

doi 10.18699/vjgb-25-102

Реконструкция и анализ генной сети регуляции апоптоза при гепатоцеллюлярной карциноме на основе данных scRNA-seq и базы знаний ANDSystem

А.В. Адамовская  , И.В. Яцык  , М.А. Клещев  , П.С. Деменков  ,
Т.В. Иванисенко  , В.А. Иванисенко  

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 adamovskayaav@bionet.nsc.ru

Аннотация. Гепатоцеллюлярная карцинома – наиболее распространенный первичный рак печени, характеризующийся быстрым прогрессированием, высокой летальностью и устойчивостью к терапии. Одним из ключевых направлений в изучении молекулярных механизмов развития гепатоцеллюлярной карциномы является анализ нарушений процессов апоптоза в гепатоцитах. На протяжении всей жизни благодаря апоптозу происходит элиминация старых и дефектных клеток, тогда как ослабление апоптотической гибели служит одним из ведущих факторов канцерогенеза. В настоящем исследовании выполнены реконструкция и анализ генной сети регуляции апоптоза гепатоцитов у человека на основе данных секвенирования транскриптома одиночных клеток (scRNA-seq) и базы знаний ANDSystem, использующей методы искусственного интеллекта и компьютерной системной биологии. Сравнительный анализ экспрессии генов показал ослабление транскрипции генов, вовлеченных в регуляцию воспалительных процессов и апоптоза, в опухолевых гепатоцитах по сравнению с гепатоцитами нормальной ткани печени. Реконструированная сеть включала 116 дифференциально экспрессирующихся генов, аннотированных в Gene Ontology как гены, вовлеченные в процесс апоптоза (apoptotic process GO:0006915), 116 соответствующих белков, а также 16 дополнительных белков, не имеющих GO-аннотации, но дифференциально экспрессируемых при гепатоцеллюлярной карциноме и вовлеченных во взаимодействия с генами и белками, участвующими в процессе апоптоза. Компьютерный анализ генной сети выявил ряд ключевых белков – продуктов генов *NFKB1*, *MMP9*, *BCL2*, *A4*, *CDN1A*, *CDK1*, *ERBB2*, *G3P*, *MCL1*, *FOXO1*, демонстрирующих как высокое число связей с другими объектами сети, так и дифференциальную экспрессию при гепатоцеллюлярной карциноме. Особый интерес представляют белки *CDKN1A*, *ERBB2*, *IL8* и *EGR1*, не аннотированные в Gene Ontology как участники апоптоза, но обладающие статистически значимым числом взаимодействий с генами, вовлеченными в апоптоз, что указывает на их роль в регуляции программируемой клеточной гибели. Полученные результаты могут найти применение для планирования новых экспериментов по изучению роли апоптоза в канцерогенезе и поиска новых мишней и подходов для терапии гепатоцеллюлярной карциномы, основанных на модуляции апоптоза в злокачественных гепатоцитах. Предложенный подход к реконструкции и анализу генной сети регуляции апоптоза при гепатоцеллюлярной карциноме может быть использован для анализа других форм опухолей и дает системное представление о нарушениях ключевых регуляторных процессов в онкогенезе и потенциальных мишениях для терапии.

Ключевые слова: гепатоцеллюлярная карцинома; транскриптомика одиночных клеток; апоптоз; генные сети; когнитивная система ANDSystem

Для цитирования: Адамовская А.В., Яцык И.В., Клещев М.А., Деменков П.С., Иванисенко Т.В., Иванисенко В.А. Реконструкция и анализ генной сети регуляции апоптоза при гепатоцеллюлярной карциноме на основе данных scRNA-seq и базы знаний ANDSystem. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(7):963-977. doi 10.18699/vjgb-25-102

Финансирование. Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0020.

Reconstruction and analysis of the gene network regulating apoptosis in hepatocellular carcinoma based on scRNA-seq data and the ANDSystem knowledge base

A.V. Adamovskaya  , I.V. Yatsyk  , M.A. Kleshchev  , P.S. Demenkov  ,
T.V. Ivanisenko  , V.A. Ivanisenko  

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 adamovskayaav@bionet.nsc.ru

Abstract. Hepatocellular Carcinoma (HCC) is the most common primary liver cancer characterized by rapid progression, high mortality rate and therapy resistance. One of the key areas in studying the molecular mechanisms of HCC development is the analysis of disturbances in apoptosis processes in hepatocytes. Throughout life apoptosis ensures the elimination of old and defective cells while the attenuation of this process serves as one of the leading factors in carcinogenesis. In this study we reconstructed and analyzed the gene network regulating hepatocyte apoptosis in humans based on single-cell transcriptome sequencing (scRNA-seq) data and the ANDSystem knowledge base which employs artificial intelligence and computational systems biology methods. Comparative analysis of gene expression revealed weakened transcription of genes involved in the regulation of inflammatory processes and apoptosis in tumor hepatocytes compared to hepatocytes of normal liver tissue. The reconstructed network included 116 differentially expressed genes annotated in Gene Ontology as genes involved in the apoptotic process (apoptotic process GO:0006915), along with their 116 corresponding protein products. It also included 16 additional proteins that, while lacking GO apoptosis annotation, were differentially expressed in HCC and interacting with genes and proteins participating in the apoptosis process. Computational analysis of the gene network identified several key protein products encoded by the genes *NFKB1*, *MMP9*, *BCL2*, *A4*, *CDKN1A*, *CDK1*, *ERBB2*, *G3P*, *MCL1*, *FOXO1*. These proteins exhibited both a high degree of connectivity with other network objects and differential expression in HCC. Of particular interest are proteins *CDKN1A*, *ERBB2*, *IL8*, and *EGR1*, which are not annotated in Gene Ontology as apoptosis participants but have a statistically significant number of interactions with genes involved in apoptosis. This indicates their role in regulating programmed cell death. The obtained results can guide the design of new experiments studying the role of apoptosis in carcinogenesis and aid in the search for novel therapeutic targets and approaches for HCC therapy using apoptosis modulation in malignant hepatocytes. Furthermore, the proposed approach to reconstructing and analyzing the apoptosis regulation gene network in hepatocellular carcinoma can be applied to analyze other tumor forms providing a systemic understanding of disturbances in key regulatory processes in oncogenesis and potential therapy targets.

Key words: hepatocellular carcinoma; single cell transcriptomics; apoptosis; gene networks; cognitive system ANDSystem

For citation: Adamovskaya A.V., Yatsyk I.V., Kleshchev M.A., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Ivanisenko V.A. Reconstruction and analysis of the gene network regulating apoptosis in hepatocellular carcinoma based on scRNA-seq data and the ANDSystem knowledge base. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(7): 963-977. doi 10.18699/vjgb-25-102

Введение

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) является наиболее распространенным первичным раком печени, возникающим в результате злокачественной трансформации гепатоцитов. От этого заболевания в мире ежегодно умирает около 750 тыс. человек (Ganesan, Kulik, 2023). Данный вид злокачественной опухоли отличается высокой резистентностью к противоопухолевым препаратам и высокой частотой рецидивов (Zou et al., 2025), что обуславливает актуальность изучения как молекулярных механизмов опухолевого процесса, так и возникновения резистентности опухоли и на этой основе – поиска мишенией для противоопухолевых препаратов. К числу факторов риска развития ГЦК относятся, в первую очередь, хроническое инфицирование вирусами гепатита В и С, алкогольный цирроз печени и неалкогольный стеатогепатит; другие известные факторы риска развития ГЦК включают ожирение, сахарный диабет 2 типа и курение табака (Ogunwobi et al., 2019).

Вирусные инфекции и/или неблагоприятные факторы окружающей среды (воздействие гепатотоксических агентов) вызывают изменения в функционировании ряда сигнальных путей в гепатоцитах, что приводит к их злокачественному перерождению и развитию ГЦК. Установлено, что белок HBx (Hepatitis B virus X protein), кодируемый геномом вируса гепатита В, подавляет активность проапоптотического белка p53, reparацию ДНК и активирует ряд сигнальных каскадов: STAT, NF-κB, AP-1 и т. д., вовлеченных в пролиферацию и выживание клеток, стимулируя прогрессирование ГЦК (Jiang Y. et al., 2019). В патогенез ГЦК вовлечены изменения: а) функционирования путей передачи сигналов факторов роста, таких

как инсулиноподобный фактор роста (IGF), эпидермальный фактор роста (EGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста фибробластов (FGF) и фактор роста гепатоцитов (HGF/MET); б) сигнальных путей, связанных с дифференцировкой клеток, таких как WNT, Hedgehog и Notch; а также в) сигнальных путей, связанных с ангиогенезом, запускаемых фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) и FGF (Dhanasekaran et al., 2016). Кроме того, важнейший вклад в прогрессирование ГЦК вносит нарушение процессов апоптоза – программируемой клеточной гибели (Fabregat, 2009). Хроническое воспаление печени в результате инфицирования вирусами гепатита В и С или воздействия неблагоприятных факторов внешней среды приводит к апоптозу гепатоцитов, который сопровождается компенсаторным увеличением их пролиферации, что в условиях высокого уровня оксидативного стресса, вызываемого воспалением, приводит к накоплению мутаций в ДНК и повышению вероятности злокачественного перерождения гепатоцитов (Yang et al., 2019). Кроме того, апоптоз играет важнейшую роль в элиминации малигнизованных клеток, поэтому активация апоптоза – один из механизмов действия противоопухолевых препаратов при ГЦК (Hajizadeh et al., 2023). Показано, что подавление внешнего и внутреннего путей апоптоза, в частности, регуляторными микроРНК, может быть ассоциировано с развитием ГЦК и неблагоприятным исходом этого заболевания (Khlebodarova et al., 2023). Установлено, что белок вируса гепатита В HBx подавляет активность проапоптотического белка p53, что способствует возникновению и прогрессированию ГЦК (Jiang Y. et al., 2019). Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что нарушение баланса про- и антиапоптотических белков в гепатоцитах является

одним из факторов развития ГЦК и формирования лекарственной резистентности опухоли (Ladd et al., 2024; Wu et al., 2024). Это обуславливает необходимость изучения механизмов нарушения путей апоптоза гепатоцитов при развитии ГЦК и поиска ключевых регуляторных звеньев апоптоза, экспрессия которых различается в здоровых и опухолевых гепатоцитах.

Известно, что важную роль в прогрессии заболевания играют нарушения взаимодействий между опухолевыми клетками, стромой и клетками иммунной системы, способствующие развитию ГЦК, формированию лекарственной резистентности и рецидивам (Xue et al., 2022). Отметим также, что ГЦК отличается высокой степенью клеточной гетерогенности, в связи с чем особую значимость приобретают методы исследования молекулярных процессов развития ГЦК на уровне отдельных клеток (Li X. et al., 2022).

Один из таких методов, позволяющий дать ценную информацию об особенностях экспрессии генов в различных типах клеток опухолевой ткани, – секвенирование транскриптомов одиночных клеток. Это особенно актуально при сравнении злокачественно трансформированных гепатоцитов, находящихся внутри опухоли, с нормальными гепатоцитами из гистологически не измененной ткани печени (Zhang et al., 2022). Однако одного лишь анализа дифференциальной экспрессии недостаточно для понимания механизмов опухолевой трансформации. На основе получаемых таким образом экспериментальных данных необходима реконструкция генных сетей – ансамблей координированно функционирующих генов, дающая ценную информацию о нарушениях молекулярных механизмов взаимодействия между генами, ответственных за развитие патологических процессов (Saik et al., 2019; Ivanisenko V.A. et al., 2022; Antropova et al., 2023; Butikova et al., 2025).

