


Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Изменение профиля метилирования ДНК в ткани печени при прогрессировании HCV-индуцированного фиброза до гепатоцеллюлярной карциномы

И.А. Гончарова , А.А. Зарубин, Н.П. Бабушкина, Ю.А. Королева, М.С. Назаренко

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия
 irina.goncharova@medgenetics.ru

Аннотация. С использованием данных GSE73003 и GSE37988, представленных в базе данных GEODataSets (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), проведен сравнительный анализ уровня метилирования 27 578 CpG-сайтов между парными образцами опухолевой и окружающей опухоль тканями печени различной степени поражения (фиброз, цирроз) у больных HCV-индуцированной гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК), а также между опухолевой и нормальной тканью у больного ГЦК невирусной этиологии. Выявлено значительно меньшее число дифференциально метилированных сайтов между нормальной тканью печени и ГЦК невирусной этиологии, а также между ГЦК и фиброзом (32 и 40), чем между ГЦК и циррозом (2450 и 2304 соответственно по данным GSE73003 и GSE37988). По мере прогрессирования патологического изменения окружающей опухоль ткани уменьшается соотношение количества гипер-/гипометилированных дифференциально метилированных сайтов в опухоли. Так, в опухолевой ткани по сравнению с нормальной/фиброзом/циррозом печени гиперметилированы 75/62.5/47.7 % (GSE73003) и 16 % (GSE37988) CpG-сайтов соответственно. Стойкое гиперметилирование генов *ZNF154* и *ZNF540*, а также гипометилирование *CCL20* зарегистрировано в опухолевой ткани относительно как фиброза, так и цирроза печени. Белковые продукты генов *EDG4*, *CCL20*, *GPR109A* и *GRM8*, CpG-сайты которых характеризуются изменением уровня метилирования ДНК в опухоли на фоне цирроза и фиброза, принадлежат к категории «передачи сигналов рецепторов, связанных с G-белком». Однако изменение уровня метилирования «драйверных» для онкопатологии генов (*APC*, *CDKN2B*, *GSTP1*, *ELF4*, *TERT*, *WT1*) регистрируется в опухолевой ткани на фоне цирроза печени, но не фиброза. Среди гиперметилированных в опухолевой ткани генов на фоне цирроза печени наиболее представленными биологическими путями являются процессы развития, передачи межклеточных сигналов, регуляции транскрипции, связывания с белками Wnt-пути. Гены, гипометилированные в опухолевой ткани печени на фоне ее цирротического поражения, относятся к передаче обонятельных сигналов, нейроактивному взаимодействию лиганда с рецептором, кератинизации, иммунному ответу, ингибированию сериновых протеаз и метаболизму цинка. Гиперметилированные в опухоли гены локализуются в локусе 7p15.2 в регионе кластера *HOXA*, а гипометилированные CpG-сайты занимают протяженные области генома в кластерах генов обонятельных рецепторов (11p15.4), кератина и кератин-ассоциированных белков (12q13.13, 17q21.2 и 21q22.11), комплекса эпидермальной дифференцировки (1q21.3), а также функционирования иммунной системы – локусы 9p21.3 (кластер *IFNA*, *IFNB1*, *IFNW1*) и 19q13.41–19q13.42 (кластеры *KLK*, *SIGLEC*, *LILR*, *KIR*). Среди генов фиброгенеза или репарации ДНК *cg14143055* (*ADAMDEC1*) локализован в регионе связывания транскрипционных факторов семейства HOX, а *cg05921699* (*CD79A*), *cg06196379* (*TREM1*) и *cg10990993* (*MLH1*) расположены в области связывания транскрипционных факторов семейства белков ZNF. Таким образом, профиль метилирования ДНК в печени при HCV-индуцированной ГЦК является уникальным и различается в зависимости от степени поражения окружающей ткани – фиброз или цирроз.
Ключевые слова: метилирование ДНК; ХВГС; фиброз печени; цирроз печени; гепатоцеллюлярная карцинома.

Для цитирования: Гончарова И.А., Зарубин А.А., Бабушкина Н.П., Королева Ю.А., Назаренко М.С. Изменение профиля метилирования ДНК в ткани печени при прогрессировании HCV-индуцированного фиброза до гепатоцеллюлярной карциномы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(1):72-82. DOI 10.18699/VJGB-23-10

Changes in DNA methylation profile in liver tissue during progression of HCV-induced fibrosis to hepatocellular carcinoma

I.A. Goncharova , A.A. Zarubin, N.P. Babushkina, I.A. Koroleva, M.S. Nazarenko

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia
 irina.goncharova@medgenetics.ru

Abstract. In this study we compared methylation levels of 27,578 CpG sites between paired samples of the tumor and surrounding liver tissues with various degrees of damage (fibrosis, cirrhosis) in HCV-induced hepatocellular carcinoma (HCC) patients, as well as between tumor and normal tissue in non-viral HCC patients, using GSE73003 and GSE37988 data from GEODataSets (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A significantly lower number of differentially methylated sites (DMS) were found between HCC of non-viral etiology and normal liver tissue, as well as between

HCC and fibrosis (32 and 40), than between HCC and cirrhosis (2450 and 2304, respectively, according to GSE73003 and GSE37988 datasets). As the pathological changes in the tissue surrounding the tumor progress, the ratio of hyper-/hypomethylated DMSs in the tumor decreases. Thus, in tumor tissues compared with normal/fibrosis/cirrhosis of the liver, 75/62.5/47.7 % (GSE73003) and 16 % (GSE37988) of CpG sites are hypermethylated, respectively. Persistent hypermethylation of the *ZNF154* and *ZNF540* genes, as well as *CCL20* hypomethylation, were registered in tumor tissue in relation to both liver fibrosis and liver cirrhosis. Protein products of the *EDG4*, *CCL20*, *GPR109A*, and *GRM8* genes, whose CpG sites are characterized by changes in DNA methylation level in tumor tissue in the setting of cirrhosis and fibrosis, belong to "Signaling by G-protein-coupled receptors (GPCRs)" category. However, changes in the methylation level of the "driver" genes for oncopathology (*APC*, *CDKN2B*, *GSTP1*, *ELF4*, *TERT*, *WT1*) are registered in tumor tissue in the setting of liver cirrhosis but not fibrosis. Among the genes hypermethylated in tumor tissue in the setting of liver cirrhosis, the most represented biological pathways are developmental processes, cell-cell signaling, transcription regulation, Wnt-protein binding. Genes hypomethylated in liver tumor tissue in the setting of liver cirrhosis are related to olfactory signal transduction, neuroactive ligand-receptor interaction, keratinization, immune response, inhibition of serine proteases, and zinc metabolism. The genes hypermethylated in the tumor are located at the 7p15.2 locus in the *HOXA* cluster region, and the hypomethylated CpG sites occupy extended regions of the genome in the gene clusters of olfactory receptors (11p15.4), keratin and keratin-associated proteins (12q13.13, 17q21.2, and 21q22.11), epidermal differentiation complex (1q21.3), and immune system function loci 9p21.3 (*IFNA*, *IFNB1*, *IFNW1* cluster) and 19q13.41–19q13.42 (*KLK*, *SIGLEC*, *LILR*, *KIR* clusters). Among the genes of fibrogenesis or DNA repair, cg14143055 (*ADAMDEC1*) is located in the binding region of the HOX gene family transcription factors (TFs), while cg05921699 (*CD79A*), cg06196379 (*TREM1*) and cg10990993 (*MLH1*) are located in the binding region of the ZNF protein family transcription factor (TF). Thus, the DNA methylation profile in the liver in HCV-induced HCC is unique and differs depending on the degree of surrounding tissue lesion – liver fibrosis or liver cirrhosis.

Key words: DNA methylation; chronic hepatitis C; HCV; liver fibrosis; liver cirrhosis; hepatocellular carcinoma.

For citation: Goncharova I.A., Zarubin A.A., Babushkina N.P., Koroleva I.A., Nazarenko M.S. Changes in DNA methylation profile in liver tissue during progression of HCV-induced fibrosis to hepatocellular carcinoma. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(1):72-82. DOI 10.18699/VJGB-23-10

Введение

Злокачественные новообразования печени характеризуются растущим уровнем заболеваемости во всем мире (Philips et al., 2021). Самая высокая заболеваемость и смертность наблюдаются в Восточной Азии и Африке, где ведущей причиной развития гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) является хронический вирусный гепатит В и неалкогольная жировая болезнь печени (НЖБП). Вместе с тем в развитых странах одной из основных причин развития ГЦК считается хронический вирусный гепатит С (ХВГС), распространенность которого высока в Европе, а максимальные значения приходится на страны Восточной Европы, в том числе Россию (Goossens, Hoshida, 2015; Petruzzello et al., 2016).

