953854	0,812	0,033	0	12
HLA-DPB1	0	4,647943	0,825	0,05	0	12
SRGN	0	4,62616	0,8	0,037	0	12
AIF1	0	4,726181	0,776	0,03	0	12
LYZ	0	8,418664	0,744	0,011	0	12
IFI30	0	5,853498	0,748	0,034	0	12
PTPRC	0	4,235419	0,77	0,064	0	12
HLA-E	0	3,591543	0,765	0,06	0	12
FCER1G	0	4,516654	0,723	0,028	0	12
FGL2	0	5,165849	0,716	0,025	0	12

Продолжение таблицы Б.1

<i>Ген</i>	<i>p_val</i>	<i>avg_log2FC</i>	<i>pct.1</i>	<i>pct.2</i>	<i>p_val_adj</i>	<i>Кластер</i>
ARPC1B	0	3,952141	0,853	0,167	0	12
AC131025,2	7,6E-210	12,35037	0,028	0	2,8E-205	13
ABCC9	0	12,03829	0,704	0,001	0	13
CD248	0	11,8216	0,157	0	0	13
RASL12	0	11,52958	0,13	0	0	13
COX4I2	0	11,02561	0,588	0,001	0	13
TDRD1	8,3E-213	10,7178	0,023	0	3E-208	13
AC019270.1	0	10,62933	0,104	0	0	13
EDNRA	0	10,61821	0,438	0	0	13
HIGD1B	0	10,59123	0,718	0,002	0	13
DLX5	0	10,49591	0,09	0	0	13
RGS5	0	10,37483	0,956	0,008	0	13
KCNJ8	0	10,31397	0,347	0,001	0	13
DIPK1C	9,6E-166	10,20668	0,025	0	3,5E-161	13
FMO1	0	10,17243	0,049	0	0	13
CARMN	0	10,06822	0,759	0,003	0	13
TCF21	0	10,06422	0,09	0	0	13
SOD3	0	10,05371	0,303	0,001	0	13
FOXS1	0	10,01185	0,229	0	0	13
CDH6	0	9,909274	0,403	0,001	0	13
NOTCH3	0	9,798508	0,576	0,001	0	13
KIF20A	0	8,560573	0,094	0	0	14
IL37	1,5E-106	8,556272	0,013	0	5,6E-102	14
IQGAP3	0	8,348549	0,14	0,001	0	14
PBK	0	8,27765	0,482	0,002	0	14
UBE2C	0	8,121915	0,414	0,003	0	14
ASPM	0	7,912207	0,489	0,006	0	14
TOP2A	0	7,76582	0,583	0,004	0	14
CCNB2	0	7,759697	0,362	0,002	0	14

Продолжение таблицы Б.1

<i>Ген</i>	<i>p_val</i>	<i>avg_log2FC</i>	<i>pct.1</i>	<i>pct.2</i>	<i>p_val_adj</i>	<i>Кластер</i>
HJURP	0	7,730131	0,238	0,001	0	14
MKI67	0	7,684813	0,511	0,003	0	14
CDC20	0	7,666738	0,28	0,002	0	14
DLGAP5	0	7,649457	0,306	0,002	0	14
KIF23	0	7,647398	0,241	0,002	0	14
CENPA	0	7,626445	0,212	0,001	0	14
CKAP2L	0	7,583814	0,29	0,001	0	14
PIMREG	0	7,526424	0,127	0,001	0	14
KIF18B	0	7,505557	0,117	0,001	0	14
AURKB	0	7,493488	0,248	0,001	0	14
TROAP	0	7,479678	0,244	0,002	0	14
CDC25C	0	7,351987	0,15	0,001	0	14
AC119424.1	1,29E-61	7,933331309	0,01	0	4,72754E-57	15
SLC6A18	7,11E-77	7,065994803	0,01	0	2,60234E-72	15
PLCH1-AS1	7,11E-77	7,00625438	0,01	0	2,60234E-72	15
AC097105.1	7,11E-77	6,950428387	0,01	0	2,60234E-72	15
TAC1	4,9E-31	6,948663691	0,01	0	1,79493E-26	15
FAM71A	2,79E-60	6,544793083	0,017	0	1,02032E-55	15
AC115676.1	5,4E-119	6,437980121	0,027	0	1,9663E-114	15
SMLR1	4,94E-31	6,108292175	0,01	0	1,80918E-26	15
AC005330.1	6,99E-89	5,79891886	0,027	0	2,558E-84	15
AC019117.1	6,35E-26	5,771728282	0,01	0	2,32325E-21	15
LINC00466	1,96E-34	5,766225195	0,01	0	7,18524E-30	15
CGB7	4,97E-31	5,726649037	0,01	0	1,81995E-26	15
COL4A2-AS2	1,96E-34	5,693077211	0,01	0	7,18524E-30	15
AC078864.1	1,99E-51	5,684923875	0,01	0	7,27322E-47	15
AC009088.2	4,94E-31	5,58800038	0,01	0	1,80918E-26	15
Z94160.2	1,19E-77	5,587707558	0,013	0	4,34612E-73	15
LRRC31	1,96E-34	5,578119028	0,01	0	7,16944E-30	15