Цель нашей работы состояла в реконструкции и анализе генной сети регуляции апоптоза гепатоцитов при гепатоцеллюлярной карциноме человека с использованием интегрированного подхода, основанного на комбинации данных одноклеточного транскриптомного анализа и программно-информационной системы ANDSystem, предназначеннной для реконструкции генных сетей на основе автоматического анализа текстов научных публикаций и биомедицинских фактографических баз данных (Demenkov et al., 2011; Ivanisenko V.A. et al., 2015, 2019). Система использует методы искусственного интеллекта и онтологическое описание предметной области, что обеспечивает высокую полноту и точность извлечения знаний из различных источников экспериментальной информации (Ivanisenko T.V. et al., 2020, 2022, 2024).

На основе сравнения транскриптомных данных scRNA-seq для нормальных гепатоцитов и гепатоцитов, злокачественно трансформированных при ГЦК, мы выявили 1853 дифференциально экспрессирующихся гена (ДЭГ). С использованием системы ANDSystem была реконструирована сеть взаимодействий между ДЭГ и генами, аннотированными в Gene Ontology (GO) как участники апоптоза (GO:0006915). Анализ полученной генной сети позволил выделить ряд ДЭГ, продукты которых, включая BCL2, NFKB1, FOXO1, MCL1, CDKN1A, ERBB2, IL8, EGR1,

демонстрируют значимую связь с компонентами сети апоптоза. При этом некоторые из указанных выше белков: CDKN1A, ERBB2, IL8, EGR1 – не были аннотированы в Gene Ontology как участники апоптоза, что подчеркивает их потенциальную новизну и значимость для понимания механизмов программируемой клеточной гибели при ГЦК. Кроме того, на основе анализа данных scRNA-seq было выявлено снижение экспрессии ключевых ингибиторов апоптоза в клетках гепатоцеллюлярной карциномы. Этот результат позволяет предположить, что уклонение от апоптоза при ГЦК может быть обусловлено не усилением антиапоптотических механизмов, а, наоборот, нарушением работы проапоптотических сигнальных путей. Полученные результаты могут найти применение при планировании дальнейших экспериментальных исследований, направленных на изучение механизмов регуляции апоптоза в гепатоцитах при ГЦК. Они также представляют интерес для разработки таргетных терапевтических стратегий, направленных на модуляцию апоптотических процессов в опухолевых клетках печени.

Материалы и методы

База данных GEO. Для анализа использованы данные секвенирования транскриптома одиночных клеток, полученные из образцов гепатоцеллюлярной карциномы (первичная опухоль) и парных гистологически нормальных тканей печени, доступные в базе данных Gene Expression Omnibus (GEO) NCBI под идентификатором GSE149614. Были проанализированы данные восьми пациентов (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10-го).

Анализ транскриптомных данных. Обработку данных секвенирования транскриптома одиночных клеток и последующий анализ выполняли с использованием пакета Scanpy (v1.9.3) (Wolf et al., 2018) в среде Python. Начальная фильтрация данных включала: 1) удаление клеток, в которых экспрессия была детектирована менее чем для 100 генов, и 2) удаление генов, экспрессия которых была детектирована менее чем в трех клетках. Нормализацию выполняли с помощью функции scanpy.pp.normalize_total() с последующим преобразованием log1p. Кластеризацию клеток проводили с использованием алгоритма Лейдена (Traag et al., 2019). Дифференциально экспрессирующиеся (маркерные) гены для каждого выявленного кластера клеток идентифицировали с помощью функции scanpy.tl.rank_genes_groups(), использующей критерий суммы рангов Уилкоксона.

На основании экспрессии известных маркерных генов гепатоцитов (ALB, HNF4A, SERPINA1, CYP3A4, TAT, TF) (Si-Tayeb et al., 2010) и результатов кластеризации отбирали клетки, классифицированные как гепатоциты. Для последующего сравнительного анализа экспрессии между опухолевыми и нормальными гепатоцитами формировали псевдообъемные (pseudobulk) (Squair et al., 2021) образцы для каждого пациента путем агрегации значений экспрессии по всем клеткам отдельно для опухолевой и нормальной ткани.

Статистически значимые различия в экспрессии генов между группой образцов pseudobulk опухолевых клеток и группой образцов pseudobulk нормальных гепатоцитов выявляли с помощью пакета DESeq2 (v1.42.0) (Love et

al., 2014) в среде R. Дифференциально экспрессирующиеся гены определяли на основе порога $p\text{-value} < 0.05$ и $|\log FC| > 0.5$.

Построение генных сетей. Реконструкцию и анализ генной сети регуляции апоптоза гепатоцитов при гепатоцеллюлярной карциноме у человека выполняли с использованием программно-информационной системы ANDSystem (Demenkov et al., 2011; Ivanisenko V.A. et al., 2015, 2019). Эффективность ANDSystem была ранее показана в ряде исследований, в том числе при реконструкции сети регуляции апоптоза эндотелия при лимфедеме (Saik et al., 2019), а также при изучении молекулярных механизмов, связанных с гепатоцеллюлярной карциномой (Demenkov et al., 2023; Khlebodarova et al., 2023). Система также использовалась для интерпретации омиксных данных: метаболомных (Ivanisenko V.A. et al., 2022, 2024) и протеомных (Momynaliev et al., 2010; Larina et al., 2015), продемонстрировав свою универсальность и применимость к различным типам данных и заболеваниям.

Реконструкция генной сети включала несколько этапов. На первом этапе с помощью Мастера запросов программного модуля ANDVisio (Demenkov et al., 2011), представляющего собой графический пользовательский интерфейс в системе ANDSystem, была реконструирована ассоциативная генная сеть, включающая гены и их белковые продукты, участвующие в апоптозе. Список белок-кодирующих генов человека, вовлеченных в процесс апоптоза, получили из базы данных (БД) The Gene Ontology Resource (<https://geneontology.org/>) для термина GO:0006915 apoptotic process.

На втором этапе был выполнен поиск новых белков, участвующих в регуляции апоптоза в гепатоцитах при развитии ГЦК. В качестве таковых мы рассматривали белки, не аннотированные в БД The Gene Ontology Resource как участники апоптоза, но регулирующие экспрессию исходных генов, вовлеченных в процесс апоптоза. Для поиска таких белков с помощью Мастера путей программы ANDVisio были найдены все прямые связи типа *Expression regulation*, *Expression upregulation*, *Expression downregulation*, *Interaction* от белковых продуктов всех ДЭГ, выявленных в эксперименте, к ДЭГ, вовлеченным, по данным Gene Ontology, в процесс апоптоза.

Затем была проведена оценка статистической значимости уровня специфичности связи найденных белков с исходной генной сетью апоптоза, построенной на этапе 1. Показатель специфичности был определен как доля взаимодействий белка с генами сети по отношению к общему количеству взаимодействий этого белка на уровне генома. Статистическая значимость отклонения между наблюдаемым числом взаимодействий анализируемого белка с генами сети и числом взаимодействий, ожидаемым по случайным причинам, была оценена с использованием гипергеометрического распределения:

$$P(X \geq x) = \sum_{k=x}^{\min(N, n)} \frac{\binom{n}{k} \binom{M-n}{N-k}}{\binom{M}{N}},$$

где M – общее количество белок-кодирующих генов в базе данных, n – количество генов в анализируемой генной

сети, N – общее количество генов человека, взаимодействующих с исследуемым белком, x – количество генов сети, взаимодействующих с исследуемым белком.

Расчет p -значений выполняли с использованием библиотеки Python (scipy.stats.hypergeom). Для коррекции на множественное тестирование применяли поправку Бонферрони (Наркевич и др., 2020), при которой ДЭГ считались статистически значимыми, если их скорректированное по указанной поправке p -значение удовлетворяло условию $p < 0.05$. Все вычисления выполняли с использованием библиотеки statsmodels и других стандартных инструментов Python.

Таким образом, финальная генная сеть регуляции апоптоза при развитии ГЦК включала как ДЭГ и их продукты, аннотированные в Gene Ontology как вовлеченные в процесс апоптоза, так и белковые продукты ДЭГ, статистически значимо связанные с этой генной сетью, но, по данным Gene Ontology, не участвующие в апоптозе.

Анализ генной сети. Для каждого компонента сети (гена или белка) с помощью ANDSystem рассчитывался показатель Network Connectivity, который представляет собой число других объектов сети, с которыми связан данный компонент. Хабами генной сети считались белки и гены, значение Network Connectivity которых превышало критическое значение (квантиль), соответствующее значению $p\text{-value} = 0.05$. Значение квантиля рассчитывалось на основании анализа наблюдаемого распределения Network Connectivity всех вершин генной сети. Таким образом, количество связей в генной сети для хабов было статистически значимым с $p\text{-value} < 0.05$.

Филостратиграфический анализ генной сети. Эволюционный возраст генов определяли с использованием базы данных GenOrigin (<http://chenzlab.hzau.edu.cn/>) (Tong et al., 2021), которая содержит информацию об эволюционном возрасте генов различных организмов, установленную с помощью филостратиграфического анализа. Для оценки статистической значимости различий в распределении генов разного возраста между полным набором белок-кодирующих генов человека и генами в реконструированной сети апоптоза гепатоцитов при развитии ГЦК был применен гипергеометрический тест. Вероятность наблюдения m или более генов определенного возрастного интервала среди M генов сети рассчитывали с применением функции hypergeom.pmf из библиотеки SciPy. Анализ проводили для 20 возрастных интервалов, которые представлены в базе данных GenOrigin. При расчетах использовали следующие параметры: N – общее количество белок-кодирующих генов человека, n – количество белок-кодирующих генов человека в определенном возрастном интервале, M – количество генов в реконструированной генной сети, m – количество генов сети в анализируемом возрастном интервале. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Функциональная аннотация наборов генов. Функциональная аннотация набора генов, представленных в сети, проводилась с использованием веб-инструмента Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID 2021) (<https://david.ncifcrf.gov/>; Sherman et al., 2022) с настройками по умолчанию. Анализ перепред-

Таблица 1. Перепредставленные термины Gene Ontology для генов с повышенной и пониженной экспрессией в опухолевых гепатоцитах по сравнению с гепатоцитами гистологически нормальной ткани печени при гепатоцеллюлярной карциноме

Гены с повышенной экспрессией				Гены с пониженной экспрессией			
№ п/п	Термин Gene Ontology	%*	p-value**	№ п/п	Термин Gene Ontology	%*	p-value**
1	GO:0051301~cell division (клеточное деление)	7.7	0.000	1	GO:0007165~signal transduction (передача сигналов)	12.4	0.000
2	GO:0007059~chromosome segregation (сегрегация хромосом)	3.6	0.000	2	GO:0035556~intracellular signal transduction (внутриклеточная передача сигналов)	5.5	0.000
3	GO:0006325~chromatin organization (организация хроматина)	3.1	0.020	3	GO:0045944~positive regulation of transcription by RNA polymerase II (позитивная регуляция транскрипции РНК полимеразой II)	10.9	0.000
4	GO:0006281~DNA repair (репарация ДНК)	3.7	0.005	4	GO:0000122~negative regulation of transcription by RNA polymerase II (негативная регуляция транскрипции РНК полимеразой II)	9.4	0.000
5	GO:0006260~DNA replication (репликация ДНК)	2.8	0.000	5	GO:0045893~positive regulation of DNA-templated transcription (позитивная регуляция транскрипции)	6.6	0.021
6	GO:0000398~mRNA splicing, via spliceosome (сплайсинг мРНК в сплайкосомах)	2.8	0.004	6	GO:0006915~apoptotic process (процесс апоптоза)	7.0	0.000
7	GO:0006364~rRNA processing (процессинг рибосомальной РНК)	2.7	0.000	7	GO:0043065~positive regulation of apoptotic process (позитивная регуляция апоптоза)	3.9	0.012
8	GO:0006412~translation (трансляция)	3.4	0.000	8	GO:0043066~negative regulation of apoptotic process (негативная регуляция апоптоза)	5.3	0.017
9	GO:0032543~mitochondrial translation (трансляция в митохондриях)	2.4	0.000	9	GO:0006954~inflammatory response (воспалительный процесс)	4.7	0.019
10	GO:0006457~protein folding (фолдинг белка)	3.3	0.000	10	GO:0016477~cell migration (миграция клеток)	4.0	0.000

* Доля генов, ассоциированных с данным термином, по отношению к общему числу генов с повышенной или сниженной экспрессией; ** p-value для статистической значимости перепредставленности термина Gene Ontology с поправкой Бонферрони–Шидака.