Молекулярные механизмы развития ГЦК существенно различаются в зависимости от этиологии заболевания. Так, вирус гепатита В (HBV) может интегрироваться в геном гепатоцита хозяина, что приводит к прямому запуску канцерогенеза посредством активации протонкогенов и/или подавления активности генов-супрессоров опухолей (Levgero, Zucman-Rossi, 2016). В свою очередь вирус гепатита С (HCV), представляющий собой РНК-вирус, имеет ограниченные возможности интеграции в геном клетки печени хозяина и осуществляет свой канцерогенный потенциал путем включения многоэтапного процесса, приводящего через хроническое воспаление печени и прогрессирование фиброза к образованию и развитию опухолевых клонов. Риск развития ГЦК при хронической инфекции HCV напрямую связан с тяжестью фиброза печени, является редким событием при начальных стадиях фиброза и значительно выше у пациентов с циррозом (Khatun et al., 2021).

Среди различных факторов, определяющих подверженность HCV-инфекции и прогрессирование фиброза до ГЦК, немаловажную роль играет генетический и эпи-

генетический компонент. В частности, полногеномные ассоциативные исследования (GWAS) выявили около 140 локусов, из которых 84 отнесены к известным генам, белковые продукты которых вовлечены в ответ на HCV-инфекцию, противовирусную терапию, спонтанный клиренс вируса, развитие осложнений на интерферонотерапию (Kanz et al., 2005).

Идентифицированы гены, в том числе *EXO1*, *VCAN*, *KIT* и *MIR200C*, которые ассоциированы с развитием HCV-индуцированной ГЦК и рассматриваются в качестве потенциальных мишеней для фармакотерапии (Goossens, Hoshida, 2015; Schulze et al., 2015; Chen et al., 2021). Кроме того, показано прогностическое значение микроРНК, определяемых в ткани печени или сыворотке крови, при развитии HCV-индуцированной ГЦК (Aly et al., 2020; Yan et al., 2021).

Экспериментальные исследования aberrаций метилома ткани печени при ее патологии в зависимости от этиологических причин немногочисленны (Neumann et al., 2012; Hlady et al., 2014). Основными в отношении вирусной этиологии являются данные, полученные при сравнительном анализе парных опухолевых и непораженных участков печени у больных азиатского происхождения с ГЦК на платформе Illumina Infinium Human Methylation BeadChip 27k (Shen et al., 2012; Mah et al., 2014; Yamada et al., 2016). Ряд работ связан с реанализом имеющихся результатов по метилированию ДНК с привлечением дополнительных данных, в том числе полученных на микрочипе Illumina Human Methylation 450 BeadChip, из атласа генома рака TCGA (The Cancer Genome Atlas) (Fan et al., 2018; Meng et al., 2018; Wang Y. et al., 2019; Jiang et al., 2020; Zhao et al., 2021).

При сравнении списков дифференциально метилированных CpG-сайтов между анализируемыми участками ткани печени у пациентов с ГЦК в разных исследова-

ниях (Shen et al., 2012; Mah et al., 2014; Yamada et al., 2016) выявляется их существенное сходство. Например, список гиперметилированных в опухолевой ткани генов, представленных в работе (Yamada et al., 2016), на 93 % перекрывается с данными другого коллектива (Mah et al., 2014). Иная картина наблюдается при сравнении результатов реанализов. Так, в списках значимых для развития ГЦК генов, представленных в различных исследованиях, практически отсутствуют общие гены (Fan et al., 2018; Meng et al., 2018; Wang Y. et al., 2019; Jiang et al., 2020). Это объясняется разными критериями, выбранными для реанализа первичных данных, приведенных в репозитории GEO (Edgar et al., 2002; Barrett et al., 2013). Вместе с тем ни в одной из упомянутых работ не учитывалась этиология ГЦК, и в анализируемую группу включались как пациенты с носительством HBV или HCV, так и без носительства вирусов или их сочетаний.

Вклад метилирования ДНК в развитие HCV- и HBV-индуцированной ГЦК рассмотрен в метаанализах, включающих исследования таргетного метилирования генов-мишеней, ассоциированных с заболеваниями печени (Zhang et al., 2019, 2022). Выявлены гены, гиперметилированные в опухолевых тканях печени при ГЦК различной вирусной этиологии, которые, однако, в значительной степени являются общими, что не дает полного представления об особенностях профиля метилирования ДНК при воздействии вирусов гепатита В и С.

Нашим коллективом проводились работы в отношении генетических аспектов ХВГС. В результате установлены ассоциации полиморфизма генов фиброгенеза и репарации ДНК с патологией и патогенетически значимыми признаками, в том числе стадиями фиброза печени (Гончарова и др., 2020). Не исключено, что существуют особенности профиля метилирования ДНК в ткани печени на фоне фиброза и цирроза, индуцированные HCV и обуславливающие ГЦК.

Таким образом, целью настоящего исследования было выявление изменения профиля метилирования ДНК, в том числе в области генов, вовлеченных в фиброгенез или репарацию ДНК, в ткани печени при прогрессировании HCV-инфекции от фиброза печени до ГЦК с помощью реанализа первичных данных, находящихся в репозитории GEO.

Материалы и методы

В открытом доступе GEO имеются данные нескольких исследований, в которых анализировался профиль метилирования ДНК в печени у больных азиатского происхождения с ГЦК, обусловленной вирусными гепатитами В и С, на платформе Illumina Infinium Human Methylation BeadChip 27k (табл. 1). Для европеоидов данных по метилированию ДНК при ГЦК в репозитории GEO нет.

Из данных GSE73003 и GSE37988 для анализа выбраны пациенты, у которых диагностирован ХВГС по наличию суммарных антител к вирусу гепатита С (HCVab+) и отсутствию поверхностного антигена вирусного гепатита В (HBsAg-). Из набора GSE73003 в анализ вошли пациенты с HCV-индуцированной ГЦК, у которых неопухолевая ткань печени характеризовалась различными стадиями фибротического поражения: фиброз печени на фоне ХВГС ($n = 3$) и цирроз печени ($n = 8$). Кроме того, в работу включен один пациент с ГЦК неустановленной этиологии, но без HCVab и HBsAg, у которого окружающая ткань печени определена как нормальная (ГЦК_нормальная ткань/нормальная ткань).

Из массива GSE37988 в анализ включены пациенты с HCV-индуцированной ГЦК, у которых неопухолевая ткань печени находилась на стадии цирроза ($n = 6$). В настоящей работе мы не дифференцировали ткани и не использовали гистологические срезы, а опирались только на данные, представленные в GSE37988 и GSE73003 GEODataSets (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Таблица 1. Общая характеристика работ, связанных с анализом профиля метилирования ДНК в печени у больных ГЦК, обусловленной вирусными гепатитами В и С, с помощью метилочипа Illumina Infinium Human Methylation BeadChip 27k

Номер в GEO	Популяция	Количество пациентов с ГЦК, ткань печени	Результат	Литературный источник
GSE37988	Тайвань	$n = 62$, парные опухолевые/неопухолевые участки	684 CpG-сайта гиперметилированы и 1640 – гипометилированы в опухоли по сравнению с неопухолевыми тканями ($\Delta\beta \geq 0.20$, $FDR \leq 0.05$). В опухоли гиперметилирование подтверждено для генов <i>CDKL2</i> , <i>STEAP4</i> , <i>HIST1H3G</i> , <i>CDKN2A</i> и <i>ZNF154</i>	Shen et al., 2012
GSE57956	Сингапур	$n = 59$, парные опухолевые/неопухолевые участки	2037 CpG-сайтов гиперметилированы и 2379 – гипометилированы в опухоли по сравнению с неопухолевыми тканями ($\Delta\beta > 0.10$, $FDR < 0.05$). В опухоли гиперметилирование подтверждено для генов <i>SPDY1</i> , <i>TSPYL5</i> , <i>PKDREJ</i> , <i>ZNF154</i> , <i>TUBB6</i> , <i>CYB5R2</i> и <i>SH3YL1</i> , а гипометилирование – для <i>CYB11B1</i> и <i>SPRR3</i>	Mah et al., 2014
GSE73003	Япония	$n = 20$, парные опухолевые/неопухолевые участки	875 CpG-сайтов гиперметилированы и 1795 – гипометилированы в опухоли по сравнению с неопухолевыми тканями ($\Delta\beta > 0.15$, $FDR < 0.01$). Гиперметилирование в опухоли подтверждено для генов <i>APC</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>GSTP1</i> , <i>AKR1B1</i> , <i>GRASP</i> , <i>MAP9</i> , <i>NXP2</i> , <i>RSPH9</i> , <i>SPINT2</i> , <i>STEAP4</i> и <i>ZNF154</i>	Yamada et al., 2016

Поскольку в данных GSE57956 не приведена информация по этиологии патологии, в частности инфицированию вирусами гепатитов В и С, образцы тканей не вошли в настоящее исследование.

Кроме 27578 CpG-сайтов, представленных на метило-чипе Illumina Infinium Human Methylation BeadChip 27k, отдельно был оценен статус метилирования генов фиброгенеза и репарации ДНК, которые по результатам наших предыдущих исследований были ассоциированы с ХВГС, стадиями фиброза печени, скоростью прогрессирования фиброза до цирроза печени и коморбидными с ХВГС патологиями (Гончарова и др., 2020).

