

О.О. Фільченков,
М.П. Завелевич

Інститут експериментальної
патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України

Ключові слова: злоякісні
новоутворення, молочна
залоза, молекулярні підтипи,
виживаність хворих, CD147,
CD200, дослідження *in silico*,
лінії пухлинних клітин людини,
проточна цитометрія.

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2025.01.051>

ЕКСПРЕСІЯ CD147 ТА CD200 В КЛІТИНАХ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ: БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ *IN VITRO*

Рак молочної залози (PMЗ) є надзвичайно гетерогенним захворюванням із різноманітними морфологічними варіантами та молекулярними підтипами, з різними клінічними проявами, специфічними фенотиповими властивостями, відмінностями у відповіді на лікувальні заходи. В останні роки значну увагу приділяють білкам цитоплазматичної мембрани, які забезпечують комунікацію між пухлинними клітинами та компонентами їх мікрооточення. **Мета:** дослідження *in silico* та *in vitro* особливостей експресії CD147 та CD200 у клітинах PMЗ різних молекулярних підтипів. **Об'єкт і методи:** порівняння показників експресії або коекспресії генів BSG, CD200 у нормальній та пухлинній тканині молочної залози, а також прогностичного значення зазначених генів проводили за допомогою ресурсів UALCAN, GEPIA, TIMER2.0 та KM-Plotter. Ресурс GEPIA також використовувався для ідентифікації 20 генів, зміни рівня експресії яких в клітинах PMЗ найбільше збігаються зі змінами експресії генів BSG або CD200. Для вивчення білок-білкових взаємодій (ББВ) CD147 або CD200 були побудовані відповідні мережі за допомогою онлайн-ресурсу STRING v.12. Зв'язок між експресією генів BSG, CD200 та їх участю у ключових внутрішньоклітинних процесах у клітинах PMЗ аналізували на базі онлайн-ресурсу GSCA. Експресію антигенів CD147 та CD200 визначали в клітинах ліній MDA-MB-231, MCF-7 та T-47D PMЗ людини методом прямої імуофлуоресценції за допомогою проточної цитометрії. **Результати:** біоінформатичний аналіз показав, що рівень експресії мРНК BSG у тканині PMЗ, в тому числі й PMЗ кожного з молекулярних підтипів, достовірно збільшений, а рівень експресії мРНК CD200 достовірно зменшений у порівнянні із нормальною тканиною молочної залози. Крім того, переважна більшість генів, коекспресованих з BSG у тканині PMЗ, локалізовані на короткому плечі 19-ї хромосоми, де розташований ген BSG. Проте жоден із білків, які кодуються зазначеними генами, не входить до мережі ББВ CD147. Загальна виживаність при PMЗ люмінального А або Б підтипів була достовірно менш тривалою в групі хворих з експресією BSG в пухлинах, яка перевищувала її медіанний рівень. Для гена CD200 така залежність була зворотною. Більшість клітин досліджуваних ліній PMЗ є CD147-позитивними. На відміну від CD147, лише незначна кількість клітин цих ліній експресує на своїй поверхні антиген CD200. **Висновки:** встановлено різноспрямовану асоціацію між експресією антигенів CD147 та CD200 та показниками виживаності хворих на PMЗ, а також протилежні зміни експресії цих антигенів в злоякісних клітинах.

Прогрес сучасної онкології неможливо уявити без накопичення та упорядкування численних даних, отриманих при дослідженні зразків пухлинних та відповідних нормальних клітин *in vivo*, *ex vivo* та *in vitro*. Доступні бази даних, які охоплюють сотні тисяч зразків, охарактеризованих на рівні експресії генів, білків, мікроРНК, довгих некодуючих РНК, метилювання промоторних ділянок генів, метаболітів тощо у пухлинній тканині

різних типів злоякісних новоутворень. Наявність такого масиву структурованої й неструктурованої біомедичної інформації дозволяє, серед іншого, не тільки простежити зв'язок між певними профілями експресії та біологічними особливостями пухлин, але й ідентифікувати нові маркерні ознаки з диференційною експресією в пухлинах різних фенотипів, які можуть бути використані для раннього виявлення новоутворень, прогнозу перебігу

захворювання та пошуку мішеней для майбутньої таргетної терапії.

Рак молочної залози (РМЗ) є надзвичайно гетерогенним захворюванням із різноманітними морфологічними варіантами, молекулярно-генетичними підтипами, які характеризуються різними клінічними проявами, специфічними молекулярними та фенотиповими властивостями, неоднаковою відповіддю на лікувальні заходи [1]. Виділення чотирьох молекулярних підтипів РМЗ (люмінальний А, люмінальний В, HER-2-позитивний та базальний або тричі негативний) знайшло широке застосування у клінічній практиці. Проте результати багаторічних досліджень вказують на те, що розподіл хворих за молекулярними підтипами не може повністю розв'язати проблему гетерогенності РМЖ. Є сподівання, що суттєвим кроком до покращення результатів лікування хворих на РМЗ може стати поглиблення знань про молекулярні механізми виникнення та розвитку цього новоутворення, включаючи роль компонентів мікрооточення пухлини.

В останні роки значну увагу дослідники приділяють білкам цитоплазматичної мембрани, які забезпечують комунікацію між пухлинними клітинами та компонентами їх мікрооточення. До таких білків, зокрема, належать CD147 та CD200.

CD147 (OMIM: 109480; також відомий як базигін, EMMPRIN або HAb18G) є багатофункціональним трансмембранним глікопротеїном, який належить до надродини імуноглобулінів [2]. Кодується геном *BSG* (ID гена: 682), що розміщений у людей на короткому плечі 19-ї хромосоми. CD147 бере участь у багатьох клітинних процесах завдяки його взаємодії з різноманітними білками-партнерами [3], що приводить до активації в клітинах різних сигнальних шляхів, включаючи ті, які залучені до злоякісної трансформації клітин. Наприклад, зв'язування циклофіліну А з базигіном може прямо чи опосередковано активувати такі онкогенні сигнальні шляхи, як PI3K/AKT, Wnt/ β -катенін, MAPK, STAT3, Notch та NF- κ B [4].