ставленности терминов Gene Ontology, описывающих биологические процессы, молекулярные функции, клеточные компоненты, а также пути KEGG (иначе называемый анализом обогащения набора генов), который позволяет определить ключевые биологические процессы, связанные с исследуемыми генами, выполняли для набора всех ДЭГ, выявленных при анализе транскриптома гепатоцитов, и ДЭГ, входящих в генную сеть регуляции апоптоза гепатоцитов. Оценка перепредставленности терминов Gene Ontology и путей KEGG в DAVID выполнялась с использованием точного критерия Фишера (Sherman et al., 2022). Показателем статистической значимости обогащения считался *p*-value < 0.05 с поправкой Бонферрони–Шидака (Šidák, 1967).

Результаты

Анализ дифференциальной экспрессии генов при ГЦК

В результате сравнения транскриптомов одиночных клеток – злокачественно трансформированных гепатоцитов опухоли и гепатоцитов нормальной ткани печени – было выявлено 1853 дифференциально экспрессирующихся

гена. Данные по этим ДЭГ приведены в табл. S1¹. Среди этих ДЭГ 964 гена характеризовались увеличенной экспрессией, а 889 генов – сниженной экспрессией в опухолевых гепатоцитах по сравнению с нормальными клетками печени. Результаты функциональной аннотации ДЭГ, проведенной с использованием web-ресурса DAVID, а именно список статистически значимо перепредставленных терминов Gene Ontology и путей KEGG, приведены в табл. S2 и S3. Десять наиболее значимых терминов (с наиболее высокой долей ДЭГ, ассоциированных с данным термином, по отношению к общему числу ДЭГ), обозначающих биологические процессы для генов с повышенной и пониженной экспрессией, приведены в табл. 1.

Для генов с повышенной экспрессией в злокачественно трансформированных клетках были достоверно перепредставлены термины, связанные с делением клеток (№ 1, 2 в табл. 1), организацией хроматина (№ 3 в табл. 1), репарацией и репликацией ДНК (№ 4, 5 в табл. 1), сплайсингом мРНК (№ 6 в табл. 1), процессингом рибосомальной РНК (№ 7 в табл. 1), трансляцией белка (№ 8, 9 в табл. 1) и фол-

¹ Табл. S1–S7, а также рис. S1 и S2 см. по адресу: <https://avilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx33.xlsx>

дингом белка (№ 10 в табл. 1). Для генов с повышенной экспрессией были достоверно перепредставлены пути KEGG, связанные с окислительным фосфорилированием (hsa00190:Oxidative phosphorylation) и репликацией ДНК (hsa03030:DNA replication) (см. табл. S2).

Для генов с пониженной экспрессией были достоверно перепредставлены термины, описывающие внутриклеточную передачу сигналов (№ 1, 2 в табл. 1), регуляцию транскрипции (№ 3–5 в табл. 1), позитивную и негативную регуляцию апоптоза (№ 6–8 в табл. 1) воспаление (№ 9 в табл. 1), миграцию клеток (№ 10 в табл. 1), сигнальные пути рецепторов Т клеток (№ 10 в табл. S3), рецепторов тирозин-киназы (№ 11 в табл. S3).

Для генов с повышенной экспрессией были достоверно перепредставлены пути KEGG: сигнальный путь MAPK (hsa04010:MAPK signaling pathway), NF-кВ (hsa04064: NF-кВ signaling pathway), хемокинов (hsa04062: chemo-kine signaling pathway) и Т-клеток (hsa04660:T-cell receptor signaling pathway) (см. табл. S3).

Генная сеть ДЭГ, вовлеченные в процесс апоптоза, по данным Gene Ontology

Как указано в разделе «Материалы и методы», реконструкция генной сети регуляции апоптоза в гепатоцитах при развитии ГЦК осуществлялась в два этапа. С учетом известной важности апоптоза при развитии ГЦК (Hajizadeh et al., 2023; Ladd et al., 2024; Wu et al., 2024), а также выявленной в нашем исследовании перепредставленности процессов апоптоза для генов с пониженной экспрессией (см. табл. 1) в малигнизированных гепатоцитах на первом этапе в генную сеть были включены гены и их белковые продукты, которые, по данным Gene Ontology, вовлечены в апоптоз и экспрессия которых в злокачественно трансформированных гепатоцитах отличалась от таковой в гепатоцитах гистологически нормальной ткани печени. Из 746 белок-кодирующих генов (табл. S4), аннотированных в БД The Gene Ontology Resource для термина «процесс апоптоза» (GO:0006915 apoptotic process), 116 (16 % от общего числа генов, аннотированных в БД для данного термина) были дифференциально экспрессирующими в малигнизированных гепатоцитах. Из них 49 генов характеризовались повышенной экспрессией, а 67 генов – пониженной экспрессией в злокачественно перерожденных гепатоцитах по сравнению со здоровыми клетками печени, что составило 42.2 и 57.8 % соответственно от числа 116 ДЭГ, вовлеченных в апоптоз. Ассоциативная генная сеть, реконструированная с помощью системы ANDSystem (рис. S1), включала 116 ДЭГ, вовлеченных в процесс апоптоза, и 116 их белковых продуктов. Характеристики данной сети приведены в табл. 2 (колонка Генная сеть, этап 1), ее изображение на рис. S1, а список всех ее компонентов (белков и генов) – в табл. S5.

На втором этапе для выявления новых белков-регуляторов апоптоза при малигнизации гепатоцитов генная сеть, реконструированная на первом этапе, была расширена белковыми продуктами всех ДЭГ, выявленных при сравнительном анализе транскриптома злокачественно трансформированных гепатоцитов и гепатоцитов гистологически нормальной ткани печени. При расширении

сети были выбраны типы связей, относящиеся к регуляции экспрессии генов, – регуляция экспрессии (*expression regulation*), повышение экспрессии (*expression upregulation*), подавление экспрессии (*expression downregulation*), взаимодействие (*interaction*). Установлено, что из 116 ДЭГ апоптоза экспрессия 68 генов (59 %) регулируется 223 белками, являющимися продуктами генов, которые демонстрируют дифференциальную экспрессию в опухолевых гепатоцитах по сравнению с таковыми нормальной ткани печени, но не аннотированы в Gene Ontology как гены, вовлеченные в процесс апоптоза. Список этих генов приведен в табл. S6. Из них 102 гена характеризовались повышенной экспрессией, а экспрессия 121 гена была понижена.

По данным функциональной аннотации, для генов с пониженной экспрессией достоверно перепредставлены (*p-value* с поправкой Бонферрони < 0.05) термины, описывающие биологические процессы адгезии лейкоцитов (GO:0007159~leukocyte cell-cell adhesion), хемотаксиса нейтрофилов (GO:0030593~neutrophil chemotaxis), клеточного деления (GO:0051301~cell division), а также регуляцию сигнального пути PI3K/Akt (GO:0051897~positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signal transduction).

Далее для 223 найденных белков-кандидатов, потенциально вовлеченных в регуляцию апоптоза гепатоцитов при развитии ГЦК, была проведена оценка статистической значимости уровня их специфической связанности с генной сетью регуляции апоптоза гепатоцитов. Для каждого белка рассчитывали вероятность того, что наблюдаемая доля его взаимодействий с генами сети по отношению к общему числу его взаимодействий с белок-кодирующими генами человека могла возникнуть случайно. В результате анализа было идентифицировано 16 ДЭГ (11 генов с пониженной экспрессией и 5 генов с повышенной экспрессией), статистически значимо (*p-value* < 0.05 с поправкой Бонферрони) связанных с 43 генами апоптоза (табл. 3). Как видно из табл. 3, наибольшим числом связей с ДЭГ, которые уже аннотированы в Gene Ontology как участники апоптоза, обладают продукты генов *IL8*, *ERBB2*, *EGR1*, *TGFB2*, *CDKN1A*. Белки, кодируемы генами *CDN1A*, *ETS2*, *EGR1*, *BACH2*, *KLF5*, *FEN1*, являются транскрипционными факторами согласно БД The Human Transcription Factors (Lambert et al., 2018; <https://humantfs.ccb.utoronto.ca/>).

Итоговая генная сеть апоптоза гепатоцитов при развитии ГЦК представлена на рис. S2, а ее характеристики представлены в табл. 2 (колонка Генная сеть, этап 2). Список всех белков и генов генной сети представлен в табл. S7. Как видно из табл. 2, при расширении первоначальной генной сети апоптоза белками, регулирующими экспрессию генов апоптоза, увеличилось число связей всех типов, за исключением понижающей регуляции (*downregulation*). Хабы генной сети, т. е. объекты сети (гены или белки), значение Network Connectivity (число остальных объектов сети, связанных с данным объектом) которых превышало критическое значение (квантиль), соответствующее значению *p-value* = 0.05 (см. раздел «Материалы и методы»), приведены в табл. 4.

Таблица 2. Характеристики ассоциативных сетей генов и белков, вовлеченных в апоптоз гепатоцитов при гепатоцеллюлярной карциноме

Показатель	Генная сеть	
	первый этап	второй этап
Число компонентов сети	238	248
генов	116	116
белков	116	132
Число взаимодействий	1512	1933
Из них следующие типы взаимодействий:		
Экспрессия генов		
Экспрессия (expression)	116	116
Дифференциальная экспрессия (differential expression)	2	2
Коэкспрессия (coexpression)	7	7
Взаимодействия белков		
Взаимодействие (interaction)	259	385
Катализ (catalyze)	21	29
Расщепление (cleavage)	2	5
Модификация (modification)	34	50
Регуляторные взаимодействия		
Регуляция (regulation)	85	95
Повышающая регуляция (upregulation)	69	79
Поникающая регуляция (downregulation)	24	24
Подавление экспрессии (expression downregulation)	122	134
Регуляция экспрессии (expression regulation)	309	385
Повышение экспрессии (expression upregulation)	165	213
Подавление активности (activity downregulation)	35	47
Регуляция активности (activity regulation)	60	79
Повышение активности (activity upregulation)	25	35
Подавление модификации (modification downregulation)	15	17
Регуляция модификации (modification regulation)	54	64
Усиление модификации (modification upregulation)	51	60
Подавление деградации (degradation downregulation)	9	12
Регуляция деградации (degradation regulation)	17	34
Усиление деградации (degradation upregulation)	7	21
Регуляция транспорта (transport regulation)	24	40

Всего выявлено 11 хабов генной сети (см. табл. 4), 10 из которых являются белками, и 1 ген *MMP9*, продукт которого также вошел в число хабов генной сети. Согласно данным scRNA-seq (см. табл. S1) экспрессия генов, кодирующих 3 белка, CDK1, MMP9, G3P, оказалась повышенной в злокачественно трансформированных гепатоцитах по сравнению с гепатоцитами гистологически нормальной ткани печени, а экспрессия генов, кодирующих 7 остальных белков, NFKB1, BCL2, A4, CDN1A, ERBB2, MCL1, FOXO1, была понижена. Гены, кодирую-

щие два хаба генной сети, белки CDN1A и ERBB2, ранее не были аннотированы в Gene Ontology в качестве участников процесса апоптоза.