Статистический анализ данных осуществлен с помощью пакетов lumi, limma в программной среде R (Bioconductor). Коррекция на множественные сравнения выполнена по методу Benjamini–Hochberg (FDR).

В качестве параметра уровня метилирования ДНК использован показатель индекса метилирования β , который соответствует отношению флуоресцентных сигналов метилированных аллелей к сумме флуоресцентных сигналов метилированных и неметилированных аллелей. Индекс метилирования β варьирует от 0 (неметилированное состояние) до 1 (полное метилирование всех CpG-сайтов в данном положении). Дифференциально метилированными считались CpG-сайты с разницей среднего уровня метилирования между группами образцов $FDR < 0.05$ и $|\Delta\beta| \geq 0.2$, что превышает погрешность измерения на микрочипе и дополняет статистическую значимость различий биологически обоснованным критерием.

Функциональная аннотация белковых продуктов генов, включающих дифференциально метилированные CpG-сайты (ДМС), была выполнена с помощью программ Web-based GENE SeT AnaLysis Toolkit с редукцией категорий Weighted set cover (Liao et al., 2019) и Metascape (Zhou et al., 2019). Категории описываемых генов в терминах биологических процессов и молекулярных функций соответствуют классификатору базы данных Gene Ontology (GO), сигнальных и метаболических путей – KEGG и Reactome, лекарственных мишеней – DrugBank, хромосомной локализации – Chromosomal Location.

Дополнительно была проведена геномная аннотация ДМС генов фиброгенеза и репарации ДНК в клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 с помощью ресурса UCSC (Kent et al., 2002), которая позволила охарактеризовать CpG-сайты, локализованные в промоторах генов, областях открытого хроматина, доступных для РНК-полимеразы II, сайтах связывания транскрипционных факторов (ТФ) и тем самым, возможно, влияющие на изменение экспрессии генов.

Результаты и обсуждение

Идентификация ДМС и их генов между опухолевой и неопухолевой тканями печени (норма без вирусов гепатита С и В, фиброз и цирроз на фоне ХВГС) у пациентов с ГЦК

При сравнительном анализе уровня метилирования 27578 CpG-сайтов между парными образцами, охарактеризованными как ГЦК, окруженная нормальной тканью, и нормальная ткань печени у пациента без вирусов гепа-

тита С и В (GSE73003), выявлено 32 ДМС, среди которых 24 CpG-сайта (21 ген) гиперметилированы и 8 CpG-сайтов (7 генов) гипометилированы в опухолевой относительно нормальной ткани (рис. 1, а). По два CpG-сайта выявлены в генах *RBM4*, *SOX9* и *SPAG8* (гиперметилированы в опухолевой ткани), а также в *ACTA2* (гипометилированы).

Двадцать CpG-сайтов с наибольшими различиями в уровне метилирования между опухолевой и нормальной тканями печени представлены в Прил. 1¹. Большая их часть расположена в области CpG-островков (16, или 80%). Среди них CpG-сайты генов *RBM4*, *TRIP12*, *BFSP1*, *FBP1*, *SGCE* и *PTPN4*, ранее показавших связь с развитием ГЦК (см. Прил. 1).

Между ГЦК, окруженной фиброзной тканью, и фиброзом при ХВГС (GSE73003) выявлено 40 дифференциально метилированных сайтов (см. рис. 1, б). В опухолевой ткани печени относительно фиброзной гиперметилированы 25 CpG-сайтов (24 гена) и гипометилированы 15 CpG-сайтов (15 генов). Значимые изменения уровня метилирования при онкотрансформации фиброзной ткани печени показаны для CpG-сайтов генов *ZNF154*, *DNM3*, *DLEC1*, *LYPD3*, *DDX49*, *NEFH*, *CCL20* и *NNMT*, которые были ранее связаны с развитием ГЦК (см. Прил. 1). Причем наиболее существенное гиперметилирование в опухоли по сравнению с фиброзом выявлено для двух CpG-сайтов, расположенных в области островка 1-го экзона гена *ZNF154* ($\Delta\beta = 0.593-0.596$, $FDR < 0.01$).

Из всех дифференциально метилированных генов (ДМГ) только белковый продукт *CCL20* является проангиогенным хемокином, индуцируемым HVC, который обеспечивает инвазию и миграцию эндотелиальных клеток при формировании ГЦК (Benkheil et al., 2018). Сайт cg21643045 гена *CCL20*, расположенный в 1-м экзоне, был гипометилирован в опухолевой ткани относительно фиброзной ($\Delta\beta = -0.382$, $FDR = 0.0235$).

При сравнении уровня метилирования ДНК между парными образцами тканей печени (опухолевой и пораженной циррозом) при ХВГС (GSE73003) выявлено 2450 ДМС (см. рис. 1, в). В ткани печени, пораженной опухолью, относительно неопухолевой ткани гиперметилированы 1168 CpG-сайтов (886 генов) и гипометилированы 1282 CpG-сайта (998 генов).

Из двадцати CpG-сайтов генов, показавших наиболее значимые изменения уровня метилирования при онкотрансформации ткани печени, пораженной циррозом, гены *GRM8*, *DNM3*, *DLEC1*, *ZNF154*, *WNK2*, *MFAP5*, *FOXD3*, *NEFH*, *MTNR1B*, *CCL20* и *RAB31* связаны с развитием ГЦК (см. Прил. 1). Более того, cg21790626 гена *ZNF154* и cg21643045 гена *CCL20* были гипер- и гипометилированы соответственно в опухолевой ткани относительно цирротической ($\Delta\beta = 0.598$, $FDR = 3.10 \times 10^{-7}$ и $\Delta\beta = -0.459$, $FDR = 1.43 \times 10^{-6}$).

Сравнительный анализ уровня метилирования 27578 CpG-сайтов между парными образцами опухолевой и неопухолевой ткани печени на фоне HCV-индуцированного цирроза печени (GSE37988) выявил 2304 ДМС (см. рис. 1, з). В опухолевой ткани печени относительно

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:
<https://sites.icgbio.ru/vogis/download/pict-2023-27/appx1.pdf>