Надмірна експресія CD147 відзначається у клітинах багатьох солідних пухлин, включаючи РМЗ [5]. Пригнічення активності гена *BSG* в пухлинних клітинах за допомогою технології РНК-інтерференції приводить, як правило, до пригнічення проліферації та зниження туморогенних властивостей клітин. Наприклад, сайленсинг гена *BSG* пригнічує проліферацію клітин РМЗ *in vitro* та їх інвазивну здатність, викликає зупинку їх клітинного циклу у фазі G_0/G_1 та уповільнення росту пухлин в ксеногенних системах *in vivo* [6]. Високі рівні експресії CD147 в пухлинних клітинах індують продукцію матриксних металопротеїназ як пухлинними клітинами, так й фібробластами, що приводить до деградації позаклітинного матриксу, тим самим сприяючи реалізації інвазивної актив-

ності пухлинних клітин. CD147 є також проангіогенним фактором [7] та важливим регулятором епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП) [8], який пов'язаний з дисемінацією пухлинних клітин та їх метастазуванням. Крім того, в результаті ЕМП пухлинні клітини можуть набувати ознак, характерних для стовбурових пухлинних клітин, ставати стійкими до протипухлинної терапії та вислизати з-під нагляду імунної системи.

Як й CD147, антиген CD200 (OMIM: 155970; також відомий як OX2) належить до надродини імуноглобулінів, являє собою трансмембранний глікопротеїн I типу, який має структуру дуже схожу з CD147 [9]. Кодується геном *CD200* (ID гена: 4345), що розміщений у людей на довгому плечі 3-ї хромосоми. CD200 належить до групи так званих молекул імунних контрольних точок, яка включає PD-1, LAG-3 та CTLA-4. Вважається, що блокада молекул цієї групи пригнічує імуносупресивну дію Т-лімфоцитів. CD200 експресується на тимоцитах, Т- та В-лімфоцитах, субпопуляції CD34⁺-клітин, дендритних та ендотеліальних клітинах, нейронах. Експресія CD200 відсутня на природних клітинах-кілерах, моноцитах, гранулоцитах, тромбоцитах. Підвищення експресії CD200 відзначається при солідних пухлинах та онкогематологічних новоутвореннях [10]. CD200 зв'язується зі своїм спорідненим рецептором CD200R і за допомогою сигнального шляху CD200/CD200R реалізує імуносупресивну дію через інгібування активації природних клітин-кілерів, функції цитотоксичних Т-клітин, активності M1-поляризованих макрофагів, а також сприяючи експансії регуляторних Т-лімфоцитів. Зокрема, зв'язування CD200 з його рецептором викликає зниження продукції цитокінів Th1-лімфоцитами (IL-2, інтерферон- γ), що підвищує секрецію IL-10, IL-4 Th2-лімфоцитами, сприяє диференціюванню Т-лімфоцитів у Treg (CD4⁺, CD25⁺, FOXP3⁺). Крім того, CD200R експресується на інших клітинах мікрооточення пухлини, включаючи пухлиноасоційовані макрофаги, супресорні клітини мієлоїдного походження та пухлиноасоційовані дендритні клітини. Експресія CD200 та CD200R також пов'язана з регуляцією ЕМП та віддаленим метастазуванням, що додатково ілюструє роль цього глікопротеїну у прогресії пухлинного росту [11, 12]. Інформація про експресію CD200 в клітинах клінічних зразків РМЗ обмежена лише наявними базами даних, а відомості про експресію CD200 в клітинах ліній РМЗ *in vitro* є поодинокими та суперечливими.

Мета роботи — дослідження *in silico* та *in vitro* особливостей експресії CD147 та CD200 у клітинах РМЗ як фенотипових ознак, що можуть мати значення для додаткової характеристики біологічних властивостей РМЗ різних молекулярних підтипів.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Порівняння показників експресії CD147 та CD200 у нормальній та пухлинній тканині молочної залози людини проводили за допомогою ресурсу UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu>) [13]. Коекспресію генів *BSG* та *CD200* у нормальній та пухлинній тканині молочної залози людини аналізували за допомогою онлайн-ресурсу GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn>) [14]. Ресурс GEPIA також використовувався для ідентифікації 20 генів, зміни рівня експресії яких в клітинах PM3 найбільше збігаються зі змінами експресії генів *BSG* або *CD200*. Зв'язок між експресією генів *BSG*, *CD200* та їх участю у ключових внутрішньоклітинних процесах у клітинах PM3 аналізували на базі онлайн-ресурсу GSCA (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/web/GSCALite>) [15]. Асоціацію між експресією генів *BSG*, *CD200* та показниками виживаності хворих на PM3 оцінювали на основі платформи KM-plotter (<https://kmplot.com>) [16] та онлайн-ресурсу TIMER2.0 (<http://timer.comp-genomics.org>) [17]. Значення p менше ніж 0,05 вважалися статистично значущими. Для створення мереж прямих (фізичних) та непрямих (функціональних) білок-білкових взаємодій CD147 або CD200 використовували онлайн-ресурс STRING v.12 (<https://string-db.org>) [18] із заданим показником достовірності взаємодії більше за 0,7.

Експресію антигенів CD147 та CD200 визначали в клітинах ліній MDA-MB-231, MCF-7 та T-47D PM3 людини, які були отримані з клітинного банку ліній з тканин людини і тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України. Відсоток клітин, позитивних за експресією антигенів CD147 та CD200 на плазматичних мембранах досліджуваних клітин, визначали методом прямої імуофлуоресценції на проточному цитометрі FACScan (Becton Dickinson, США) за загальноприйнятою методикою. Використовували моноклональні антитіла (МкАт) проти CD147 людини, мічені флуоресцеїном 5-ізотіоціанатом (BD Pharmingen, США; кат. № 555962) або МкАт проти CD200 людини, мічені фікоеритрином (BD Pharmingen, США; кат. № 552475). Кількість клітин, позитивних або негативних за експресією антигену, вираховували щонайменше для 10 тис. зареєстрованих подій, використовуючи програму CELLQuest (BD Bioscience, США). Як негативний контроль визначали автофлуоресценцію клітин без внесення МкАт.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз *in silico* показав, що згідно з базою даних UALCAN рівень експресії мРНК *CD147* у тканині PM3, в тому числі й в тканині PM3 кожного