Сеть регуляции экспрессии генов, вовлеченные в апоптоз гепатоцитов при развитии гепатоцеллюлярной карциномы

Учитывая выявленные при анализе scRNA-seq изменения в экспрессии генов, продукты которых вовлечены в апоптоз гепатоцитов при развитии ГЦК, мы провели анализ

Таблица 3. Список белков, кодируемых ДЭГ малигнизированных гепатоцитов, вовлеченных в регуляцию апоптоза при гепатоцеллюлярной карциноме, которые не аннотированы в Gene Ontology как участники апоптоза (GO:0006915 apoptotic process)

№ п/п	Название белка	Имя белка	Число связей		Экспрессия	p-value
			ДЭГ	Все		
1	IL8	Хемокиновый лиганд 8 с мотивом С-Х-С (C-X-C motif chemokine ligand 8)	10	25	Понижена	0.00000
2	ERBB2	Рецептор тирозин-киназы erb-b2 (erb-b2 receptor tyrosine kinase 2)	9	32		0.00025
3	EGR1	Фактор раннего ответа на рост 1 (early growth response 1)	7	23		0.01576
4	CDKN1A	Ингибитор циклин-зависимой киназы 1А (cyclin dependent kinase inhibitor 1A)	6	35		0.00004
5	TGFB2	Трансформирующий фактор роста бета 2 (transforming growth factor beta 2)	6	14		0.00861
6	ETS2	Транскрипционный фактор ETSprotoонкоген 2 (ETS proto-oncogene 2 transcription factor)	5	8		0.00018
7	KLF5	Транскрипционный фактор KLF5 (KLF transcription factor 5)	5	13	Повышена	0.00196
8	SDF1	Хемокиновый лиганд 12 с мотивом С-Х-С (C-X-C motif chemokine ligand 12)	5	15	Понижена	0.04080
9	GELS	Гельсолин (gelsolin)	4	14		0.00120
10	K2C7	Кератин 7 (keratin 7)	3	3		0.00071
11	IMA1	Кариоферин субъединица альфа 2 (karyopherin subunit alpha 2)	3	12	Повышена	0.00198
12	FEN1	Эндонуклеаза FEN1 (flap structure-specific endonuclease 1)	3	8		0.00576
13	NEP	Неприлизин (neprilysin)	3	9	Понижена	0.00765
14	CDC20	Белок цикла клеточного деления 20 (cell division cycle 20)	3	19	Повышена	0.01919
15	NEUT	Нейротензин (neurotensin)	3	4		0.02776
16	BACH2	Фактор транскрипции BACH2 (BTB domain and CNC homolog 2)	3	7	Понижена	0.03851

Примечание. Число связей ДЭГ – число связей (регуляция экспрессии) белка с генами, участвующими в апоптозе согласно Gene Ontology; Число связей Все – число связей белка со всеми компонентами итоговой генной сети (генами и белками); Экспрессия – направление изменения экспрессии гена в опухолевых гепатоцитах по сравнению с нормальными клетками (Повышена – повышенная экспрессия; Понижена – пониженная экспрессия); p-value – статистическая значимость связи белка с генами апоптоза, вычисленная по гипергеометрическому тесту с поправкой Бонферрони. Белки отсортированы в порядке убывания значимости связи с генной сетью апоптоза. Жирным шрифтом выделены транскрипционные факторы, согласно БД The Human Transcription Factors (Lambert et al., 2018; <https://humantfs.ccbr.utoronto.ca/>).

Таблица 4. Хабы генной сети апоптоза гепатоцитов при гепатоцеллюлярной карциноме у человека

№ п/п	Тип объекта в сети	Имя объекта в сети	Имя белка/гена	Число связанных объектов сети	p-value	Экспрессия
1	Белок	NFKB1	Nuclear factor kappa B subunit 1	87	0.004	Понижена
2	Ген	MMP9	Matrix metallopeptidase 9	48	0.008	Повышена
3	Белок	BCL2	BCL2 apoptosis regulator	46	0.012	Понижена
4	Белок	A4	Amyloid beta precursor protein	43	0.016	
5	Белок	CDN1A	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	35	0.020	
6	Белок	CDK1	Cyclin dependent kinase 1	33	0.024	Повышена
7	Белок	ERBB2	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2	31	0.028	Понижена
8	Белок	MMP9	Matrix metallopeptidase 9	29	0.036	Повышена
9	Белок	G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	29	0.036	
10	Белок	MCL1	MCL1 apoptosis regulator, BCL2 family member	27	0.044	Понижена
11	Белок	FOXO1	Forkhead box O1	27	0.044	

Примечание. p-value – критическое значение (квантиль), рассчитанное на основании анализа наблюдаемого распределения Network Connectivity всех вершин генной сети. Жирным шрифтом отмечены белки, ранее не аннотированные в Gene Ontology как участники процесса апоптоза.

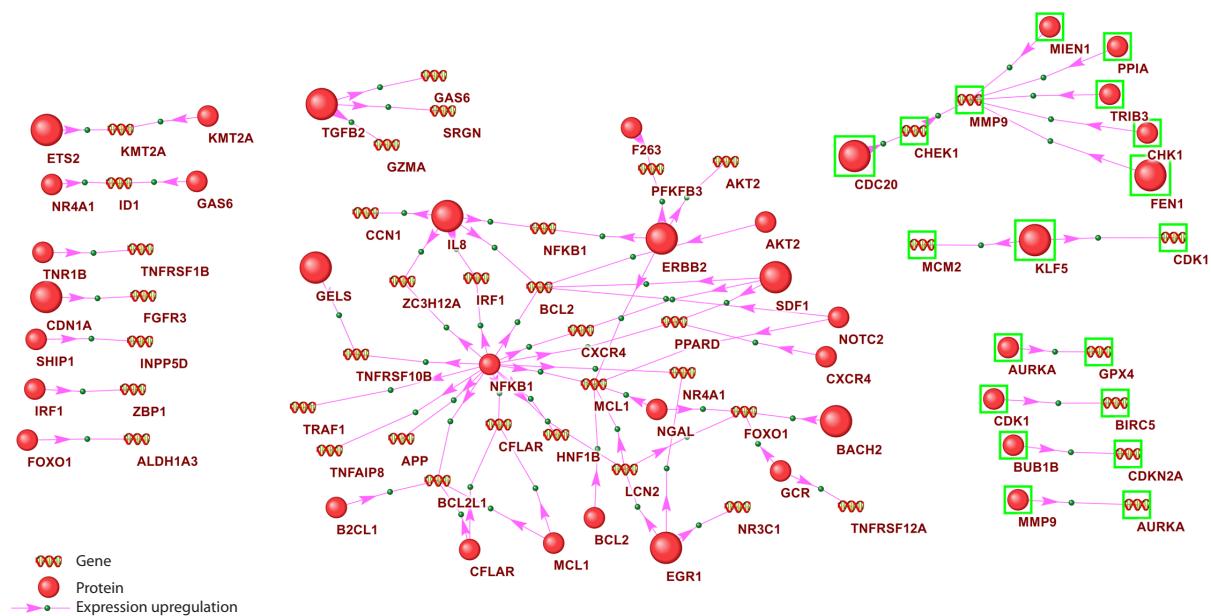


Рис. 1. Генная сеть активации экспрессии генов-компонентов генной сети регуляции апоптоза при развитии ГЦК.

Представлены только белки-компоненты генной сети регуляции апоптоза гепатоцитов при развитии ГЦК (см. рис. S2), активирующие (тип связи expression upregulation) экспрессию генов-компонентов той же сети.

Здесь и на рис. 2: Зеленой рамкой выделены белки и гены, экспрессия которых повышена, белки и гены с пониженной экспрессией не отмечены рамкой. Большинами шарами выделены белки, которые ранее не были аннотированы в Gene Ontology как участники апоптоза.

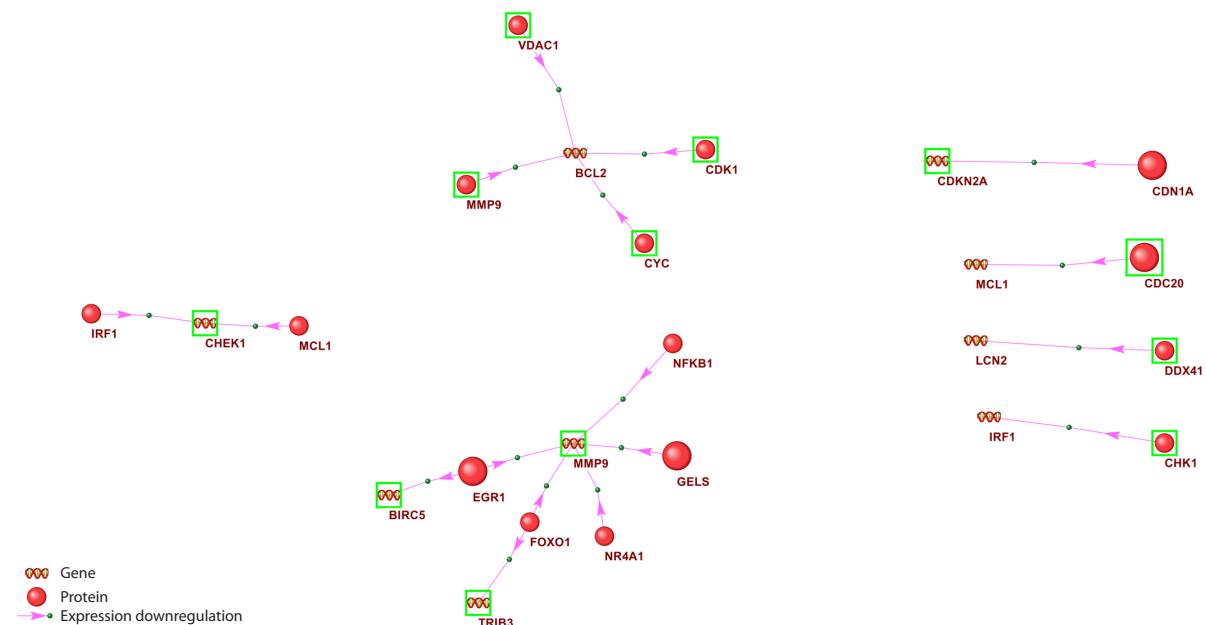


Рис. 2. Генная сеть подавления экспрессии генов-компонентов генной сети регуляции апоптоза при развитии ГЦК.

Представлены только белки-компоненты генной сети регуляции апоптоза гепатоцитов при развитии ГЦК (см. рис. S2), подавляющие (тип связи expression downregulation) экспрессию генов-компонентов той же сети.

регуляции экспрессии генов в итоговой генной сети апоптоза при развитии ГЦК. Для этого мы выполнили фильтрацию связей в реконструированной сети, оставив только те белки, которые усиливают (тип связей expression upregulation, рис. 1) или подавляют (тип связей expression downregulation, рис. 2) экспрессию генов-компонентов итоговой генной сети регуляции апоптоза.