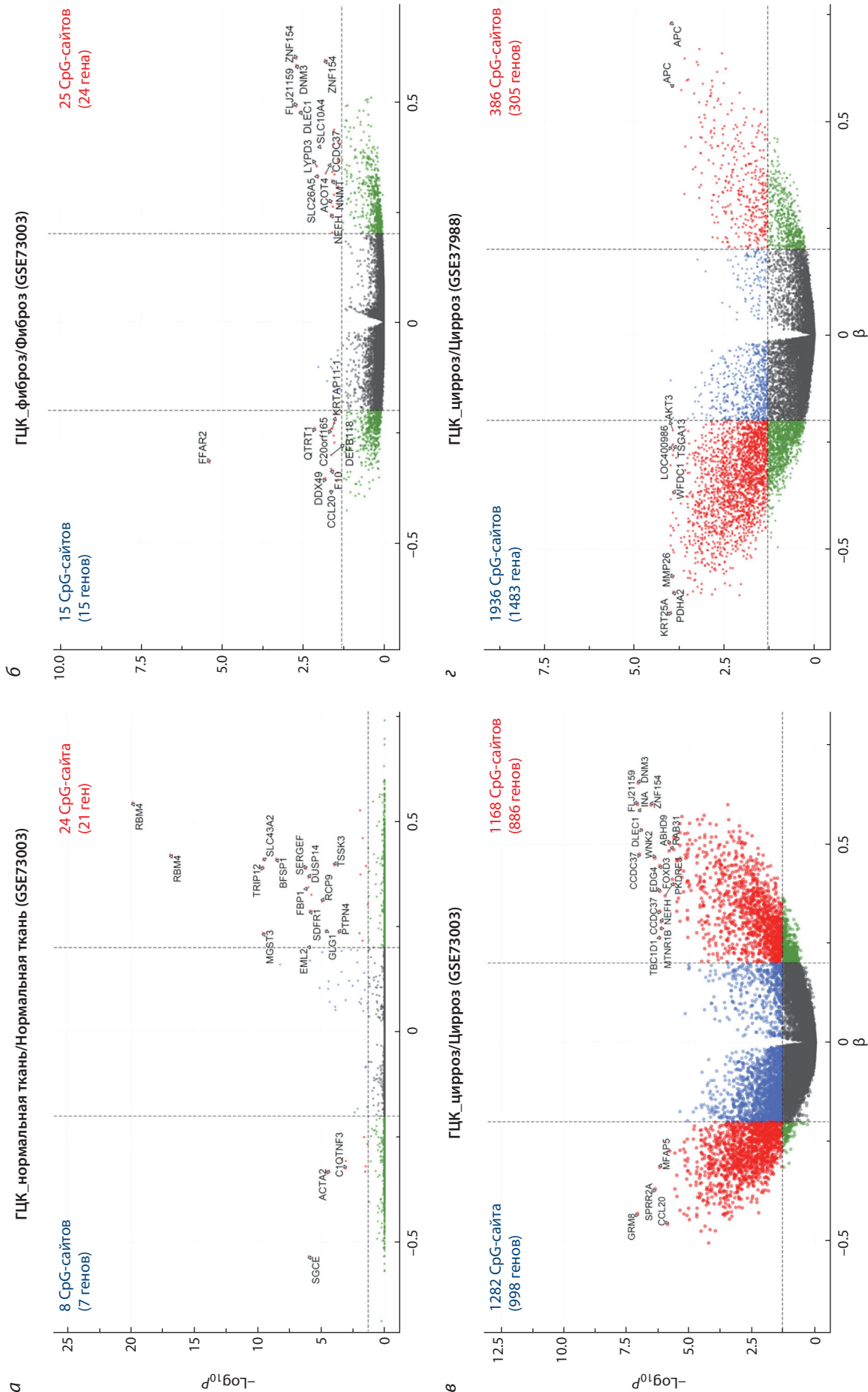


Рис. 1. Дифференциально метилированные CpG-сайты (гены) с различиями в уровне метилирования CpG-сайтов $|\Delta\beta| > 0.2$ и $FDR < 0.05$: а – между ГЦК с прилегающей нормальной тканью печени и нормальной тканью печени без вирусов гепатита С и В (GSE73003); б – между ГЦК с прилегающей фиброзной тканью печени и фиброзом печени при ХВГС (GSE73003); в – между ГЦК с прилегающей тканью печени, пораженной циррозом, и тканью с прилегающей циррозом, и тканью с циррозом печени при ХВГС (GSE73003); г – между ГЦК с прилегающей тканью печени, пораженной циррозом, и тканью с циррозом печени при ХВГС (GSE73003).

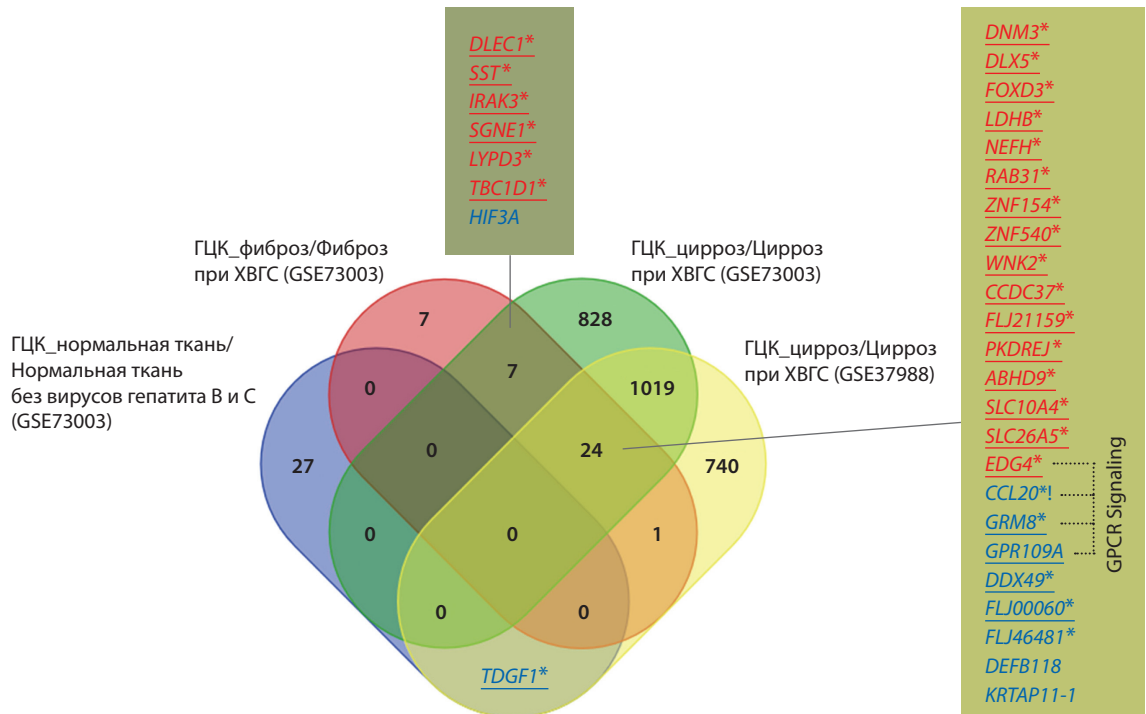


Рис. 2. Венн-диаграмма, отражающая количество общих ДМГ между опухолевой и прилегающей к ней тканями печени различной степени поражения (норма без вирусов С и В, фиброз и цирроз при ХВГС) у пациентов с ГЦК.

Синий/красный цвет – гипо-/гиперметилированные в опухолевой ткани относительно неопухолевой гены; подчеркивание – расположение ДМС в области CpG-островка; *!/ – вовлеченность гена в ГЦК/ГЦК при ХВГС.

пораженной циррозом гиперметилированы 386 CpG-сайтов (305 генов) и гипометилированы 1936 CpG-сайтов (1483 гена).

Гены и CpG-сайты, показавшие наиболее значимые изменения уровня метилирования при онкотрансформации ткани печени, пораженной циррозом по данным GSE37988, представлены в Прил. 1. Среди них гены *MAGEA3*, *APC*, *AKT3*, *MMP26* и *WFDC1* ассоциированы с ГЦК по результатам предыдущих исследований (см. Прил. 1). В отличие от данных GSE73003, меньшая часть CpG-сайтов (7 из 20, или 35 %) располагалась в области островков. Причем из них только два, *cg16970232* и *cg24332422* гена *APC*, были гиперметилированы в опухолевой ткани по сравнению с цирротической ($\Delta\beta = 0.730$, $FDR = 1.0 \times 10^{-4}$ и $\Delta\beta = 0.581$, $FDR = 1.2 \times 10^{-4}$).

Характеристика общих ДМГ между опухолевой и неопухолевой тканями печени (норма без вирусов гепатита С и В, фиброз и цирроз на фоне ХВГС) у пациентов с ГЦК

При сравнении списков генов, содержащих ДМС у пациентов с ГЦК между опухолевой и неопухолевой тканями в зависимости от степени поражения прилегающей к опухоли ткани печени, показано, что *ZNF154*, *DNM3*, *FLJ21159*, *DLEC1*, *CCDC37*, *NEFH*, *CCL20* и *KRTAP11-1* входят в состав топовых с максимальными различиями в уровнях метилирования CpG-сайтов между тканями (см. Прил. 1).

Дифференциально метилированные гены между опухолевыми тканями и фиброзом/циррозом печени (GSE73003) характеризуются наличием семи общих генов, шесть из

которых гиперметилированы в опухоли независимо от степени поражения окружающей ткани (рис. 2). Пять из семи ДМС общих генов локализованы в пределах CpG-островка. Для генов *DLEC1*, *SST*, *IRAK3*, *SGNE1*, *LYPD3* и *TBC1D1* ранее показана связь с развитием ГЦК, причем гены *DLEC1*, *IRAK3* и *SGNE1* были гиперметилированы в опухоли (Qiu et al., 2008; Kuo et al., 2015; Meng et al., 2018), что согласуется с результатами настоящего исследования.

Общими для опухоли при фиброзе и циррозе двух наборов данных (GSE73003 и GSE37988) являются 24 ДМГ, среди которых 16 (66.7 %) гиперметилированы и расположены в области CpG-островка (см. рис. 2). Ранее для 21 гена была показана связь с развитием ГЦК: *DNM3* характеризовался снижением экспрессии, а *FOXD3*, *LDHB*, *NEFH*, *ZNF154*, *FLJ21159*, *PKDREJ*, *ABHD9* и *WNK2* – гиперметилированием в тканях опухоли (Shen et al., 2012; Revill et al., 2013; Liu Z. et al., 2016; Meng et al., 2018; Miller et al., 2021). Гены *CCDC37*, *CCL20*, *DNM3*, *ZNF154* и *ZNF540* перекрываются со списком двадцати ДМГ при ГЦК без учета этиологии (Shen et al., 2012).

Среди восьми гипометилированных в опухоли генов для *CCL20*, *DDX49* и *GRM8* ранее было выявлено повышение экспрессии в сыворотке крови и/или опухолевой ткани у больных ГЦК, в том числе для *CCL20* при ГЦК на фоне ХВГС (Benkheil et al., 2018; Dai et al., 2021; Gao et al., 2022).

Функциональная аннотация общих 24 ДМГ между опухолевой и прилегающей к ней тканью печени различной степени поражения с использованием ресурса Metascape (см. рис. 2) показала связь гиперметилированного (*EDG4*)

и гипометилированных генов (*CCL20*, *GPR109A* и *GRM8*) с процессами, осуществляющими передачу сигналов от рецепторов, связанных с G-белком (Signaling by GPCR: R-HSA-372790). Более того, экспрессия гена *GRM8* в опухолевой ткани отрицательно коррелирует с выживаемостью пациентов с ГЦК, а уровень его метилирования входит в панель генов, важную для прогнозирования заболевания (Gao et al., 2022). Белкам GPCR отводят роль онкомодуляторов, aberrантная экспрессия которых влияет на различные сигнальные пути клеток, нарушая ангиогенез, инвазию, миграцию, метастазирование, иммунный ответ при инициации и прогрессировании ГЦК, что делает их привлекательными терапевтическими молекулярными мишенями (Peng et al., 2018).