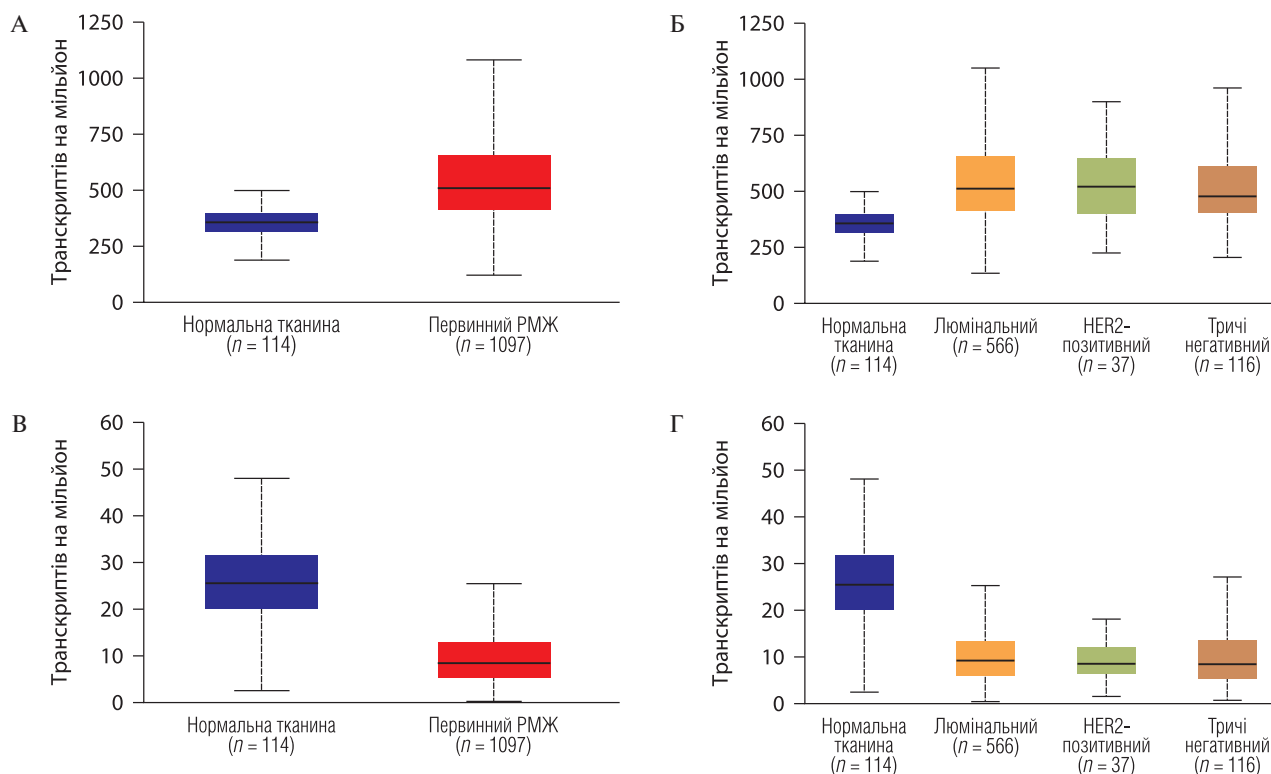


Рис. 1. Експресія генів *BSG* (А, Б) та *CD200* (В, Г) у зразках нормальної та пухлинної тканини молочної залози людини, зібраних в рамках проекту “Атлас ракового геному” (The Cancer Genome Atlas, TCGA), проаналізована залежно від молекулярного підтипу PM3 за допомогою онлайн-ресурсу UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu>). $p < 0,001$ для всіх молекулярних підтипів PM3 порівняно з показниками для нормальної тканини

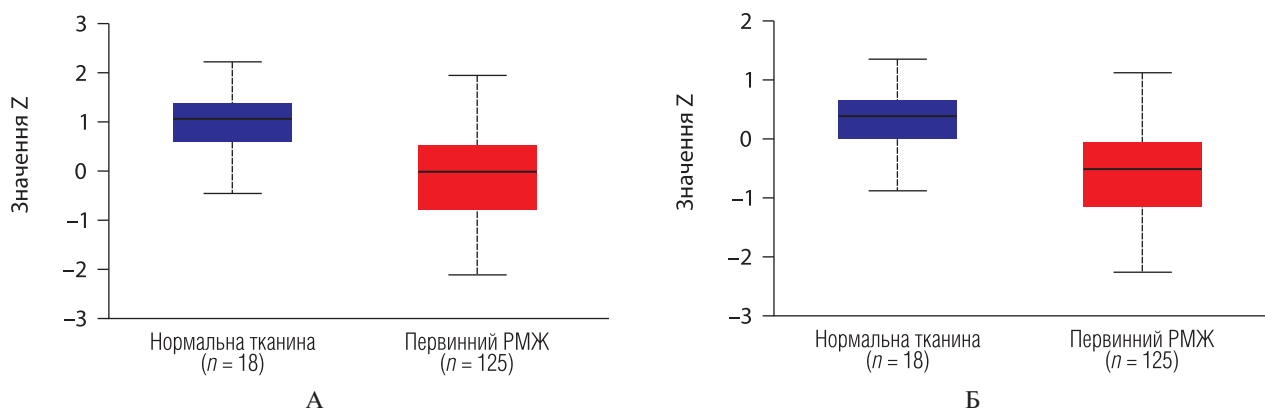


Рис. 2. Експресія білків CD147 (А) та CD200 (Б) у зразках нормальної та пухлинної тканини молочної залози людини, зібраних в рамках проекту «Клінічний консорціум з аналізу протеому пухлин» (Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium, CPTAC), проаналізована за допомогою онлайн-ресурсу UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu>). $p < 0,001$ порівняно з показниками для нормальної тканини