Генная сеть активации экспрессии (см. рис. 1) включала в себя 38 белков, активирующих экспрессию 40 генов-компонентов генной сети апоптоза. По данным ANDSystem, белок NFKB1 активирует экспрессию 15 генов, включая *BCL2*, *MCL1*, *CFLAR* и другие; IL8 – 5 генов; ERBB2 – 4 гена; EGR1, SDF1 и TGFB2 – 3 гена; остальные белки генной сети активации экспрессии регулируют экспрессию

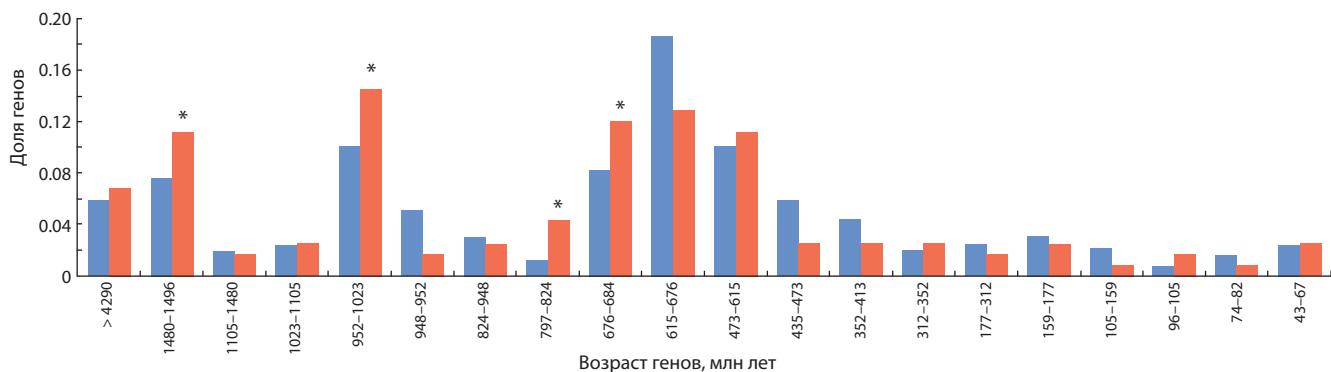


Рис. 3. Распределение эволюционного возраста генов реконструированной генной сети апоптоза гепатоцитов при развитии ГЦК.

По оси X показаны возрастные интервалы генов, млн лет, в соответствии с базой данных GenOrigin, по оси Y – доля генов в каждом возрастном интервале. Синими столбиками обозначено распределение полного набора генов, кодирующих белки человека, красными – распределение генов в реконструированной сети апоптоза гепатоцитов при ГЦК. * – достоверность различий представленности генов в данном возрастном интервале в наборе всех белок-кодирующих генов человека по сравнению с таковой в реконструированной генной сети.

сию менее трех апоптотических генов. При этом по результатам анализа scRNA-seq в нашем исследовании (см. табл. S1) как перечисленные выше белки, так и их гены-мишени характеризуются сниженной экспрессией в злокачественно трансформированных гепатоцитах по сравнению с гепатоцитами гистологически нормальной ткани печени. Экспрессия гена матриксной металлопротеиназы *MMP9* с повышенной экспрессией активируется, по данным ANDSystem, пятью белками: *MEIN1*, *PPIA*, *TRIB3*, *CHK1*, *FEN1*, экспрессия которых также увеличена в гепатоцитах опухоли. Кроме того, была повышена экспрессия белков *CDC20*, *FEN1*, *KLF5* и их генов-мишней.

Генная сеть подавления экспрессии (см. рис. 2) генов, участвующих в апоптозе при ГЦК, включала в себя 15 белков, связанных взаимодействиями типа expression downregulation с 9 генами. Экспрессия гена *MMP9*, по данным ANDSystem, может быть подавлена пятью белками: *NFKB1*, *GELS*, *NR4A1*, *FOXO1*, *EGR1*, экспрессия генов которых снижена в малигнизированных гепатоцитах, по данным scRNA-seq, что может служить причиной повышенной экспрессии этого гена, выявленной при анализе scRNA-seq. Экспрессия гена *BCL2*, который характеризуется сниженной экспрессией в злокачественно трансформированных гепатоцитах, может быть подавлена четырьмя белками: *CDK1*, *VDAC1*, *MMP9*, *CYC*, экспрессия которых повышена в малигнизированных гепатоцитах по сравнению с гепатоцитами здоровой ткани печени. Среди белков, вовлеченных в регуляцию апоптоза при ГЦК, но не аннотированных в Gene Ontology как участники этого процесса, в генную сеть подавления экспрессии вошли белки *EGR1*, *CDN1A*, *GELS*, *CDC20*.

Филостратиграфический анализ генной сети

Анализ эволюционного возрастного распределения генов реконструированной генной сети апоптоза при ГЦК приведен на рис. 3. Доля генов в реконструированной генной сети статистически значимо ($p < 0.05$, гипергеометрический тест) превышала таковую для всех белок-кодирующих генов человека в следующих возрастных интервалах: 1) 1480–1496 млн лет, 13 генов; 2) 952–1023 млн лет 17 генов; 3) 797–824 млн лет, 5 генов; 4) 676–684, 14 генов.

Обсуждение

Апоптоз представляет собой строго регулируемую и эволюционно консервативную программу клеточной гибели, выполняющую ключевые функции в нормальных физиологических процессах, таких как эмбриогенез и гомеостаз тканей во взрослом организме. Устойчивость к апоптозу – известная характеристика раковых клеток, обеспечивающая их выживание и рост опухоли (Kashyap et al., 2021). Однако в литературе имеются данные о том, что процессы апоптоза также могут быть активированы в опухолевых клетках, особенно на поздних стадиях развития новообразования. Таким образом, несмотря на то что уклонение от апоптоза является хорошо известным онкогенным механизмом (Moyer et al., 2025), популяции опухолевых клеток не способны постоянно подавлять программу апоптоза во всех клетках опухоли (обзор Morana et al., 2022). Это свидетельствует об определенных особенностях регуляции апоптоза при развитии злокачественных новообразований в зависимости от стадии формирования опухоли, типа ткани, из которой формируется опухоль, а также типа клеток, учитывая известную клеточную гетерогенность опухолей (Li C. et al., 2020). Поэтому необходимо детальное изучение молекулярно-генетических механизмов апоптоза при развитии различных видов злокачественных новообразований, в частности ГЦК, именно на уровне отдельных клеток.

В настоящем исследовании на основе общедоступных данных scRNA-seq был проведен сравнительный анализ транскриптома злокачественно трансформированных гепатоцитов и гепатоцитов гистологически нормальной ткани печени и реконструирована генная сеть регуляции апоптоза в гепатоцитах при развитии гепатоцеллюлярной карциномы у человека. Анализ данных scRNA-seq и регуляции экспрессии генов в реконструированной генной сети показал, что в малигнизированных гепатоцитах по сравнению со здоровыми клетками снижена экспрессия генов *NFKB1*, *BCL2* и *MCL1*, являющихся хабами генной сети (см. табл. 4). Известно, что белки *BCL2* и *MCL1* – ключевые ингибиторы апоптоза, поскольку они предотвращают активацию белков *BAX/BAK*, необходимых для увеличения мембранный проницаемости митохондрий и

последующей активации эффекторных каспаз (Newton et al., 2024). Считается, что повышение экспрессии гена *BCL2* – один из ведущих механизмов возникновения устойчивости клеток к апоптозу при их злокачественной трансформации (Moyer et al., 2025). Однако в нашем исследовании показано снижение экспрессии генов *BCL2* и *MCL1* в гепатоцитах при ГЦК, которое, по данным анализа генной сети регуляции апоптоза, может быть обусловлено как снижением экспрессии белков, активирующих экспрессию *BCL2* и *MCL1*, таких как NF-κB, SDF1, ERBB, IL8 (см. рис. 1), так и повышением экспрессии белков, подавляющих экспрессию *BCL2* (см. рис. 2).

Интересно отметить, что белок NFKB1 представляет собой главный хаб генной сети апоптоза гепатоцитов при развитии ГЦК (см. табл. 4) и важнейший белок генной сети активации экспрессии генов, вовлеченных в апоптоз гепатоцитов (см. рис. 2), который, по данным ANDSystem, способен активировать экспрессию целого ряда антиапоптотических генов, включая *BCL2* и *MCL1*. Известно, что в опухолях активация сигнального пути NF-κB способствует выживанию, ингибируя апоптоз (Gupta et al., 2023), поэтому снижение экспрессии гена *NFKB1*, выявленное в нашем исследовании (см. табл. S1 и 4), вероятно, может повышать готовность гепатоцитов к апоптозу. С другой стороны, показано, что активация белка NFKB1 необходима для протекания апоптоза клеток по внешнему пути, индуцированному хемокинами, в частности IL1b (Wang P. et al., 2023), и опосредованному рецептором TNFR1 (Moyer et al., 2025). Таким образом, снижение экспрессии гена *NFKB1* в злокачественно трансформированных гепатоцитах может, с одной стороны, способствовать апоптозу злокачественно трансформированных гепатоцитов за счет ослабления экспрессии ингибиторов апоптоза, но, с другой стороны, препятствовать индукции апоптоза по внешнему пути, который требует активации белков NF-κB. Кроме того, согласно данным анализа scRNA-seq, в нашем исследовании (см. табл. S1) в гепатоцитах опухоли увеличена экспрессия генов проапоптотических белков, таких как BID, активатор BAX/BAK (Moyer et al., 2025), и FADD (FAS-associated death domain protein), который является важным компонентом внешнего пути апоптоза (Nagata et al., 2017; Kashyap et al., 2021). Один из хабов генной сети регуляции апоптоза – циклин-зависимая киназа 1 (CDK1), экспрессия гена которой в малигнизированных гепатоцитах увеличена (см. табл. S1). В исследовании G. Massacci и ее сотрудников (2023) показано, что CDK1 фосфорилирует белки BCL2L1, BCL2 и MCL1, подавляя их антиапоптотические функции. Однако в этой же работе подчеркивается, что роль CDK1 в регуляции апоптоза может зависеть от различных экспериментальных условий и особенностей клеток. Таким образом, данные анализа scRNA-seq показывают снижение экспрессии ключевых антиапоптотических генов и повышение экспрессии важных проапоптотических генов в злокачественно трансформированных гепатоцитах по сравнению со здоровыми гепатоцитами. Наши результаты свидетельствуют о том, что в условиях ГЦК снижения уровня антиапоптотических белков недостаточно для запуска апоптоза. Это позволяет предположить, что уклонение злокачественных гепатоцитов от апоптоза путем повышения экспрессии ингиби-

торов апоптоза не является ведущим механизмом прогрессирования ГЦК, которое может быть вызвано иными причинами, связанными, вероятно, с микроокружением гепатоцитов, в частности, с нарушением регуляции процессов воспаления, что подтверждается исследованиями scRNA-seq (Lu et al., 2022; Jiang S. et al., 2024). Мы также считаем, что ключевой мишенью для терапии должна стать активация проапоптотических факторов, таких как каспаза.

Известно, что белки NF-κB относятся к важнейшим регуляторам воспаления и повышение их экспрессии стимулирует воспалительный ответ (Wang P. et al., 2023). Поэтому снижение экспрессии гена *NFKB1*, кодирующего один из членов этого семейства, NFKB1, согласуется с ослаблением в малигнизированных гепатоцитах экспрессии генов, вовлеченных в воспалительный ответ, о чем свидетельствуют результаты функциональной аннотации ДЭГ (см. табл. 1).