В настоящем исследовании выявлено гиперметилирование CpG-сайтов генов *ZNF154* и *ZNF540*, кодирующих белки цинковых пальцев, в опухолевой ткани печени по сравнению с фиброзом и циррозом (см. рис. 2). Некоторые белки данной категории входят в состав сигнатуры прогностических маркеров выживаемости пациентов с HCV-индуцированной ГЦК и являются топовыми гиперметилированными генами при ГЦК различной этиологии (Shen et al., 2012; Wang X. et al., 2021). Анализ экспрессии данных генов в печени показал, что при ГЦК различной этиологии наблюдается репрессия транскрипции многих белков цинковых пальцев *ZNF* (Gonçalves et al., 2022). Вероятно, при ГЦК, индуцированной HCV, гены белков цинковых пальцев, в частности *ZNF154* и *ZNF540*, могут быть перспективными ранними маркерами онкотрансформации начиная с фиброза, а не только на фоне цирроза печени.

Ни один ген из списка 24 общих ДМГ между опухолевой и прилегающей к ней тканями печени при фиброзе и циррозе на фоне ХВГС двух наборов данных (GSE73003 и GSE37988) не входил в перечень известных молекулярных «драйверов» злокачественных новообразований, включая ГЦК (Hlady et al., 2014; Bailey et al., 2018; Cai et al., 2020; Molina-Sánchez et al., 2020; Zhang et al., 2022). Однако такие гены обнаружены среди ДМГ между опухолевой и цирротической тканями. В частности, в опухолевой ткани были гиперметилированы CpG-сайты, входящие в островки промоторов генов *APC*, *CDKN2B*, *GSTP1*, *ELF4* и *TERT*, а разные CpG-сайты гена *WT1* характеризовались разнонаправленным изменением их уровня метилирования.

Функциональная аннотация ДМГ между опухолевой и неопухолевой тканями печени (норма без вирусов гепатита С и В, фиброз и цирроз на фоне ХВГС) у пациентов с ГЦК

По наиболее представленным биологическим путям и основным молекулярным функциям гены гипо- и гиперметилированных CpG-сайтов в опухолевой ткани по сравнению с цирротическими тканями у пациентов с ГЦК при ХВГС сходны между данными GSE73003 и GSE37988 (Прил. 2). Так, для генов, CpG-сайты которых гиперметилированы в опухолевой ткани, наиболее представленными являются биологические процессы, относящиеся к процессам развития (GO:0007399, GO:0009790, GO:0048468, FDR < 2.2×10^{-16}) и передаче межклеточных сигналов (GO:0007267, FDR < 2.2×10^{-16} , см. Прил. 2).

Эти результаты частично согласуются с данными (Shen et al., 2012), где среди наиболее значимых при ГЦК различной этиологии выделяются процессы развития. Гены, содержащие гиперметилированные CpG-сайты при HCV-индуцированной ГЦК, по молекулярным функциям сходны с выявленными при ГЦК различной этиологии (Shen et al., 2012) и включают регуляцию транскрипции и связывание с ДНК (GO:0003700; GO:0140110, GO:0003677, FDR < 0.0002), а также связывание белков Wnt-пути (GO:0017147, FDR = 1.3×10^{-4}).

Гиперметилированные гены локализованы на хромосоме 7 (7p15.2) в регионе кластера *HOXA* (FDR = 2.3×10^{-5} , см. Прил. 2). Ранее, при выявлении сигнатуры метилирования ДНК в ткани печени при ГЦК, было показано, что 39 из 214 CpG-сайтов ассоциированы с изменением экспрессии генов, в том числе локализованных в регионе chr7:27144326–27145664 в непосредственной близости к гомеобоксным факторам транскрипции (*HOXA6*, *HOXA3*, *HOXA5*, *HOXA7* и *HOXA4*), которые участвуют в онкогенезе, пролиферации и миграции клеток (Gonçalves et al., 2022).

Гипометилированные гены при HCV-индуцированной ГЦК относятся в основном к следующим биологическим процессам: иммунный и защитный ответы (GO:0006955, GO:0006952, FDR < 2.2×10^{-16}); сигнальный путь рецепторов, связанных с G-белком (GO:0007186, FDR < 6.0×10^{-10}); дифференцировка эпителиальных клеток (GO:0030855, FDR < 2.2×10^{-16} , см. Прил. 2), что частично согласуется с данными, полученными для ГЦК различной этиологии (Shen et al., 2012).

По молекулярным функциям гипометилированных генов при HCV-индуцированной ГЦК различной этиологии (Shen et al., 2012), с одной стороны, выявляется сходство в отношении ряда категорий, таких как связывание с рецепторами различных антигенов, а с другой – активность ингибиторов пептидазы, в том числе серинового типа, только при HCV-индуцированной карциноме (см. Прил. 2). В настоящее время известно, что ингибитор сериновой протеазы, секретлируемый опухолевыми клетками печени (SPINK1 или LC-SP1K), представляет собой белок, содержание которого значительно повышается в сыворотке крови индивидов при ГЦК вирусной этиологии (Lu et al., 2020).

Согласно базам данных KEGG и Reactome, наиболее значимыми молекулярными путями для гипометилированных в опухоли генов были передача обонятельных сигналов (hsa04740, FDR < 2.2×10^{-16}), взаимодействие между цитокиновыми рецепторами (hsa04060, FDR < 7.8×10^{-7}) и нейроактивное взаимодействие лиганда с рецептором (hsa04080, FDR < 0.0007), передача сигналов рецепторов, связанных с G-белком (R-HSA-372790, FDR < 3.5×10^{-6}), кератинизация (R-HSA-6805567, FDR < 2.2×10^{-16}) и иммунная система (R-HSA-168256, FDR < 3.4×10^{-6} , см. Прил. 2). По-видимому, это обусловлено тем, что в опухоли гипометилирование ДНК захватывает протяженные области генома в кластерах генов обонятельных рецепторов (11p15.4), кератина и кератин-ассоциированных белков (12q13.13, 17q21.2 и 21q22.11), комплекса эпидермальной дифференцировки (1q21.3), а также функционирования иммунной системы – локусы 9p21.3 (кластер *IFNA*, *IFNB1*,

IFNW1) и 19q13.41–19q13.42 (кластеры *LILR*, *KIR*, *KLK*, *ZNF*, *SIGLEC*, см. Прил. 2).

Нарушение эпигенетической регуляции иммунной системы является общей чертой при раке различной локализации (Berglund et al., 2021). Передача обонятельных сигналов и нейрорактивное взаимодействие лиганда с рецептором входят в путь передачи сигналов рецепторов, связанных с G-белком, обогащение которого тоже часто встречается при злокачественных новообразованиях (Wei et al., 2012). Эктопическая экспрессия генов обонятельных рецепторов, связанная в том числе с эпигенетическими механизмами, по-видимому, обеспечивает инвазивность и метастазирование опухолевых клеток на поздних стадиях процесса (Fessahaye et al., 2021). Нарушение процесса кератинизации – реже регистрируемое событие в опухоли, для которого показана связь с уровнем гидроксиметилирования ДНК при раке головы и шеи в зависимости от носительства вируса папилломы человека (Liu S. et al., 2020), а также обогащение гипометилированных генов при раке молочной железы (Holm et al., 2016).

База данных DrugBank указывает на то, что гипометилированные при HCV-индуцированной ГЦК гены участвуют в метаболизме цинка (DB01593), добавление которого в пищу может быть рекомендовано для снижения риска ГЦК после эрадикации HCV противовирусными препаратами прямого действия (Hosui et al., 2021). Не исключено, что существует связь между дефицитом цинка и гипометилированием ДНК в отдельных генах (Azimi et al., 2022).

Профиль метилирования генов фиброгенеза и репарации ДНК

Среди генов, белковые продукты которых участвуют в процессах фиброгенеза или репарации ДНК, из разряда ранее показавших ассоциации с заболеваниями печени в исследованиях нашей научной группы выявлено десять дифференциально метилированных CpG-сайтов (табл. 2). Сайты cg03876618 гена *IGFBP7* и cg14323109 гена *KDR*,

расположенные в области CpG-островков, были гиперметилированы в опухоли по сравнению с окружающей цирротически измененной тканью. CpG-сайты генов *ADAMDEC1*, *CD79A*, *MMP3* и *TREM1* дифференциально метилированы по данным GSE37988 и GSE73003 (см. табл. 2).

Проведение геномной аннотации с помощью ресурса UCSC показало, что в клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 в состав активного промотора входят cg01053621 (*APOA2*) и cg10990993 (*MLH1*), а в регионах связывания с субъединицей А РНК-полимеразы II локализованы cg03876618 (*IGFBP7*), cg14323109 (*KDR*), cg16466334 (*MMP3*), cg06196379 (*TREM1*) и cg01053621 (*APOA2*).