з молекулярних підтипів, достовірно збільшений, а мРНК *CD200* — зменшений у порівнянні із нормальною тканиною молочної залози (рис. 1). Натомість згідно з тим же ресурсом UALCAN, рівень експресії білка CD147 у тканині РМЗ виявився достовірно зменшеним у порівнянні із нормальною тканиною молочної залози, а рівень експресії білка CD200 у тканині РМЗ був приблизно на такому ж рівні, як й у нормальній тканині молочної залози (рис. 2). Однією з причин такої невідповідності може бути розбіжність між рівнями експресії певних генів на рівні білка та РНК. До речі, у доступній літературі ми не знайшли жодного повідомлення щодо зменшення рівня експресії CD147 у тканині РМЗ. Навпаки, автори з різних клінічних лабораторій фіксували збільшення (порівняно із нормальною тканиною молочної залози) рівня експресії CD147 у пухлинній тканині від 51,8% до

82,5% випадків хворих на РМЗ за різними джерелами [19–24]. Варто зазначити, що на противагу РМЗ, повідомлялося про достовірне підвищення рівня експресії CD200 в пухлинних тканинах хворих на меланому [25], плоскоклітинний рак шкіри [26], рак прямої кишки [27] або уротеліальний рак сечового міхура [28] порівняно з відповідними нормальними тканинами.

Як видно з даних, наведених на рис. 3, у пухлинних клітинах хворих на РМЗ існує обернена кореляція між експресією генів *BSG* та *CD200*. Такий висновок певним чином узгоджується з результатами, які були представлені на рис. 1. Проте важливо відзначити, що слабка обернена кореляція між експресією генів *BSG* та *CD200* також показана й для клітин нормальної тканини молочної залози, для яких значення коефіцієнта r навіть перевищує таке в пухлинних клітинах РМЗ ($-0,42$ проти $-0,28$).

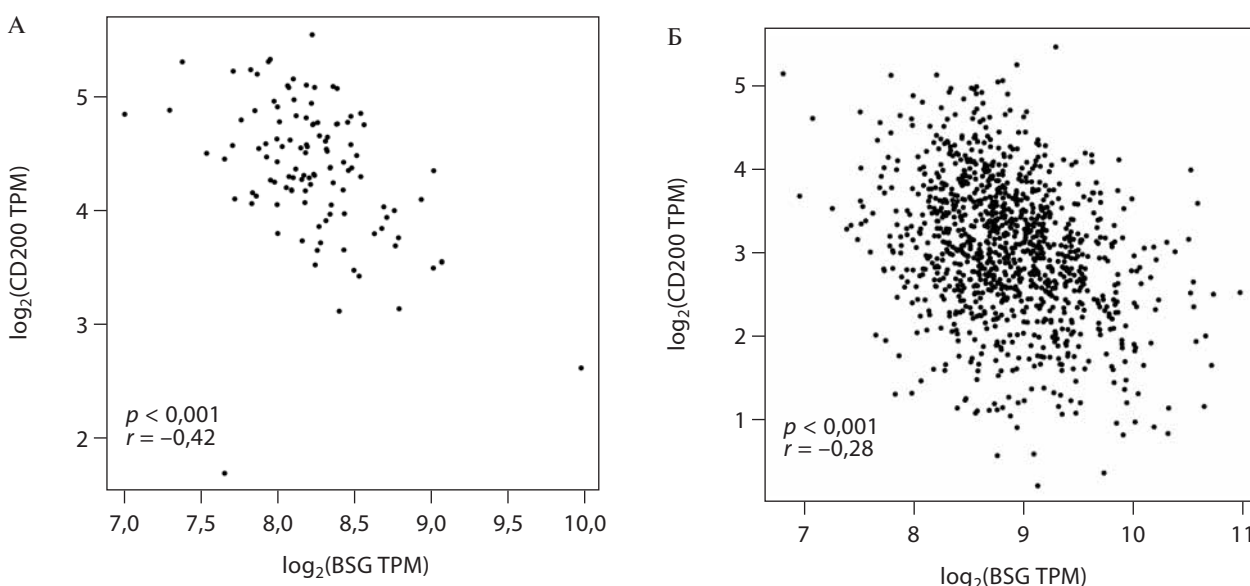


Рис. 3. Кореляція між експресією генів *BSG* та *CD200* у нормальній (А) та пухлинній тканині молочної залози людини (Б) за даними онлайн-ресурсу GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn>). TPM — транскриптів на мільйон

З метою ідентифікації генів, зміни рівня експресії яких в клітинах PM3 збігаються зі змінами експресії генів *BSG* або *CD200* в порівнянні з нормальною тканиною молочної залози, був проведений біоінформатичний аналіз з використанням онлайн-платформи GEPIA. Перелік 40 генів, експресія яких найчастіше підвищується в клітинах зразків PM3 у випадках високих рівнів експресії генів *BSG* або *CD200*, представлено у табл. 1. Слід зазначити, що 17 з 20 генів, зміна експресії яких найбільш тісно пов'язана з експресією *BSG*, виявилися розташованими на короткому плечі 19-ї хромосоми, де знаходиться й ген *BSG*. На відміну від цього, жоден з 20 генів, експресія яких змінюється одночасно зі змінами експресії гена *CD200* в клітинах PM3, не був локалізований поблизу локусу 3q13.2, на якому власне міститься ген *CD200*. Цікаво, що в одному з досліджень генів, найбільш тісно пов'язаних з експресією *BSG* в клітинах зразків плоскоклітинного раку голови та шиї, 19 з 20 коекспресованих генів (три з яких увійшли до нашого переліку) теж мали локалізацію 19p13.3, хоча автори дослідження не звернули на цей факт уваги [29].