Поиск регуляторных связей ДЭГ, вовлеченных в контроль апоптоза гепатоцитов при ГЦК, с белками – продуктами других ДЭГ, выявленных при анализе scRNA-seq, позволил идентифицировать более 200 белков (см. табл. S6), которые потенциально могут изменять экспрессию генов, вовлеченных в контроль апоптоза гепатоцитов при развитии ГЦК, хотя и не аннотированы в Gene Ontology как регуляторы данного процесса. Интересно отметить, что по результатам функциональной аннотации генов, кодирующих эти белки, в опухолевых клетках была снижена экспрессия генов, продукты которых участвуют в обеспечении миграции и адгезии лейкоцитов. Это хемокины (*CCL5*, *CXCL2*, *CXCL8*, *CXCL1*), трансформирующий фактор роста бета 2 (*TGFB2*), тирозинкиназа (*SYK*), интегрин (*ITGA4*). Однако эти же белки, по данным ANDSystem, могут регулировать экспрессию важнейших узлов генной сети регуляции апоптоза гепатоцитов. В частности, *CCL5* индуцирует экспрессию металлопротеиназы 9 (*MMP9*) (Sevenich, Joyce, 2014) – одного из основных хабов реконструированной генной сети регуляции апоптоза гепатоцитов при ГЦК. Металлопротеиназа 9 входит в многофункциональное семейство цинк-зависимых эндопептидаз и активируется во время воспаления и при некоторых видах рака. Металлопротеиназы расщепляют белки внеклеточного матрикса и играют важнейшую роль в клеточном апоптозе, аниогенезе, росте опухоли и метастазировании (Verma et al., 2015). Известно, что MMP9 может индуцировать апоптоз (Liang et al., 2019). Полученные данные свидетельствуют о том, что снижение экспрессии генов, кодирующих важнейшие компоненты иммунной защиты, может способствовать прогрессированию опухоли не только за счет ослабления иммунного ответа на трансформированные клетки, но и за счет влияния на процессы апоптоза в них.

При этом предложенный ранее (Yatsyk et al., 2025) статистический подход для оценки значимости связи определенного белка или гена с генной сетью интереса, в данном случае апоптоза, и анализ реконструированной генной сети позволили приоритизировать ряд белков – потенциальных участников регуляции апоптотического процесса в гепатоцитах, изменение экспрессии которых с большой вероятностью может нарушать регуляцию апоптоза в ге-

патоцитах и тем самым вносить вклад в возникновение и прогрессирование ГЦК. Эти белки, ERBB2, CDN1A, IL8, EGR1, статистически значимо связаны с генной сетью регуляции апоптоза в гепатоцитах при ГЦК и являются центральными регуляторами (хабами) генной сети, влияющими на большое число (более 20) ее узлов.

Семейство гомологов вирусных онкогенов эритробластного лейкоза (ERBB), в которое входит рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и белки ERBB2, ERBB3 и ERBB4, регулирует широкий спектр таких важных клеточных функций, как выживание, рост и миграция клеток опухолей, и поэтому привлекает внимание в качестве мишени для лечения злокачественных новообразований (Chen et al., 2024). Член этого семейства – белок ERBB2, экспрессия которого была снижена в малигнизованных гепатоцитах, по данным scRNA-seq, ранее не был аннотирован как белок, участвующий в регуляции апоптоза, хотя вошел в число статистически значимых хабов реконструированной генной сети регуляции апоптоза (см. табл. 4). Однако было показано, что повышенная экспрессия *ERBB2* ассоциирована с ростом опухоли молочных желез, а подавление *ERBB2* и *ERBB3* приводит к индукции апоптоза в клетках опухоли молочных желез (Xiang et al., 2010). Хотя в литературе нет данных о роли ERBB2 в индукции апоптоза при ГЦК, анализ реконструированной генной сети показывает, что этот белок регулирует ряд белков и генов, вовлеченных в апоптоз при ГЦК, в том числе NFKB1, AKT2, CDK1, MCL1, FOXO1. В частности, показано, что ERBB2 фосфорилирует циклин-зависимую киназу CDK1 и увеличивает устойчивость раковых клеток к апоптозу, вызванному цитостатическим противораковым препаратом Таксол (Vahedi et al., 2015). Также установлено, что ERBB2 является активатором экспрессии антиапоптотических генов *NFKB1*, *AKT2*, *MCL1* (см. рис. 1), экспрессия которых, по данным scRNA-seq, снижена в малигнизованных гепатоцитах. Таким образом, ERBB2 – важное потенциальное звено регуляции апоптоза в гепатоцитах, а изменение его экспрессии может вносить вклад в развитие ГЦК.

IL8, также известный как CXCL8, – провоспалительный хемокин семейства CXС. Повышенный уровень IL8 ассоциирован с неблагоприятным прогнозом при различных опухолях, в том числе при гепатоцеллюлярной карциноме. При ГЦК повышение экспрессии *IL8* также связано с усилением метастатического потенциала опухолевых клеток (Han et al., 2023). Нокдаун *IL8* способствует индукции апоптоза в клетках ГЦК (Choi et al., 2016).

Белок CDN1A, также известный как CDKN1A, – ингибитор циклинзависимой киназы 1А, кодируемый геном *CDKN1A*, не был ранее аннотирован в Gene Ontology как белок, вовлеченный в апоптоз, однако его роль в апоптозе при развитии ГЦК обсуждается в литературе (Thangavelu et al., 2024). В статьях подчеркивается, что роль CDN1A в регуляции апоптоза при развитии новообразований противоречива, поскольку CDKN1A может как подавлять, так и активировать апоптоз (Manu et al., 2019). Согласно экспериментальным данным белок CDKN1A служит мишенью белка p53 и может стимулировать апоптоз в клетках опухоли, активируя рецептор TNF или проапоптотический белок BAX, или регулировать внутренний путь апоптоза,

изменяя проницаемость митохондриальной мембраны (Abbas, Dutta, 2009). Природное соединение N-трансферулоилкотопамин может усиливать апоптоз опухолевых клеток при ГЦК посредством его взаимодействия с CDKN1A (Ma et al., 2021). Данные ANDSystem показывают, что этот белок – одно из центральных звеньев генной сети регуляции апоптоза в гепатоцитах при развитии ГЦК. Он взаимодействует с другими хабами сети, в частности, с такими известными регуляторами апоптоза, как NFKB1, BCL2, CDK1. Однако анализ данных scRNA-seq показал, что экспрессия гена *CDKN1A* была снижена в опухолевых гепатоцитах по сравнению нормальными клетками печени (см. табл. 4). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ослабление экспрессии *CDKN1A* в гепатоцитах может быть важным звеном патогенеза ГЦК, способствуя уклонению опухолевых клеток от апоптоза, но его роль в регуляции апоптоза в гепатоцитах при ГЦК требует дальнейшего экспериментального исследования.

Белок раннего ответа на рост 1 (EGR1) подавляет пролиферацию злокачественно трансформированных клеток и усиливает их апоптоз в опухолях многих тканей и органов, включая печень (обзор Wang B. et al., 2021). Кроме того, установлено, что EGR1 способен подавлять рост ГЦК, подавляя транскрипцию *PFKL* (phosphofructokinase-1, liver type), и ингибирует аэробный гликолиз в клетках опухоли (Pan et al., 2024). В нашем исследовании установлено, что EGR1, экспрессия которого снижена, является активатором экспрессии генов (*LCN2*, *NR3C1*, *NR4A1* (см. рис. 1)), вовлеченных в контроль апоптоза, экспрессия которых также снижена в малигнизованных гепатоцитах. Результаты нашего исследования позволяют предположить, что снижение экспрессии *EGR1* может быть одним из механизмов ослабления апоптоза при злокачественном перерождении клеток.

Использование филостратиграфического анализа для оценки эволюционного возраста генов важно для исследования эволюции генных сетей и идентификации их ключевых компонентов (Mustafin et al., 2021). Следует отметить, что эволюционный возраст большинства генов генной сети апоптоза гепатоцитов и возраст генов переданных возрастных интервалов более 600 млн лет (см. рис. 3), доля же относительно молодых генов невелика, что свидетельствует о консервативности генов генной сети и их важности для жизнедеятельности клетки. В частности, перепредставленная группа генов возрастом 1480–1496 млн лет соответствует времени формирования механизмов симбиоза митохондрий и эукариотической клетки (Raval et al., 2023). На этих этапах симбиоза сформировались многие гены, ответственные за митохондриальные пути программированной клеточной смерти, включая ключевые факторы, регулирующие высвобождение цитохрома С и управление окислительным стрессом, что отражало первоначальные адаптации для поддержания симбиотического баланса (Zmasek, Godzik, 2013). Кроме того, в нашем исследовании выявлено статистически значимое превышение доли генов в генной сети апоптоза гепатоцитов по сравнению с таковой во всем геноме человека в возрастном диапазоне 952–1023 млн лет. В этот возрастной диапазон, в частности, входят такие белки, как BCL2, являющийся хабом генной сети, и

BCL2L1. Известно, что эти белки – ключевые ингибиторы апоптоза (Moyer et al., 2025). Ортологи генов семейства BCL2 обнаружены уже у губок (*Porifera*), плакозой (*Placozoa*) и гидр (*Hydra*) (Banjara et al., 2020), т. е. на ранней стадии эволюции многоклеточных. Критическая роль апоптоза во врожденном и адаптивном иммунном ответе позволяет предположить, что эта функция возникла на ранних этапах эволюции многоклеточности. Вероятно, она предшествовала адаптации апоптоза для других процессов, таких как развитие, гомеостаз и удаление поврежденных клеток у *Metazoa*, что стало важной предпосылкой для возникновения сложных многоклеточных форм жизни (Suraweera et al., 2022). Таким образом, изменения в экспрессии генов гепатоцитов при развитии ГЦК затрагивают достаточно консервативные гены, включая хаб генной сети *BCL2*, которые помимо апоптоза могут регулировать и другие биологические процессы в клетке, обуславливая сложность регуляторных взаимодействий в клетке при злокачественной трансформации.

Таким образом, в нашем исследовании впервые на основе интегрированного подхода, включающего анализ транскриптома гепатоцитов, а также реконструкцию и анализ генной сети ДЭГ, вовлеченных в апоптоз, были получены данные об особенностях регуляции апоптоза гепатоцитов при развитии ГЦК у человека. Полученные результаты, показывающие снижение экспрессии ключевых генов – ингибиторов апоптоза, подтверждают представление о том, что уклонение от апоптоза не всегда характерно для раковых клеток и роль апоптоза в развитии злокачественных новообразований зависит от типа клеток, ткани и микроокружения опухолевых клеток (Morana et al., 2022). Кроме того, ослабление в злокачественно трансформированных гепатоцитах экспрессии генов, вовлеченных в контроль воспаления, а также белка NFKB1 – ключевого регулятора воспалительного процесса (Wang P. et al., 2023), позволяет предположить важную роль взаимодействия гепатоцитов с иммунной системой организма при развитии ГЦК, что требует дальнейшего экспериментального и теоретического исследования. Выявленные хабы генной сети (*NFKB1*, *MMP9*, *BCL2*, *A4*, *CDN1A*, *CDK1*, *ERBB2*, *G3P*, *MCL1*, *FOXO1*) могут быть полезны в качестве мишенией для модуляции апоптоза в гепатоцитах при лечении ГЦК, что в настоящее время является перспективным направлением (Ladd et al., 2024; Wu et al., 2024) терапии этого вида злокачественных новообразований.