Сайт cg14143055 гена *ADAMDEC1*, гипометилированный в опухолевой ткани, локализован в регионе связывания транскрипционных факторов семейства HOX, которые играют немаловажную роль в онкогенезе различных опухолей, в том числе ГЦК (Gonçalves et al., 2022). Вместе с тем HCV инфекция и экспрессия корового белка вируса запускают активацию генов HOX (Kasai et al., 2021), что может быть одним из факторов развития HCV-индуцированной ГЦК.

Гипометилированные в опухолевой ткани при HCV-индуцированной ГЦК cg05921699 (*CD79A*), cg06196379 (*TREM1*), cg10990993 (*MLH1*) локализованы в области связывания TF семейства белков цинковых пальцев ZNF, которые кроме регуляции транскрипции осуществляют индукцию белок-белковых взаимодействий, посттранскрипционную регуляцию, липидный обмен, иммунные реакции и влияют на развитие многих форм рака, включая ГЦК (Li et al., 2022).

В заключение следует отметить, что проведенное исследование имеет ограничение в связи с малочисленностью выборок больных с нормальной и фибротической окружающей опухоль тканями при ХВГС, так как в большинстве случаев ГЦК развивается на фоне пораженной циррозом

Таблица 2. ДМС генов, участвующих в фиброгенезе и репарации ДНК, между опухолевой и тканью печени, пораженной циррозом у пациентов с ГЦК

CpG-сайт	Ген	Расстояние до TSS/локализация в CpG-островке	ГЦК/Цирроз			
			$\beta \pm SD$ (GSE73003)	FDR	$\beta \pm SD$ (GSE37988)	FDR
cg14143055	<i>ADAMDEC1</i>	1374/нет	0.46 ± 0.15/0.70 ± 0.04	0.0106	0.34 ± 0.16/0.73 ± 0.05	0.0038
cg05921699	<i>CD79A</i>	477/нет	0.52 ± 0.17/0.74 ± 0.03	0.0136	0.45 ± 0.20/0.74 ± 0.05	0.0469
cg16466334	<i>MMP3</i>	16/нет	0.35 ± 0.16/0.66 ± 0.02	0.0029	0.37 ± 0.22/0.71 ± 0.05	0.0300
cg06196379	<i>TREM1</i>	428/нет	0.21 ± 0.07/0.44 ± 0.02	0.0004	0.13 ± 0.12/0.36 ± 0.05	0.0139
cg03876618	<i>IGFBP7</i>	505/да	0.55 ± 0.22/0.19 ± 0.02	0.0011	–	–
cg14323109	<i>KDR</i>	181/да	0.34 ± 0.20/0.08 ± 0.02	0.0124	–	–
cg10990993	<i>MLH1</i>	1347/нет	0.19 ± 0.04/0.42 ± 0.09	0.0036	–	–
cg01053621	<i>APOA2</i>	573/нет	–	–	0.18 ± 0.12/0.47 ± 0.09	0.0119
cg06531741	<i>HTR3B</i>	139/нет	–	–	0.45 ± 0.24/0.79 ± 0.03	0.0437
cg03017475	<i>TAS2R38</i>	852/нет	–	–	0.25 ± 0.11/0.55 ± 0.07	0.0001

Примечание. TSS – точка инициации транскрипции; β – уровень метилирования; SD – стандартное отклонение. Полу жирным шрифтом выделены ДМС/ДМГ, гиперметилированные в опухолевой ткани по сравнению с пораженной циррозом тканью печени. Прочерк – CpG-сайты не являются дифференциально метилированными.

ткани и другие случаи наблюдаются значительно реже. В работе не была учтена внутриопухолевая и клеточная гетерогенность тканей, которая тесно связана с профилем метилирования ДНК (Hlady et al., 2017). Принимая во внимание тот факт, что фокус работы заключался в анализе профиля метилирования ДНК печени при HCV-индуцированной ГЦК, сложно однозначно выделить CpG-сайты, специфичные для данной патологии. Методическим ограничением является невозможность разграничения метилирования ДНК и гидроксиметилирования ДНК, поскольку она подвергается бисульфитной модификации перед гибридизацией на метилочипе.

Заключение

Сравнительный анализ профиля метилирования ДНК в печени у пациентов с ГЦК между опухолью и неопухолевыми тканями с различной степенью поражения (нормальная ткань, HCV-индуцированный фиброз, HCV-индуцированный цирроз) показал значительно меньшее число ДМС между ГЦК и нормальной тканью без вирусов гепатита С и В/фиброзом печени при ХВГС (32 и 40), чем между ГЦК и циррозом печени при ХВГС в данных GSE73003 и GSE37988 (2450 и 2304 соответственно).

Исходя из того, что уровень фиброза коррелирует с функцией печени, а цирроз представляет собой основной фактор риска развития ГЦК (Roehlen et al., 2020), можно было бы ожидать, что нормальная и фибротическая ткани печени будут максимально удалены по эпигенетическому профилю от ГЦК, и по мере прогрессирования фиброза до цирроза печени количество ДМС между опухолевыми и окружающей тканями будет сокращаться. Вместе с тем наблюдается обратная картина: чем значительнее поражение окружающей опухоль ткани печени, тем большие различия в уровне метилирования ДНК наблюдаются между ними. Возможно, нормальная ткань печени или ткань с минимальным фибротическим поражением способствует сдерживанию функциональной разбалансировки генома опухоли, приводя к минимальным отличиям профиля метилирования ДНК между данными тканями. Это предположение косвенно подтверждается тем, что изменение уровня метилирования «драйверных» для ГЦК генов регистрируется на фоне цирроза, но не фиброза.

По мере прогрессирования патологического изменения окружающей опухоль ткани печени уменьшается соотношение количества гипер-/гипометилированных ДМС в опухоли. Так, у пациентов с ГЦК в опухолевой ткани по сравнению с нормальной гиперметилированы 24 CpG-сайта, или 75 % от всех ДМС. По сравнению с тканью печени, пораженной фиброзом при ХВГС, в опухолевой ткани гиперметилированы 25 из 40 ДМС, что составляет 62.5 %. В том случае, когда окружающая опухоль ткань представляет собой цирроз печени, количество гиперметилированных CpG-сайтов в опухолевой ткани относительно группы сравнения составляет 47.7 и 16 % (GSE73003 и GSE37988 соответственно). В предыдущих исследованиях также было выявлено преобладание количества гипометилированных CpG-сайтов протяженных участков генома, в том числе в области генов и межгенных регионов, в опухоли при ГЦК относительно окружающей цирротической ткани печени (Shen et al., 2012; Hlady et al., 2014; Yamada

et al., 2016; Yan et al., 2021). В настоящей работе впервые показано, что у пациентов с ГЦК опухоль на фоне неизменной ткани печени и при фиброзе печени при ХВГС характеризуется большей долей гиперметилированных CpG-сайтов, а количество гипометилированных сайтов возрастает в опухолевой ткани при циррозе.

В исследованиях, посвященных изучению профиля метилирования генов в печени при ГЦК, основное внимание уделяется гиперметилированным генам, включая гены семейств ZNF и HOX, среди которых проводится поиск значимых для развития заболевания маркеров. Вместе с тем сравнительный анализ показал, что при HCV-индуцированной ГЦК в опухолевой ткани наблюдается большее число гиперметилированных CpG-сайтов только по сравнению с окружающей тканью с признаками фиброза. В случае же, когда окружающая опухоль ткань представляет собой цирроз печени, большинство локусов в опухолевой ткани гипометилированы, что, по-видимому, является поздним событием, происходящим при переходе от фибротического поражения тканей печени к злокачественной трансформации.

В связи с этим при HCV-индуцированной ГЦК необходимо уделять также внимание гипометилированным локусам, которые, как показали результаты данного исследования, относятся к белкам GPCR (*CCL20*, *GPR109A* и *GRM8*), локализованы в сайтах связывания ТФ HOX (*ADAMDECI*), ZNF (*CD79A*, *MLH1*) или в области генов ингибиторов сериновых протеаз, одна из которых – SPINK1 – в настоящее время рассматривается как маркер, способный выявить ГЦК вирусной этиологии на ранней стадии. Кроме того, в нашей работе гипометилированные ДМС были локализованы в генах, связанных с метаболизмом цинка, который, как известно, играет роль в патогенезе многих заболеваний, включая ГЦК.

Таким образом, при проведении исследований по оценке профиля метилирования ДНК в печени при ГЦК необходимо учитывать функциональное состояние и степень поражения окружающей опухоль ткани, так как спектр ДМГ значительно различается между парами опухоль/неопухоль ткани в зависимости от того, является ли она условно нормальной, с признаками фиброза или циррозом. Для выявления прогностических маркеров ГЦК, в том числе при жидкостной биопсии, следует учитывать этиологию заболевания, поскольку спектр ДМС и ДМГ HCV-индуцированной ГЦК лишь частично перекрывается с таковыми, выявленными при анализе данной патологии другой природы.