Задля перевірки припущення, що коекспресія з *BSG* генів, які мають локалізацію 19p13.3, може поширюватися на інші (окрім PM3) типи солідних пухлин людини, був проведений біоінформатичний аналіз з використанням онлайн-платформи TIMER2.0. Для аналізу були обрані гени *CDC34*,

GZMM, *HCN2*, *POLRMT* та *FGF22*, які знаходяться у безпосередньої близькості до гена *BSG* [30]. Як можна побачити на рис. 4, достовірна коекспресія зазначених генів з геном *BSG* найчастіше реєструється у випадках генів *CDC34* та *POLRMT*: відповідно для 36 та 31 типів або підтипів солідних пухлин людини з 40 включених до аналізу. Отримані результати свідчать про те, що експресія принаймні деяких з генів (зокрема *CDC34* та *POLRMT*), які мають локалізацію 19p13.3, підвищується одночасно зі збільшенням експресії гена *BSG* не тільки у клітинах PM3, але й у клітинах багатьох інших солідних пухлин.

Для вивчення білок-білкових взаємодій (ББВ) CD147 або CD200 були побудовані відповідні мережі за допомогою онлайн-ресурсу STRING v.12. Аналіз мережі ББВ CD147 дозволив виявити чіткий набір з 20 білків, які з високою ймовірністю фізично або функціонально взаємодіють з CD147 (рис. 5, А), хоча жоден з них не кодується генами, локалізованими на 19-й хромосомі. З огляду на патогенез PM3 найбільшу увагу серед білків мережі ББВ CD147 привертають металопротеїназа MMP-1, CD44, LYVE-1, β_1 -інтегрин, монокарбоксилатні транспортери MCT-1/SLC16A1 та MCT-4/SLC16A3, які беруть безпосередню участь у шляхах або процесах, пов'язаних із пухлиною прогресією [3, 31, 32]. Аналіз мережі ББВ CD200 показав, що CD200 переважно взаємодіє з такими кластерами диференціації як CD272/BTLA, CD19, CD8

Таблиця 1

Перелік 20 генів, з найвищою позитивною кореляцією коекспресії з генами *BSG* або *CD200* в клітинах PM3 за даними онлайн-ресурсу GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn>)

Ген	ID гена	Локалізація гена	Ген	ID гена	Локалізація гена
Коекспресія з геном <i>BSG</i>			Коекспресія з геном <i>CD200</i>		
<i>FAM174C</i>	55009	19p13.3	<i>RHOJ</i>	57381	14q23.2
<i>CDC34</i>	997	19p13.3	<i>ERG</i>	2078	21q22.2
<i>ATP5F1D</i>	513	19p13.3	<i>MYCT1</i>	80177	6q25.2
<i>BSCL2</i>	26580	11q12.3	<i>ADGRL4</i>	64123	1p31.1
<i>UQCR11</i>	10975	19p13.3	<i>CD93</i>	22918	20p11.21
<i>GPX4</i>	2879	19p13.3	<i>FLI1</i>	2313	11q24.3
<i>FKBP2</i>	2286	11q13.1	<i>LHFPL6</i>	10186	13q13.3–q14.11
<i>RNF126</i>	55658	19p13.3	<i>LDB2</i>	9079	4p15.32
<i>POLRMT</i>	5442	19p13.3	<i>ELK3</i>	2004	12q23.1
<i>NCLN</i>	56926	19p13.3	<i>JAM2</i>	58494	21q21.3
<i>MED16</i>	10025	19p13.3	<i>TEK</i>	7010	9p21.2
<i>COPE</i>	11316	19p13.11	<i>CDH5</i>	1003	16q21
<i>NDUFS7</i>	374291	19p13.3	<i>KCTD12</i>	115207	13q22.3
<i>SERF2</i>	10169	15q15.3	<i>COL15A1</i>	1306	9q22.33
<i>POLR2E</i>	5434	19p13.3	<i>FOXO1</i>	2308	13q14.11
<i>MYDGF</i>	56005	19p13.3	<i>RBMS3</i>	27303	3p24.1
<i>SGTA</i>	6449	19p13.3	<i>LBH</i>	81606	2p23.1
<i>TIMM13</i>	26517	19p13.3	<i>HEG1</i>	57493	3q21.2
<i>OAZ1</i>	4946	19p13.3	<i>CNRIP1</i>	25927	2p14
<i>MAP2K2</i>	5605	19p13.3	<i>ADGRF5</i>	221395	6p12.3



Рис. 4. Аналіз коекспресії генів *CDC34*, *GZMM*, *HCN2*, *POLRMT* та *FGF22* з геном *BSG* у пухлинах людини різного гістогенезу та локалізації за даними онлайн-ресурсу TIMER2.0 (<http://timer.comp-genomics.org>)