Заключение

Анализ данных scRNA-seq нормальных и злокачественно трансформированных гепатоцитов показал изменения в экспрессии генов, вовлеченных в контроль апоптоза гепатоцитов при ГЦК, при этом в злокачественно трансформированных гепатоцитах была снижена экспрессия генов ключевых ингибиторов апоптоза, *BCL2* и *MCL1*, и уменьшена экспрессия генов, вовлеченных в воспалительный ответ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что уклонение гепатоцитов от апоптоза путем повышения экспрессии ключевых ингибиторов апоптоза, по-видимому, не является характерной особенностью гепатоцитов при развитии ГЦК. Реконструкция и анализ

генной сети регуляции апоптоза гепатоцитов при ГЦК показали, что уменьшение экспрессии гена *NFKB1* может быть важным фактором, обуславливающим уменьшение экспрессии целого ряда генов, вовлеченных в контроль апоптоза, включая *BCL2* и *MCL1*. Кроме того, реконструкция и анализ генной сети апоптоза гепатоцитов при ГЦК позволили выявить ряд ключевых генов: *NFKB1*, *MMP9*, *BCL2*, *A4*, *CDN1A*, *CDK1*, *ERBB2*, *G3P*, *MCL1*, *FOXO1*, которые одновременно демонстрируют дифференциальную экспрессию в малигнизированных гепатоцитах по сравнению со здоровыми гепатоцитами и служат хабами генной сети апоптоза гепатоцитов при развитии ГЦК. Нарушение экспрессии этих генов может приводить к дисрегуляции апоптоза в опухолевых клетках.

Среди ДЭГ также были идентифицированы гены (*CDKN1A*, *ERBB2*, *IL8*, *EGR1*), которые хотя и не были аннотированы в Gene Ontology как участники апоптоза, но число регуляторных взаимодействий их продуктов с генами, вовлеченными в апоптоз, статистически значимо превышало ожидаемое по случайным причинам согласно оценке на основе гипергеометрического распределения. Это позволяет считать, что белки, кодируемые этими генами, играют специфическую роль в регуляции апоптоза гепатоцитов при ГЦК и являются перспективными кандидатами для дальнейшего изучения.

Полученные результаты могут быть использованы при планировании дальнейших экспериментальных исследований по изучению особенностей регуляции апоптоза гепатоцитов при ГЦК. Выдвинутые гипотезы могут способствовать разработке таргетных терапевтических стратегий, направленных на модуляцию программируемой клеточной гибели в злокачественных клетках печени.

Список литературы / References

- Наркевич А.Н., Виноградов К.А., Грживовский А.М. Множественные сравнения в биомедицинских исследованиях: проблема и способы решения. Экология человека. 2020;10:55-64. doi [10.33396/1728-0869-2020-10-55-64](https://doi.org/10.33396/1728-0869-2020-10-55-64)
- [Narkevich A.N., Vinogradov K.A., Grjibovski A.M. Multiple comparisons in biomedical research: the problem and its solutions. *Hum Ecol.* 2020;10:55-64. doi [10.33396/1728-0869-2020-10-55-64](https://doi.org/10.33396/1728-0869-2020-10-55-64) (in Russian)]
- Abbas T., Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(6):400-414. doi [10.1038/nrc2657](https://doi.org/10.1038/nrc2657)
- Antropova E.A., Khlebodarova T.M., Demenkov P.S., Volianskaia A.R., Venzel A.S., Ivanisenko N.V., Gavrilenko A.D., Ivanisenko T.V., Adamovskaya A.V., Revva P.M., Kolchanov N.A., Lavrik I.N., Ivanisenko V.A. Reconstruction of the regulatory hypermethylation network controlling hepatocellular carcinoma development during hepatitis C viral infection. *J Integr Bioinform.* 2023;20(3): 20230013. doi [10.1515/jib-2023-0013](https://doi.org/10.1515/jib-2023-0013)
- Banjara S., Suraweera C.D., Hinds M.G., Kvansakul M. The Bcl-2 family: Ancient origins, conserved structures, and divergent mechanisms. *Biomolecules.* 2020;10(1):128. doi [10.3390/biom10010128](https://doi.org/10.3390/biom10010128)
- Butikova E.A., Basov N.V., Rogachev A.D., Gaisler E.V., Ivanisenko V.A., Demenkov P.S., Makarova A.A., ... Pokrovsky A.G., Vinokurov N.A., Kanygin V.V., Popik V.M., Shevchenko O.A. Metabolomic and gene networks approaches reveal the role of mitochondrial membrane proteins in response of human melanoma cells to THz radiation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2025; 1870(2):159595. doi [10.1016/j.bbapap.2025.159595](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2025.159595)
- Chen Y., Lu A., Hu Z., Li J., Lu J. ERBB3 targeting: A promising approach to overcoming cancer therapeutic resistance. *Cancer Lett.* 2024;599:217146. doi [10.1016/j.canlet.2024.217146](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.217146)

- Choi S.H., Park J.Y., Kang W., Kim S.U., Kim Y., Ahn S.H., Ro S.W., Han K.H. Knockdown of HIF-1 α and IL-8 induced apoptosis of hepatocellular carcinoma triggers apoptosis of vascular endothelial cells. *Apoptosis*. 2016;21(1):85-95. doi 10.1007/s10495-015-1185-2
- Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. ANDVisio: a new tool for graphic visualization and analysis of literature mined associative gene networks in the ANDSystem. *In Silico Biol.* 2011;11(3-4):149-161. doi 10.3233/ISB-2012-0449
- Demenkov P.S., Antropova E.A., Adamovskaya A.V., Mishchenko E.L., Khlebodarova T.M., Ivanisenko T.V., Ivanisenko N.V., Venzel A.S., Lavrik I.N., Ivanisenko V.A. Prioritization of potential pharmacological targets for the development of anti-hepatocarcinoma drugs modulating the extrinsic apoptosis pathway: the reconstruction and analysis of associative gene networks help. *Vavilov J Genet Breed.* 2023;27(7):784-793. doi 10.18699/VJGB-23-91
- Dhanasekaran R., Bandoh S., Roberts L.R. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances. *F1000Res.* 2016;5:879. doi 10.12688/f1000research.6946.1
- Fabregat I. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol.* 2009;15(5):513-520. doi 10.3748/wjg.v15.i5.513
- Ganesan P., Kulik L.M. Hepatocellular carcinoma: New developments. *Clin Liver Dis.* 2023;27(1):85-102. doi 10.1016/j.cld.2022.08.004
- Gupta R., Kadhim M.M., Turki Jalil A., Obayes A.M., Aminov Z., Alsaikhan F., Ramírez-Coronel A.A., Ramaiah P., Tayyib N.A., Luo X. Multifaceted role of NF- κ B in hepatocellular carcinoma therapy: Molecular landscape, therapeutic compounds and nano-material approaches. *Environ Res.* 2023;228:115767. doi 10.1016/j.envres.2023.115767
- Hajizadeh M., Hajizadeh F., Ghaffarei S., Amin Doustvandi M., Hajizadeh K., Yaghoubi S.M., Mohammadnejad F., Khiabani N.A., Mousavi P., Baradaran B. MicroRNAs and their vital role in apoptosis in hepatocellular carcinoma: miRNA-based diagnostic and treatment methods. *Gene.* 2023;888:147803. doi 10.1016/j.gene.2023.147803
- Han X., Wu J., Sha Z., Lai R., Shi J., Mi L., Yin F., Guo Z. Dicer suppresses hepatocellular carcinoma via interleukin-8 pathway. *Clin Med Insights Oncol.* 2023;17:11795549231161212. doi 10.1177/11795549231161212
- Ivanisenko T.V., Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko N.V., Savostianov A.N., Ivanisenko V.A. ANDDigest: a new web-based module of ANDSystem for the search of knowledge in the scientific literature. *BMC Bioinformatics.* 2020;21(11):228. doi 10.1186/s12859-020-03557-8
- Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. The new version of the ANDDigest tool with improved ai-based short names recognition. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23):14934. doi 10.3390/ijms232314934
- Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Ivanisenko V.A. An accurate and efficient approach to knowledge extraction from scientific publications using structured ontology models, graph neural networks, and large language models. *Int J Mol Sci.* 2024;25(21):11811. doi 10.3390/ijms252111811
- Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V., Tiys E.S., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology. *BMC Systems Biol.* 2015;9(Suppl. 2):S2. doi 10.1186/s12859-015-0209-9-S2-S2
- Ivanisenko V.A., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Mishchenko E.L., Saik O.V. A new version of the ANDSystem tool for automatic extraction of knowledge from scientific publications with expanded functionality for reconstruction of associative gene networks by considering tissue-specific gene expression. *BMC Bioinformatics.* 2019;20(Suppl. 1):34. doi 10.1186/s12859-018-2567-6
- Ivanisenko V.A., Gaisler E.V., Basov N.V., Rogachev A.D., Chereziz S.V., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Mishchenko E.L., Khrapko O.P., Khrapko Y.I., Voevodina S.M. Plasma metabolomics and gene regulatory networks analysis reveal the role of nonstructural SARS-CoV-2 viral proteins in metabolic dysregulation in COVID-19 patients. *Sci Rep.* 2022;12(1):19977. doi 10.1038/s41598-022-24170-0
- Ivanisenko V.A., Rogachev A.D., Makarova A.A., Basov N.V., Gaisler E.V., Kuzmicheva I.N., Demenkov P.S., ... Kolchanov N.A., Plesko V.V., Moroz G.B., Lomivorotov V.V., Pokrovsky A.G. AI-assisted identification of primary and secondary metabolomic markers for postoperative delirium. *Int J Mol Sci.* 2024;25(21): 11847. doi 10.3390/ijms252111847
- Jiang S., Lu H., Pan Y., Yang A., Aikemu A., Li H., Hao R., Huang Q., Qi X., Tao Z., Wu Y., Quan C., Zhou G., Lu Y. Characterization of the distinct immune microenvironments between hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Lett.* 2024; 588:216799. doi 10.1016/j.canlet.2024.216799
- Jiang Y., Han Q.J., Zhang J. Hepatocellular carcinoma: Mechanisms of progression and immunotherapy. *World J Gastroenterol.* 2019; 25(25):3151-3167. doi 10.3748/wjg.v25.i25.3151
- Kashyap D., Garg V.K., Goel N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2021;125:73-120. doi 10.1016/bs.apcsb.2021.01.003
- Khlebodarova T.M., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Antropova E.A., Lavrik I.N., Ivanisenko V.A. Primary and secondary micro-RNA modulation the extrinsic pathway of apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Mol Biol.* 2023;57(2):165-175. doi 10.1134/S0026893323020103
- Ladd A.D., Duarte S., Sahin I., Zarrinpar A. Mechanisms of drug resistance in HCC. *Hepatology.* 2024;79(4):926-940. doi 10.1097/HEP.0000000000000237
- Lambert S.A., Jolma A., Campitelli L.F., Das P.K., Yin Y., Albu M., Chen X., Taipale J., Hughes T.R., Weirauch M.T. The human transcription factors. *Cell.* 2018;172(4):650-665. doi 10.1016/j.cell.2018.01.029
- Larina I.M., Pastushkova L.Kh., Tiys E.S., Kireev K.S., Kononikhin A.S., Starodubtseva N.L., Popov I.A., Custaud M.A., Dobrokhотов I.V., Nikolaev E.N., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. Permanent proteins in the urine of healthy humans during the Mars-500 experiment. *J Bioinform Comput Biol.* 2015;13(1):1540001. doi 10.1142/S0219720015400016
- Li C., Xu J. Identification of potentially therapeutic target genes of hepatocellular carcinoma. *Int J Environ Res Public Health.* 2020; 17(3):1053. doi 10.3390/ijerph17031053
- Li X.Y., Shen Y., Zhang L., Guo X., Wu J. Understanding initiation and progression of hepatocellular carcinoma through single cell sequencing. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2022;1877(3):188720. doi 10.1016/j.bbcan.2022.188720
- Liang Y., Yang C., Lin Y., Parviz Y., Sun K., Wang W., Ren M., Yan L. Matrix metalloproteinase 9 induces keratinocyte apoptosis through FasL/Fas pathway in diabetic wound. *Apoptosis.* 2019;24(7-8):542-551. doi 10.1007/s10495-019-01536-w
- Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014; 15(12):550. doi 10.1186/s13059-014-0550-8
- Lu Y., Yang A., Quan C., Pan Y., Zhang H., Li Y., Gao C., Lu H., Wang X., Cao P., Chen H., Lu S., Zhou G. A single-cell atlas of the multicellular ecosystem of primary and metastatic hepatocellular carcinoma. *Nat Commun.* 2022;13(1):4594. doi 10.1038/s41467-022-32283-3
- Ma B., Li J., Yang W.K., Zhang M.G., Xie X.D., Bai Z.T. N-trans-feruloxyloctopamine wakes up BBC3, DDIT3, CDKN1A, and NOXA signals to accelerate HCC cell apoptosis. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2021;2021:1560307. doi 10.1155/2021/1560307
- Manu K.A., Cao P.H.A., Chai T.F., Casey P.J., Wang M. p21cip1/waf1 coordinate autophagy, proliferation and apoptosis in response to metabolic stress. *Cancers (Basel).* 2019;11(8):1112. doi 10.3390/cancers11081112
- Massacci G., Perfetto L., Sacco F. The Cyclin-dependent kinase 1: more than a cell cycle regulator. *Br J Cancer.* 2023;129(11):1707-1716. doi 10.1038/s41416-023-02468-8