## Продолжение таблицы Б.1

<i>Ген</i>	<i>p_val</i>	<i>avg_log2FC</i>	<i>pct.1</i>	<i>pct.2</i>	<i>p_val_adj</i>	<i>Кластер</i>
C5orf52	2,01E-51	5,486899124	0,01	0	7,34592E-47	15
AC138854.1	2,58E-86	5,478544739	0,023	0	9,43038E-82	15
AP006287.3	1,96E-34	5,411119697	0,01	0	7,18524E-30	15
BX276092.9	2,34E-64	8,25381	0,01	0	8,57E-60	16
ARID3C	2,69E-80	7,41642	0,01	0	9,85E-76	16
AL133334.1	4,15E-46	6,243863	0,01	0	1,52E-41	16
AC005034.2	5,1E-25	6,10431	0,01	0	1,87E-20	16
CLDN8	4,18E-46	5,985758	0,01	0	1,53E-41	16
IGF2-AS	1,03E-53	5,933096	0,01	0	3,78E-49	16
AC005920.4	2,14E-97	5,704353	0,021	0	7,84E-93	16
LINC01433	1,59E-73	5,701706	0,017	0	5,83E-69	16
AC087620.1	3,3E-71	5,352898	0,024	0	1,21E-66	16
AF096876.1	7,53E-68	5,324112	0,017	0	2,76E-63	16
LINC01983	4,54E-55	5,234765	0,017	0	1,66E-50	16
NGFR	0	5,124118	0,552	0,007	0	16
AC138965.2	9,1E-112	5,005864	0,028	0	3,3E-107	16
AC091180.3	3E-99	4,954144	0,038	0,001	1,08E-94	16
AL355596.2	2,98E-23	4,953582	0,01	0	1,09E-18	16
AC090709.1	9,66E-55	4,905108	0,021	0	3,54E-50	16
AL035420.2	4,59E-27	4,878506	0,01	0	1,68E-22	16
AP002957.1	1,32E-40	4,86746	0,014	0	4,83E-36	16
AC006019.3	1,72E-29	4,866894	0,01	0	6,3E-25	16
AL136114.1	2,79E-95	4,846679	0,024	0	1,02E-90	16
BPIFA1	3,11E-68	15,76314816	0,062	0	1,14E-63	17
SCGB1A1	1,81E-18	14,72123377	0,062	0	6,61E-14	17
KRT7	0	13,56090377	0,381	0	0	17
MUC16	0	13,12152713	0,102	0	0	17
BPIFB1	3,2E-305	12,98184283	0,08	0	1,2E-300	17
FOXA2	0	12,94233328	0,084	0	0	17

Продолжение таблицы Б.1

<i>Ген</i>	<i>p_val</i>	<i>avg_log2FC</i>	<i>pct.1</i>	<i>pct.2</i>	<i>p_val_adj</i>	<i>Кластер</i>
BPIFB2	3,6E-244	12,9110044	0,031	0	1,3E-239	17
SERPINA3	0	12,75929447	0,553	0,001	0	17
KRT4	1,7E-187	12,63419008	0,022	0	6,2E-183	17
MUC5AC	3,2E-102	12,49169364	0,022	0	1,16E-97	17
BPIFB4	0	12,36845763	0,181	0	0	17
PLEKHS1	0	12,11394523	0,102	0	0	17
SERPINB11	5,4E-225	12,07966445	0,022	0	2E-220	17
CXCL6	4,3E-302	11,88927205	0,04	0	1,6E-297	17
SLC6A14	0	11,86597922	0,332	0	0	17
AC108734.4	5,4E-225	11,85530868	0,022	0	2E-220	17
LCN2	0	11,84146685	0,412	0,001	0	17
VTCN1	0	11,7363866	0,102	0	0	17
PIP	0	11,60583317	0,066	0	0	17
LINC01097	8,2E-136	11,57255759	0,013	0	3E-131	17
HAPLN1	3,7E-194	12,61363	0,029	0	1,3E-189	18
SLC25A34-AS1	4,6E-156	11,47087	0,019	0	1,7E-151	18
LINC00840	1,8E-218	10,99085	0,029	0	6,4E-214	18
LINC02152	4,2E-130	10,53408	0,019	0	1,5E-125	18
LRRC55	5,31E-66	10,46523	0,01	0	1,94E-61	18
APLNR	0	10,37998	0,115	0	0	18
GPR17	2,97E-63	10,33199	0,014	0	1,09E-58	18
CCL14	0	10,31005	0,359	0,001	0	18
HOXD9	0	10,14595	0,091	0	0	18
AL590226.1	0	10,0653	0,081	0	0	18
ADGRL4	0	9,953125	0,632	0,001	0	18
AC103718.1	5,68E-40	9,910834	0,01	0	2,08E-35	18
CLEC14A	0	9,902978	0,617	0,002	0	18
AC073257.2	5,68E-40	9,898022	0,01	0	2,08E-35	18
TNFRSF10A-AS1	5,31E-66	9,863872	0,01	0	1,94E-61	18