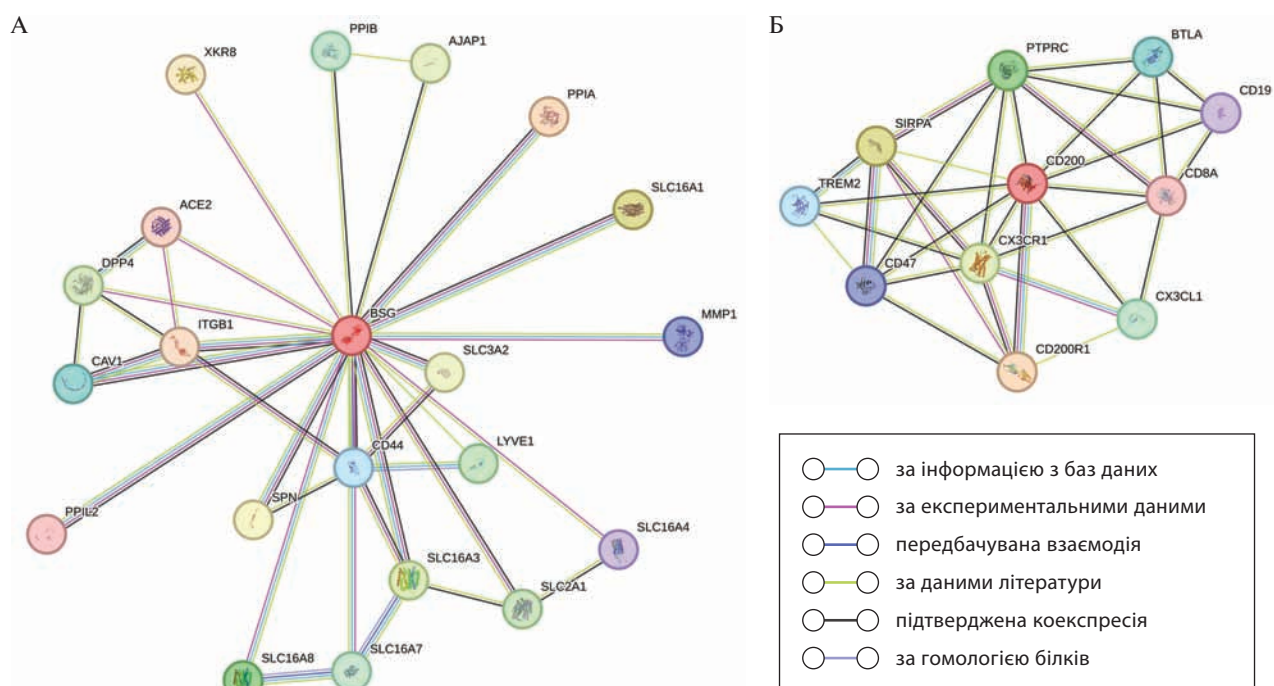


Рис. 5. Визначення ключових білок-білкових взаємодій у мережах CD147 (А) та CD200 (Б) за даними онлайн-платформи STRING v12 (<https://string-db.org>). Кольорові лінії відповідають різним типам доведеності взаємодій

(α -субодиниця), CD200R1, CD172a/SIRPA, CD47 та CD45/PTPRC (рис. 5, Б).

Результати аналізу зв'язку між експресією білків, залучених до тих чи інших ключових процесів/внутрішньоклітинних сигнальних шляхів та експресією генів *BSG* або *CD200*, у пухлинних клітинах хворих на РМЗ наведені у табл. 2. Експресія *BSG* на відміну від *CD200* не пов'язана з багатьма процесами або регуляторними сигнальними шляхами, проаналізованими в онлайн-ресурсі GSCA. Що стосується *CD200*, то його експресія асоційована з такими процесами як ЕМП клітин РМЗ, регуляція клітинного циклу та репарація пошкоджень ДНК, а також змінами гормональ-

ного рецепторного статусу. Важливо зазначити різноспрямованість зв'язків експресії генів *BSG* та *CD200* з активацією апоптозу та RAS/MAPK-залежного сигнального шляху, який залучений, серед іншого, до ініціації апоптотичної загибелі клітин [33].

Асоціацію між експресією генів *BSG*, *CD200* та показниками загальної виживаності (ЗВ) та безрецидивної виживаності (БВ) хворих на РМЗ оцінювали за допомогою біоінформатичного аналізу на базі платформи KM-plotter. Згідно з отриманими результатами, хворі на РМЗ люмінального А або Б підтипів мали гіршу ЗВ, але не БВ, у випадках з експресією гена *BSG* вище медіани порівняно

Таблиця 2

Процеси або внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, асоційовані з експресією генів *BSG* та *CD200*, у пухлинних клітинах хворих на РМЗ за даними онлайн-ресурсу GSCA (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/web/GSCALite>)

Процеси/шляхи	<i>BSG</i>	<i>CD200</i>
Апоптоз	Інгібування	Активация
Клітинний цикл	Зв'язок відсутній	Інгібування
Пошкодження ДНК	Зв'язок відсутній	Інгібування
ЕМП	Зв'язок відсутній	Активация
Рецептор андрогену	Зв'язок відсутній	Інгібування
Рецептор естрогену	Зв'язок відсутній	Інгібування
PI3K/AKT	Зв'язок відсутній	Зв'язок відсутній
RAS/MAPK	Інгібування	Активация
Рецепторні тирозинкінази	Інгібування	Зв'язок відсутній
TSC/mTOR	Зв'язок відсутній	Інгібування

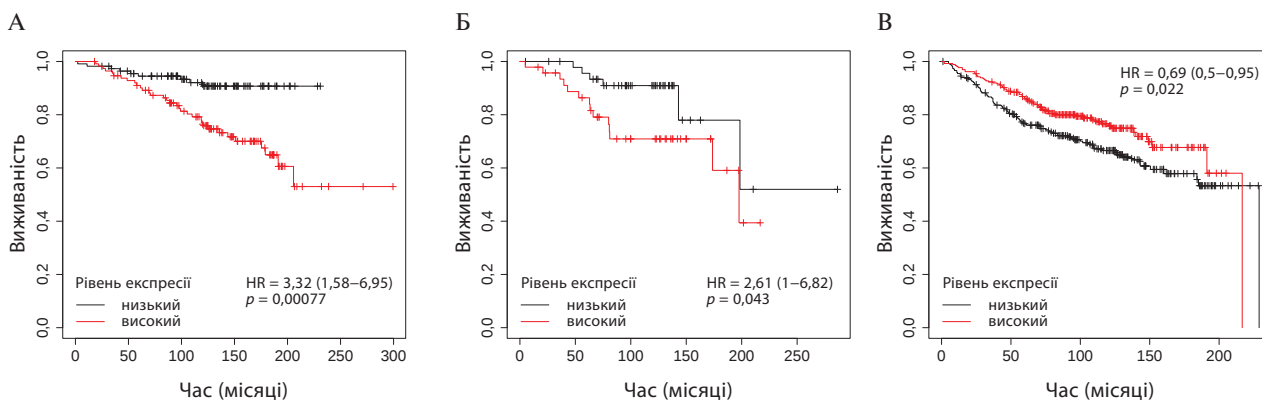


Рис. 6. Аналіз показників виживаності хворих на РМЗ залежно від експресії гена *BSG* (А, Б) або *CD200* (В) за даними платформи KM-plotter (<https://kmplot.com>): А — люмінальний А підтип ($n = 225$), загальна виживаність; Б — люмінальний Б підтип ($n = 95$), загальна виживаність; В — люмінальний А підтип ($n = 527$), безрецидивна виживаність. HR — відношення ризиків

з експресією зазначеного гена нижче за медіану (рис. 6, А, Б). Поряд з цим, достовірної різниці у показниках ЗВ та БВ у випадках низької або високої експресії *BSG* серед хворих на РМЗ інших підтипів не виявлено. Статистично значущі відмінності між показниками БВ хворих на РМЗ та рівнем експресії гена *CD200* були характерні лише для вибірки люмінального А підтипу (рис. 6, В), тоді як зміни показників ЗВ залежно від рівня експресії *CD200* при всіх інших молекулярних підтипах РМЗ не були статистично значущими. На відміну від гена *BSG*, асоціація між експресією гена *CD200* та виживаністю хворих на РМЗ була зворотною.