- Momynaliev K.T., Kashin S.V., Chelysheva V.V., Selezneva O.V., Demina I.A., Serebryakova M.V., Alexeev D., Ivanisenko V.A., Aman E., Govorun V.M. Functional divergence of *Helicobacter pylori* related to early gastric cancer. *J Proteome Res.* 2010;9(1): 254-267. doi [10.1021/pr900586w](https://doi.org/10.1021/pr900586w)
- Morana O., Wood W., Gregory C.D. The apoptosis paradox in cancer. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1328. doi [10.3390/ijms23031328](https://doi.org/10.3390/ijms23031328)
- Moyer A., Tanaka K., Cheng E.H. Apoptosis in cancer biology and therapy. *Annu Rev Pathol.* 2025;20(1):303-328. doi [10.1146/annurev-pathmechdis-051222-115023](https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-051222-115023)
- Mustafin Z.S., Lashin S.A., Matushkin Yu.G. Phylostratigraphic analysis of gene networks of human diseases. *Vavilov J Genet Breed.* 2021;25(1):46-56. doi [10.18699/VJ21.006](https://doi.org/10.18699/VJ21.006)
- Nagata S., Tanaka M. Programmed cell death and the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(5):333-340. doi [10.1038/nri.2016.153](https://doi.org/10.1038/nri.2016.153)
- Newton K., Strasser A., Kayagaki N., Dixit V.M. Cell death. *Cell.* 2024; 187(2):235-256. doi [10.1016/j.cell.2023.11.044](https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.11.044)
- Ogunwobi O.O., Harricharan T., Huaman J., Galuza A., Odumuwagun O., Tan Y., Ma G.X., Nguyen M.T. Mechanisms of hepatocellular carcinoma progression. *World J Gastroenterol.* 2019;25(19): 2279-2293. doi [10.3748/wjg.v25.i19.2279](https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i19.2279)
- Pan M., Luo M., Liu L., Chen Y., Cheng Z., Wang K., Huang L., Tang N., Qiu J., Huang A., Xia J. EGR1 suppresses HCC growth and aerobic glycolysis by transcriptionally downregulating PFKL. *J Exp Clin Cancer Res.* 2024;43(1):35. doi [10.1186/s13046-024-02957-5](https://doi.org/10.1186/s13046-024-02957-5)
- Raval P.K., Martin W.F., Gould S.B. Mitochondrial evolution: Gene shuffling, endosymbiosis, and signaling. *Sci Adv.* 2023;9(32): p.eadj4493. doi [10.1126/sciadv.adj4493](https://doi.org/10.1126/sciadv.adj4493)
- Saik O.V., Nimaev V.V., Usmonov D.B., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Lavrik I.N., Ivanisenko V.A. Prioritization of genes involved in endothelial cell apoptosis by their implication in lymphedema using an analysis of associative gene networks with ANDSystem. *BMC Med Genomics.* 2019;12(Suppl. 2):47. doi [10.1186/s12920-019-0492-9](https://doi.org/10.1186/s12920-019-0492-9)
- Sevenich L., Joyce J.A. Pericellular proteolysis in cancer. *Genes Dev.* 2014;28(21):2331-2347. doi [10.1101/gad.250647.114](https://doi.org/10.1101/gad.250647.114)
- Sherman B.T., Hao M., Qiu J., Jiao X., Baseler M.W., Lane H.C., Imamichi T., Chang W. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res.* 2022;50(W1):W216-W221. doi [10.1093/nar/gkac194](https://doi.org/10.1093/nar/gkac194)
- Si-Tayeb K., Noto F.K., Nagaoka M., Nagaoka M., Li J., Battle M.A., Duris C., North P.E., Dalton S., Duncan S.A. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology.* 2010;51(1):297-305. doi [10.1002/hep.23354](https://doi.org/10.1002/hep.23354)
- Šídák Z. Rectangular confidence regions for the means of multivariate normal distributions. *J Am Stat Assoc.* 1967;62(318):626-633. doi [10.2307/2283989](https://doi.org/10.2307/2283989)
- Squair J.W., Gautier M., Kathe C., Anderson M.A., James N.D., Huston T.H., Hudelle R., ... Barraud Q., Levine A.J., La Manno G., Skinnider M.A., Courtine G. Confronting false discoveries in single-cell differential expression. *Nat Commun.* 2021;12(1):5692. doi [10.1038/s41467-021-25960-2](https://doi.org/10.1038/s41467-021-25960-2)
- Suraweera C.D., Banjara S., Hinds M.G., Kvansakul M. Metazoans and intrinsic apoptosis: An evolutionary analysis of the Bcl-2 family. *Int J Mol Sci.* 2022;23(7):3691. doi [10.3390/ijms23073691](https://doi.org/10.3390/ijms23073691)
- Thangavelu L., Altamimi A.S.A., Ghaboura N., Babu M.A., Roopashree R., Sharma P., Pal P., Choudhary C., Prasad G.V.S., Sinha A., Balaraman A.K., Rawat S. Targeting the p53-p21 axis in liver cancer: Linking cellular senescence to tumor suppression and progression. *Pathol Res Pract.* 2024;263:155652. doi [10.1016/j.prp.2024.155652](https://doi.org/10.1016/j.prp.2024.155652)
- Tong Y.-B., Shi M.-W., Qian S.H., Chen Y.-J., Luo Z.-H., Tu Y.-X., Xiong Y.-L., Geng Y.-J., Chen C., Chen Z.-X. GenOrigin: a comprehensive protein-coding gene origination database on the evolutionary timescale of life. *J Genet Genomics.* 2021;48(12):1122-1129. doi [10.1016/j.jgg.2021.03.018](https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.03.018)
- Traag V.A., Waltman L., van Eck N.J. From Louvain to Leiden: guaranteeing well-connected communities. *Sci Rep.* 2019;9:5233. doi [10.1038/s41598-019-41695-z](https://doi.org/10.1038/s41598-019-41695-z)
- Vahedi S., Chueh F.Y., Dutta S., Chandran B., Yu C.L. Nuclear lymphocyte-specific protein tyrosine kinase and its interaction with CR6-interacting factor 1 promote the survival of human leukemic T cells. *Oncol Rep.* 2015;34(1):43-50. doi [10.3892/or.2015.3990](https://doi.org/10.3892/or.2015.3990)
- Verma S., Kesh K., Gupta A., Swarnakar S. An overview of matrix metalloproteinase 9 polymorphism and gastric cancer risk. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(17):7393-7400. doi [10.7314/apjc.2015.16.17.7393](https://doi.org/10.7314/apjc.2015.16.17.7393)
- Wang B., Guo H., Yu H., Chen Y., Xu H., Zhao G. The role of the transcription factor EGR1 in cancer. *Front Oncol.* 2021;11:642547. doi [10.3389/fonc.2021.642547](https://doi.org/10.3389/fonc.2021.642547)
- Wang P., Qian H., Xiao M., Lv J. Role of signal transduction pathways in IL-1 β -induced apoptosis: Pathological and therapeutic aspects. *Immun Inflamm Dis.* 2023;11(1):e762. doi [10.1002/iid3.762](https://doi.org/10.1002/iid3.762)
- Wolf F., Angerer P., Theis F. SCANPY: large-scale single-cell gene expression data analysis. *Genome Biol.* 2018;19(1):15. doi [10.1186/s13059-017-1382-0](https://doi.org/10.1186/s13059-017-1382-0)
- Wu X., Cao J., Wan X., Du S. Programmed cell death in hepatocellular carcinoma: mechanisms and therapeutic prospects. *Cell Death Discov.* 2024;10(1):356. doi [10.1038/s41420-024-02116-x](https://doi.org/10.1038/s41420-024-02116-x)
- Xiang S., Sun Z., He Q., Yan F., Wang Y., Zhang J. Aspirin inhibits ErbB2 to induce apoptosis in cervical cancer cells. *Med Oncol.* 2010;27(2):379-387. doi [10.1007/s12032-009-9221-0](https://doi.org/10.1007/s12032-009-9221-0)
- Xue R., Zhang Q., Cao Q., Kong R., Xiang X., Liu H., Feng M., ... Zhan Q., Deng M., Zhu J., Zhang Z., Zhang N. Liver tumour immune microenvironment subtypes and neutrophil heterogeneity. *Nature.* 2022;612(7938):141-147. doi [10.1038/s41586-022-05400-x](https://doi.org/10.1038/s41586-022-05400-x)
- Yang Y.M., Kim S.Y., Seki E. Inflammation and liver cancer: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Semin Liver Dis.* 2019;39(1): 26-42. doi [10.1055/s-0038-1676806](https://doi.org/10.1055/s-0038-1676806)
- Yatsky I.V., Volyanskaya A.R., Kleshchev M.A., Antropova E.A., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Ivanisenko V.A. Reconstruction and computational analysis of the insulin response gene network in human type 2 diabetes using transcriptomic data. *Gene Expr.* 2025 (в печати)
- Zhang Q.Y., Ho D.W., Tsui Y.M., Ng I.O. Single-cell transcriptomics of liver cancer: hype or insights? *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2022;14(3):513-525. doi [10.1016/j.ccmgh.2022.04.014](https://doi.org/10.1016/j.ccmgh.2022.04.014)
- Zmasek C.M., Godzik A. Evolution of the animal apoptosis network. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(3):a008649. doi [10.1101/cshperspect.a008649](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008649)
- Zou Y., Wan X., Zhou Q., Zhu G., Lin S., Tang Q., Yang X., Wang S. Mechanisms of drug resistance in hepatocellular carcinoma. *Biol Proced Online.* 2025;27(1):19. doi [10.1186/s12575-025-00281-6](https://doi.org/10.1186/s12575-025-00281-6)

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.07.2025. После доработки 13.09.2025. Принята к публикации 15.09.2025.