Продолжение таблицы Б.1

<i>Ген</i>	<i>p_val</i>	<i>avg_log2FC</i>	<i>pct.1</i>	<i>pct.2</i>	<i>p_val_adj</i>	<i>Кластер</i>
MYCT1	0	9,783879	0,344	0,001	0	18
CDH5	0	9,772702	0,402	0,001	0	18
ECSCR	0	9,749567	0,373	0,001	0	18
AL450344.2	1,88E-33	9,670441	0,01	0	6,87E-29	18
ERG	0	9,614409	0,249	0,001	0	18
C10orf62	1,22E-38	8,27482	0,017	0	4,45E-34	19
OR1N2	2,9E-16	7,080857	0,017	0	1,06E-11	19
CLPSL1	6,41E-13	6,038939	0,017	0,001	2,35E-08	19
AC079336.2	1,24E-07	5,67186	0,017	0,001	0,004528	19
LHX2	8,73E-12	5,669558	0,025	0,001	3,2E-07	19
AC079949.3	1,43E-13	5,546181	0,025	0,001	5,22E-09	19
LINC00612	5,54E-11	5,497499	0,025	0,001	2,03E-06	19
AC087612.1	4,43E-20	5,474379	0,042	0,002	1,62E-15	19
MC4R	2,36E-05	5,370628	0,017	0,002	0,864812	19
IL31RA	1,13E-09	5,349961	0,025	0,002	4,15E-05	19
AC020659.2	3,18E-09	5,313075	0,017	0,001	0,000117	19
AC126182.3	3,19E-07	5,301202	0,017	0,001	0,011673	19
CNNM3-DT	1,3E-11	5,236667	0,025	0,001	4,75E-07	19
AC025871.1	8,26E-09	5,131064	0,017	0,001	0,000302	19
CPXM2	5,99E-60	5,083004	0,142	0,007	2,19E-55	19
TNNT3	4,91E-05	5,047472	0,017	0,002	1	19
AC124798.2	6,25E-08	5,004491	0,017	0,001	0,002287	19
INSYN2A	1,87E-06	4,891074	0,025	0,002	0,068471	19
CACNA1I	1,59E-06	4,861164	0,017	0,001	0,058084	19
AC002511.2	2,5E-114	12,1886	0,011	0	9,2473E-110	20
AC010163.2	4,86E-39	11,24256	0,011	0	1,77874E-34	20
CYP2C9	4,86E-39	11,08874	0,011	0	1,77874E-34	20
AC008154.2	6,88E-58	10,98668	0,011	0	2,51701E-53	20
AL445123.1	6,88E-58	10,70108	0,011	0	2,51701E-53	20

## Продолжение таблицы Б.1

<i>Ген</i>	<i>p_val</i>	<i>avg_log2FC</i>	<i>pct.1</i>	<i>pct.2</i>	<i>p_val_adj</i>	<i>Кластер</i>
KCNQ1DN	1.35E-29	9,645686	0,011	0	4,93141E-25	20
AC006058.1	2,4E-91	9,631629	0,022	0	8,77271E-87	20
AL161645.2	3,96E-20	9,433617	0,011	0	1,44881E-15	20
AC064843.1	1,35E-29	9,328049	0,011	0	4,93141E-25	20
AC138466.1	6,88E-58	9,22734	0,011	0	2,51701E-53	20
AC011491.3	6,4E-24	8,443384	0,011	0	2,34154E-19	20
AL512634.1	3,96E-20	8,398244	0,011	0	1,44881E-15	20
AL449423.1	4,71E-42	8,046461	0,022	0	1,7255E-37	20
WNK4	1,63E-12	7,967759	0,011	0	5,95675E-08	20
AC025031.2	1,8E-11	7,908707	0,011	0	6,58689E-07	20
AC097480.1	1,8E-11	7,799013	0,011	0	6,58689E-07	20
AC114401.1	1,34E-10	7,79227	0,011	0	4,8977E-06	20
OR4K17	1,34E-10	7,780998	0,011	0	4,8977E-06	20
OR1J1	8,67E-14	7,711228	0,011	0	3,17501E-09	20
AC016822.1	1,63E-12	7,704574	0,011	0	5,95675E-08	20