За інформацією, отриманою при використанні іншого онлайн-ресурсу — TIMER2.0, яка до речі відрізнялась від такої за даними платформи KM-plotter, хворі на РМЗ базального або люмінального Б підтипів мали гірші показники ЗВ у випадках підвищеної експресії гена *BSG*, а значущої залежності між експресією гена *CD200* та ЗВ не було виявлено (табл. 3).

Експресію CD147 та CD200 *in vitro* визначали методом проточної цитометрії в клітинах лінії

Таблиця 3

Асоціація між експресією генів *BSG* та *CD200* і загальною виживаністю хворих на РМЗ (за даними онлайн-ресурсу TIMER2.0; <http://timer.comp-genomics.org>)

Підтип РМЗ	Значення Z	
	<i>BSG</i>	<i>CD200</i>
Всі випадки ($n = 1100$)	1,921	-0,233
Базальний ($n = 191$)	2,05*	-0,534
HER-2-позитивний ($n = 82$)	-0,204	-0,857
Люмінальний А ($n = 568$)	-0,136	1,123
Люмінальний Б ($n = 219$)	2,173*	-0,403

* Підвищення ризику статистично значуще ($p < 0,05$).

MDA-MB-231, що походить з тричі-негативного інвазивного РМЗ базального підтипу, та клітинах ліній MCF-7 та T-47D, що походять з РМЗ люмінального А підтипу. На рис. 7 представлено репрезентативні гістограми розподілу флуоресценції клітин ліній MDA-MB-231, MCF-7 та T-47D, проінкубованих з анти-CD147 МкАт. Встановлено, що більшість клітин досліджуваних ліній РМЗ реагує з МкАт проти CD147. Найбільша кількість CD147-позитивних клітин була в лінії MDA-MB-231 (92%), найменшою в лінії T-47D (56%). Отримані нами дані узгоджуються з результатами, які були нещодавно представлені Y. Meng та співав. [34]. Автори досліджували можливу асоціацію між рівнем експресії CD147 у клітинах РМЗ людини та їх стійкістю до апоптозу (тип апоптотичної загибелі клітин внаслідок їх відокремлення від адгезивного субстрату [35]). Показано, що типовою ознакою резистентних до апоптозу клітин лінії MDA-MB-231 є вищий рівень експресії CD147 порівняно з апоптоз-чутливими клітинами ліній T-47D та MCF-7 [34].

Хоча клітини ліній MCF-7 та T-47D відносяться до одного й того ж молекулярного підтипу РМЗ, вони відрізняються за вмістом CD147-позитивної популяції клітин (див. рис. 7). Разом з тим, рівень експресії CD147 в клітинах пухлин істотно впливає на показник ЗВ, принаймні для випадків найбільш поширеного люмінального А підтипу РМЗ (див. рис. 6).

На противагу CD147, лише незначна кількість клітин ліній MDA-MB-231, MCF-7 та T-47D (від 0,2 до 2,0%) реагує з МкАТ проти CD200. Типові гістограми розподілу флуоресценції клітин зазначених ліній, проінкубованих з анти-CD200 МкАТ, зображені на рис. 7. Серед доступної літератури нам вдалося розшукати лише 3 джерела, автори яких досліджували вміст CD200-позитивних клітин ліній MDA-MB-231 та MCF-7 [25, 36, 37]. У роботах [25, 36] методом проточної цитометрії