Список литературы / References

- Гончарова И.А., Назаренко М.С., Белобородова Е.В., Марков А.В., Пузырев В.П. Генетическая структура предрасположенности прогрессирования фиброза печени различной этиологии. *Мед. генетика*. 2020;19(8):83-84. DOI 10.25557/2073-7998.2020.08.83-84. [Goncharova I.A., Nazarenko M.S., Beloborodova E.V., Markov A.V., Puzirev V.P. Genetic structure of a predisposition to the progression of liver fibrosis of various etiologies. *Meditsinskaya Genetika = Medical Genetics*. 2020;19(8):83-84. DOI 10.25557/2073-7998.2020.08.83-84. (in Russian)]
- Aly D.M., Gohar N.A.-H., El-Hady A., Khairy M., Abdullatif M.M. Serum microRNA let-7a-1/let-7d/let-7f and miRNA 143/145 gene expression profiles as potential biomarkers in HCV induced hepato-

- cellular carcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2020;21(2):555-562. DOI 10.31557/APJCP.2020.21.2.555.
- Azimi Z., Isa M.R., Khan J., Wang S.M., Ismail Z. Association of zinc level with DNA methylation and its consequences: a systematic review. *Heliyon.* 2022;8(10):e10815. DOI 10.1016/j.heliyon.2022.e10815.
- Bailey M.H., Tokheim C., Porta-Pardo E., Sengupta S., Bertrand D., Weerasinghe A., Colaprico A., Wendl M.C., Kim J., Reardon B., Ng P.K., Jeong K.J., Cao S., Wang Z., Gao J., Gao Q., Wang F., Liu E.M., Mularoni L., Rubio-Perez C., Nagarajan N., Cortés-Ciriano I., Zhou D.C., Liang W.W., Hess J.M., Yellapantula V.D., Tamborero D., Gonzalez-Perez A., Suphavilai C., Ko J.Y., Khurana E., Park P.J., Van Allen E.M., Liang H., MC3 Working Group, Cancer Genome Atlas Research Network, Lawrence M.S., Godzik A., Lopez-Bigas N., Stuart J., Wheeler D., Getz G., Chen K., Lazar A.J., Mills G.B., Karchin R., Ding L. Comprehensive characterization of cancer driver genes and mutations. *Cell.* 2018;173(2):371-385.e18. DOI 10.1016/j.cell.2018.02.060.
- Barrett T., Wilhite S.E., Ledoux P., Evangelista C., Kim I.F., Tomashevsky M., Marshall K.A., Phillippy K.H., Sherman P.M., Holtko M., Yefanov A., Lee H., Zhang N., Robertson C.L., Serova N., Davis S., Soboleva A. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets – update. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(D1):D991-D995. DOI 10.1093/nar/gks1193.
- Benkheil M., Van Haele M., Roskams T., Laporte M., Noppen S., Abbasi K., Delang L., Neyts J., Liekens S. CCL20, a direct-acting pro-angiogenic chemokine induced by hepatitis C virus (HCV): potential role in HCV-related liver cancer. *Exp. Cell Res.* 2018;372(2):168-177. DOI 10.1016/j.yexcr.2018.09.023.
- Berglund A., Putney R.M., Hamaidi I., Kim S. Epigenetic dysregulation of immune-related pathways in cancer: bioinformatics tools and visualization. *Exp. Mol. Med.* 2021;53(5):761-771. DOI 10.1038/s12276-021-00612-z.
- Cai Y., Tian Y., Wang J., Wei W., Tang Q., Lu L., Luo Z., Li W., Lu Y., Pu J., Yang Z. Identification of driver genes regulating the T-cell – infiltrating levels in hepatocellular carcinoma. *Front. Genet.* 2020;11:560546. DOI 10.3389/fgene.2020.560546.
- Chen G., Zhang W., Ben Y. Identification of key regulators of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma by integrating whole-genome and transcriptome sequencing data. *Front. Genet.* 2021;12:741608. DOI 10.3389/fgene.2021.741608.
- Dai H., Feng J., Nan Z., Wei L., Lin F., Jin R., Zhang S., Wang X., Pan L. Morphine may act via DDX49 to inhibit hepatocellular carcinoma cell growth. *Aging (Albany NY).* 2021;13(9):12766-12779. DOI 10.18632/aging.202946.
- Edgar R., Domrachev M., Lash A.E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(1):207-210. DOI 10.1093/nar/30.1.207.
- Fan G., Tu Y., Chen C., Sun H., Wan C., Cai X. DNA methylation biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int.* 2018;18:140. DOI 10.1186/s12935-018-0629-5.
- Fessahaye G., Khalid R., Mohamed K.-H., Alsidqi M., Khalid A., Mohamed H., Ibrahim M. Breast cancer and smell: hints from epigenetic and functional alteration of the olfaction. (Preprint). 2021. DOI 10.21203/rs.3.rs-910345/v1.
- Gao Y., Liu J., Zhao D., Diao G. A novel prognostic model for identifying the risk of hepatocellular carcinoma based on angiogenesis factors. *Front. Genet.* 2022;13:857215. DOI 10.3389/fgene.2022.857215.
- Gonçalves E., Gonçalves-Reis M., Pereira-Leal J.B., Cardoso J. DNA methylation fingerprint of hepatocellular carcinoma from tissue and liquid biopsies. *Sci. Rep.* 2022;12(1):11512. DOI 10.1038/s41598-022-15058-0.
- Goossens N., Hoshida Y. Hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Clin. Mol. Hepatol.* 2015;21(2):105-114. DOI 10.3350/cmh.2015.21.2.105.
- Hlady R.A., Tiedemann R.L., Puszyk W., Zendejas I., Roberts L.R., Choi J.H., Liu C., Robertson K.D. Epigenetic signatures of alcohol abuse and hepatitis infection during human hepatocarcinogenesis. *Oncotarget.* 2014;5(19):9425-9443. DOI 10.18632/oncotarget.2444.
- Hlady R.A., Zhou D., Puszyk W., Roberts L.R., Liu C., Robertson K.D. Initiation of aberrant DNA methylation patterns and heterogeneity in precancerous lesions of human hepatocellular cancer. *Epigenetics.* 2017;12(3):215-225. DOI 10.1080/15592294.2016.1277297.
- Holm K., Staaf J., Lauss M., Aine M., Lindgren D., Bendahl P.-O., Vallon-Christersson J., Barkardottir R.B., Höglund M., Borg Å., Jönsson G., Ringnér M. An integrated genomics analysis of epigenetic subtypes in human breast tumors links DNA methylation patterns to chromatin states in normal mammary cells. *Breast Cancer Res.* 2016;18(1):27. DOI 10.1186/s13058-016-0685-5.
- Hosui A., Tanimoto T., Okahara T., Ashida M., Ohnishi K., Wakahara Y., Kusumoto Y., Yamaguchi T., Sueyoshi Y., Hirao M., Yamada T., Hiramatsu N. Oral zinc supplementation decreases the risk of HCC development in patients with HCV eradicated by DAA. *Hepatol. Commun.* 2021;5(12):2001-2008. DOI 10.1002/hep4.1782.
- Jiang H.Y., Ning G., Wang Y.S., Lv W.-B. 14-CpG-based signature improves the prognosis prediction of hepatocellular carcinoma patients. *BioMed Res. Int.* 2020;2020:9762067. DOI 10.1155/2020/9762067.
- Kanz C., Aldebert P., Althorpe N., Baker W., Baldwin A., Bates K., Browne P., van den Broek A., Castro M., Cochrane G., Duggan K., Eberhardt R., Faruque N., Gamble J., Diez F.G., Harte N., Kulikova T., Lin Q., Lombard V., Lopez R., Mancuso R., McHale M., Nardone F., Silventoinen V., Sobhany S., Stoehr P., Tuli M.A., Tzouvara K., Vaughan R., Wu D., Zhu W., Apweiler R. The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:D29-D33. DOI 10.1093/nar/gki098.
- Kasai H., Mochizuki K., Tanaka T., Yamashita A., Matsuura Y., Morishi K. Induction of HOX genes by hepatitis C virus infection via impairment of histone H2A monoubiquitination. *J. Virol.* 2021;95(6):e01784-20. DOI 10.1128/JVI.01784-20.
- Kent W.J., Sugnet C.W., Furey T.S., Roskin K.M., Pringle T.H., Zahler A.M., Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;12(6):996-1006. DOI 10.1101/gr.229102.
- Khatun M., Ray R., Ray R.B. Hepatitis C virus associated hepatocellular carcinoma. *Adv. Cancer Res.* 2021;149:103-142. DOI 10.1016/bs.acr.2020.10.003.
- Kuo C.C., Shih Y.L., Su H.Y., Yan M.D., Hsieh C.B., Liu C.Y., Huang W.T., Yu M.H., Lin Y.W. Methylation of *IRAK3* is a novel prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2015;21(13):3960-3969. DOI 10.3748/wjg.v21.i13.3960.
- Levrero M., Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 2016;64(1 Suppl.):S84-S101. DOI 10.1016/j.jhep.2016.02.021.
- Li X., Han M., Zhang H., Liu F., Pan Y., Zhu J., Liao Z., Chen X., Zhang B. Structures and biological functions of zinc finger proteins and their roles in hepatocellular carcinoma. *Biomark. Res.* 2022;10(1):2. DOI 10.1186/s40364-021-00345-1.
- Liao Y., Wang J., Jaehnig E.J., Shi Z., Zhang B. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:W199-W205. DOI 10.1093/nar/gkz401.
- Liu S., de Medeiros M.C., Fernandez E.M., Zarins K.R., Cavalcante R.G., Qin T., Wolf G.T., Figueroa M.E., D’Silva N.J., Rozek L.S., Sartor M.A. 5-Hydroxymethylation highlights the heterogeneity in keratinization and cell junctions in head and neck cancers. *Clin. Epigenetics.* 2020;12(1):175. DOI 10.1186/s13148-020-00965-8.
- Liu Z., Yan H., Zhang J. Blood DNA methylation markers in potentially identified Chinese patients with hepatocellular carcinoma. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2016;29(4 Suppl.):1451-1456.
- Lu F., Shah P.A., Rao A., Gifford-Hollingsworth C., Chen A., Trey G., Soryal M., Talat A., Aslam A., Nasir B., Choudhry S., Ishtiaq R., Sanoff H., Conteh L.F., Noonan A., Hu K.Q., Schmidt C., Fu M., Civan J., Xiao G., Lau D.T., Lu X. Liver cancer-specific serine protease inhibitor kazal is a potentially novel biomarker for the early detection of hepatocellular carcinoma. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 2020;11(12):e00271. DOI 10.14309/ctg.0000000000000271.

- Mah W.C., Thurnherr T., Chow P.K., Chung A.Y., Ooi L.L., Toh H.C., Teh B.T., Sauntharajah Y., Lee C.G. Methylation profiles reveal distinct subgroup of hepatocellular carcinoma patients with poor prognosis. *PLoS One*. 2014;9(8):e104158. DOI 10.1371/journal.pone.0104158.
- Meng C., Shen X., Jiang W. Potential biomarkers of HCC based on gene expression and DNA methylation profiles. *Oncol. Lett.* 2018; 16(3):3183-3192. DOI 10.3892/ol.2018.9020.
- Miller B.F., Petrykowska H.M., Elnitski L. Assessing *ZNF154* methylation in patient plasma as a multicancer marker in liquid biopsies from colon, liver, ovarian and pancreatic cancer patients. *Sci. Rep.* 2021;11(1):221. DOI 10.1038/s41598-020-80345-7.
- Molina-Sánchez P., Ruiz de Galarreta M., Yao M.A., Lindblad K.E., Bresnahan E., Bitterman E., Martin T.C., Rubenstein T., Nie K., Golas J., Choudhary S., Bárcena-Varela M., Elmas A., Miguela V., Ding Y., Kan Z., Grinspan L.T., Huang K.L., Parsons R.E., Shields D.J., Rollins R.A., Lujambio A. Cooperation between distinct cancer driver genes underlies intertumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2020;159(6):2203-2220.e14. DOI 10.1053/j.gastro.2020.08.015.
- Neumann O., Kesselmeier M., Geffers R., Pellegrino R., Radlwimmer B., Hoffmann K., Ehemann V., Schemmer P., Schirmacher P., Bermejo J.L., Longerich T. Methylome analysis and integrative profiling of human HCCs identify novel protumorigenic factors. *Hepatology*. 2012;56(5):1817-1827. DOI 10.1002/hep.25870.
- Peng W.T., Sun W.Y., Li X.R., Sun J.C., Du J.J., Wei W. Emerging roles of G protein-coupled receptors in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(5):1366. DOI 10.3390/ijms19051366.
- Petruzzello A., Marigliano S., Loquercio G., Cozzolino A., Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: an up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J. Gastroenterol.* 2016;22(34):7824-7840. DOI 10.3748/wjg.v22.i34.7824.
- Philips C.A., Rajesh S., Nair D.C., Ahamed R., Abdulkaleel J.K., Augustine P. Hepatocellular carcinoma in 2021: an exhaustive update. *Cureus*. 2021;13(11):e19274. DOI 10.7759/cureus.19274.
- Qiu G.H., Salto-Tellez M., Ross J.A., Yeo W., Cui Y., Wheelhouse N., Chen G.G., Harrison D., Lai P., Tao Q., Hooi S.C. The tumor suppressor gene *DLEC1* is frequently silenced by DNA methylation in hepatocellular carcinoma and induces G1 arrest in cell cycle. *J. Hepatol.* 2008;48(3):433-441. DOI 10.1016/j.jhep.2007.11.015.
- Revoll K., Wang T., Lachenmayer A., Kojima K., Harrington A., Li J., Hoshida Y., Llovet J.M., Powers S. Genome-wide methylation analysis and epigenetic unmasking identify tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2013;145(6):1424-1435.e25. DOI 10.1053/j.gastro.2013.08.055.
- Roehlen N., Crouch E., Baumert T.F. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives. *Cells*. 2020;9(4):875. DOI 10.3390/cells9040875.
- Schulze K., Imbeaud S., Letouzé E., Alexandrov L.B., Calderaro J., Rebouissou S., Couchy G., Meiller C., Shinde J., Soysouvanh F., Calatayud A.L., Pinyol R., Pelletier L., Balabaud C., Laurent A., Blanc J.F., Mazzaferro V., Calvo F., Villanueva A., Nault J.C., Bioulac-Sage P., Stratton M.R., Llovet J.M., Zucman-Rossi J. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat. Genet.* 2015;47(5):505-511. DOI 10.1038/ng.3252.
- Shen J., Wang S., Zhang Y.J., Kappil M., Wu H.C., Kibriya M.G., Wang Q., Jasmine F., Ahsan H., Lee P.H., Yu M.W., Chen C.J., Santella R.M. Genome-wide DNA methylation profiles in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2012;55(6):1799-1808. DOI 10.1002/hep.25569.
- Wang X., Xing Z., Xu H., Yang H., Xing T. Development and validation of epithelial mesenchymal transition-related prognostic model for hepatocellular carcinoma. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(10):13822-13845. DOI 10.18632/aging.202976.
- Wang Y., Ruan Z., Yu S., Tian T., Liang X., Jing L., Li W., Wang X., Xiang L., Claret F.X., Nan K., Guo H. A four-methylated mRNA signature-based risk score system predicts survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(1):160-173. DOI 10.18632/aging.101738.
- Wei P., Tang H., Li D. Insights into pancreatic cancer etiology from pathway analysis of genome-wide association study data. *PLoS One*. 2012;7(10):e46887. DOI 10.1371/journal.pone.0046887.
- Yamada N., Yasui K., Dohi O., Gen Y., Tomie A., Kitaichi T., Iwai N., Mitsuyoshi H., Sumida Y., Moriguchi M., Yamaguchi K., Nishikawa T., Umemura A., Naito Y., Tanaka S., Arai S., Itoh Y. Genome-wide DNA methylation analysis in hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* 2016;35(4):2228-2236. DOI 10.3892/or.2016.4619.
- Yan P., Pang P., Hu X., Wang A., Zhang H., Ma Y., Zhang K., Ye Y., Zhou B., Mao J. Specific miRNAs in naïve T cells associated with hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *J. Cancer*. 2021;12(1):1-9. DOI 10.7150/jca.49594.
- Zhang C., Huang C., Sui X., Zhong X., Yang W., Hu X., Li Y. Association between gene methylation and HBV infection in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J. Cancer*. 2019;10(25):6457-6465. DOI 10.7150/jca.33005.
- Zhang C., Zhang W., Yuan Z., Yang W., Hu X., Duan S., Wei Q. Contribution of DNA methylation to the risk of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Pathol. Res. Pract.* 2022;238:154136. DOI 10.1016/j.prp.2022.154136.
- Zhao P., Malik S., Xing S. Epigenetic mechanisms involved in HCV-induced hepatocellular carcinoma (HCC). *Front. Oncol.* 2021;11:677926. DOI 10.3389/fonc.2021.677926.
- Zhou Y., Zhou B., Pache L., Chang M., Khodabakhshi A.H., Tanaseichuk O., Benner C., Chanda S.K. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat. Commun.* 2019;10:1523. DOI 10.1038/s41467-019-09234-6.

ORCID ID

I.A. Goncharova orcid.org/0000-0002-9527-7015
A.A. Zarubin orcid.org/0000-0001-6568-6339
N.P. Babushkina orcid.org/0000-0001-6133-8986
I.A. Koroleva orcid.org/0000-0003-1498-6934
M.S. Nazarenko orcid.org/0000-0002-0673-4094

Благодарности. Работа выполнена при финансировании госзадания Министерства науки и высшего образования, № 122020300041-7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.10.2022. После доработки 08.12.2022. Принята к публикации 15.12.2022.