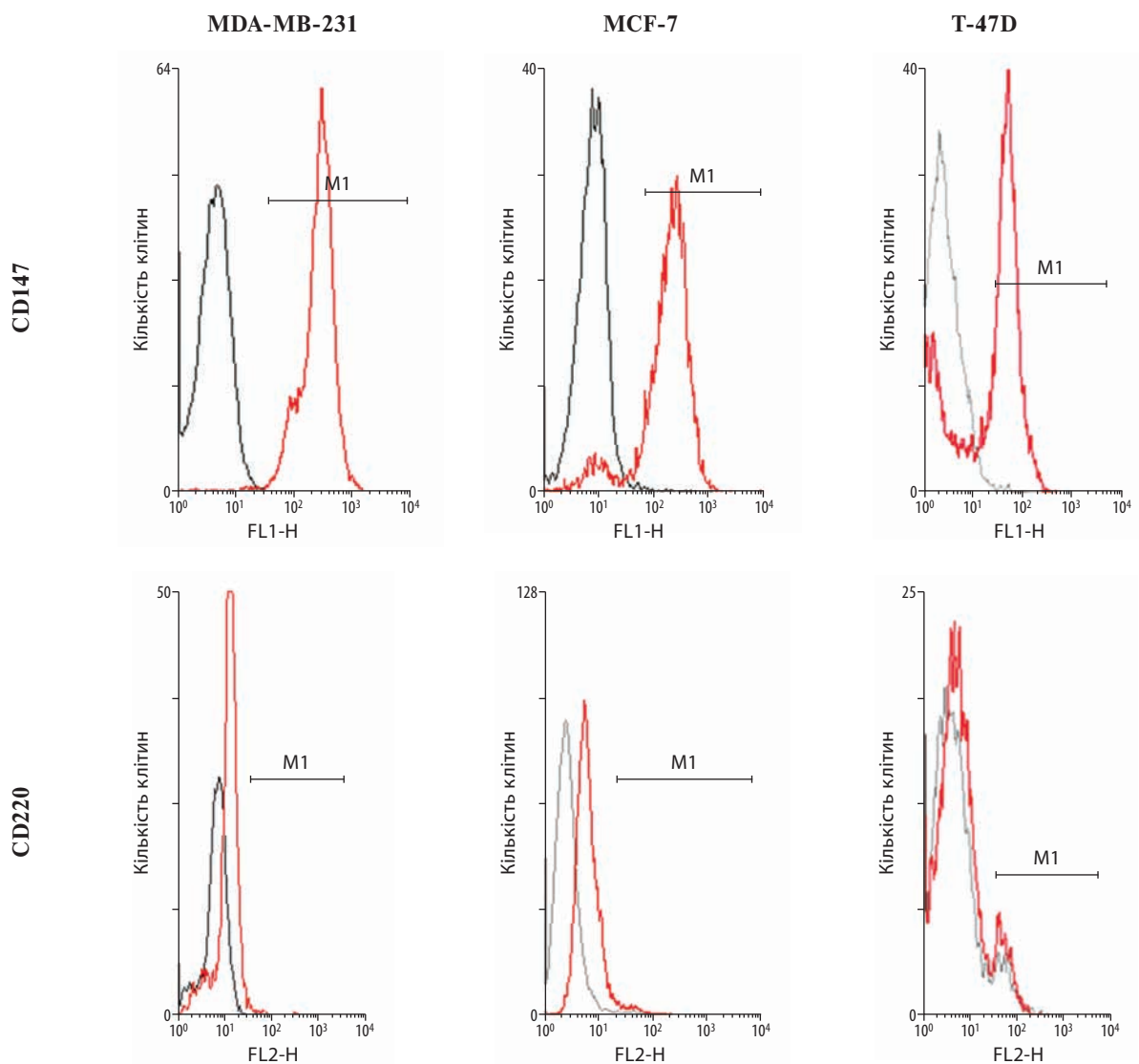


Рис. 7. Репрезентативні гістограми розподілу флуоресценції CD147- та CD200-позитивних клітин PM3 ліній MDA-MB-231, MCF-7 та T-47D за даними проточної цитометрії: чорним кольором позначені контрольні зразки клітин (без додавання МкАт), червоним — зразки клітин після додавання МкАт

експресії CD200 не було зареєстровано. Проте F. Лессіа зі співавт., використовуючи ті ж самі МкАт, що й в нашому дослідженні, встановили, що відповідно 24,5 та 4,4% клітин ліній MDA-MB-231 та MCF-7 реагують з МкАт проти CD200 [37].

Підсумовуючи отримані нами результати, варто зазначити, що як дослідження *in silico* експресії генів *BSG* та *CD200* в клітинах пухлинної тканини хворих на РМЗ різних молекулярних підтипів, так й аналіз особливостей *in vitro* експресії CD147 та CD200 у клітинах РМЗ тричі-негативного/базального або люмінального А підтипів свідчать про надмірну експресію *BSG*/CD147 та відсутність (або надзвичайно низький) рівень експресії *CD200*/CD200 в пухлинних клітинах незалежно від молекулярного підтипу РМЗ. Поєднання методів біоінформатичного аналізу з безпосереднім визначенням експресії досліджуваних антигенів може бути

важливим підходом для з'ясування біологічних особливостей клітин РМЗ різних молекулярних підтипів та можливих мішеней дії нових протипухлинних засобів.

ВИСНОВКИ

1. На основі біоінформатичного аналізу встановлено, що в пухлинних клітинах РМЗ рівень експресії гена *BSG* збільшується, а гена *CD200* зменшується у порівнянні з клітинами нормальної тканини молочної залози незалежно від молекулярного підтипу пухлини.

2. Як у клітинах РМЗ, так й у нормальних клітинах молочної залози існує обернена кореляція між експресією генів *BSG* та *CD200*.

3. Переважна більшість генів, експресія яких у пухлинних клітинах РМЗ значно корелює з експресією *BSG*, мають хромосомну локалізацію, по-

дібну до гена *BSG*; проте жоден із білків, які кодуються зазначеними генами, не входить до мережі ББВ CD147.

4. Встановлено обернену асоціацію між експресією гена *BSG* та показником ЗВ у хворих на РМЗ люмінального А або Б підтипів; для пацієнток з люмінальним А підтипом РМЗ характерна пряма асоціація між експресією гена *CD200* та показником БВ хворих.

5. Методом проточної цитометрії показано наявність певних тотожностей щодо експресії CD147 та CD200 в клітинах трьох постійних ліній РМЗ людини.

Робота виконувалася в рамках НДР “Гормонально-рецепторний статус клітин пухлинного мікрооточення як фактор модуляції онкогенезу в ендометрії та молочній залозі” (№ держреєстрації 0123U100100; керівник — д.б.н., проф. Л.Г. Бучинська).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Naleskina LA, Lukyanova NYu, Chekhun VF. Molecular-genetic bases of clinical heterogeneity of breast cancer (literature review). *Oncology (Kyiv)* 2017; **19** (3): 171–9 (in Ukrainian).
- Miyauchi T, Kanekura T, Yamaoka A, et al. Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the beta-chain of major histocompatibility complex class II antigen. *J Biochem* 1990; **107** (2): 316–23. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123045>.
- Muramatsu T. Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. *J Biochem* 2016; **159** (5): 481–90. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv127>.
- Han JM, Jung HJ. Cyclophilin A/CD147 interaction: A promising target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci* 2022; **23** (16): 9341. <https://doi.org/10.3390/ijms23169341>.
- Kong LM, Liao CG, Zhang Y, et al. A regulatory loop involving miR-22, Sp1, and c-Myc modulates CD147 expression in breast cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 2014; **74** (14): 3764–78. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3555>.
- Yang J, Wang R, Li H et al. Lentivirus mediated RNA interference of EMMPRIN (CD147) gene inhibits the proliferation, matrigel invasion and tumor formation of breast cancer cells. *Cancer Biomark* 2016; **17** (2): 237–47. <https://doi.org/10.3233/CBM-160636>.
- Amit-Cohen BC, Rahat MM, Rahat MA. Tumor cell-macrophage interactions increase angiogenesis through secretion of EMMPRIN. *Front Physiol* 2013; **4**: 178. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00178>.
- Li F, Wang J, Yan YQ, et al. CD147 promotes breast cancer migration and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition via the MAPK/ERK signaling pathway. *BMC Cancer* 2023; **23** (1): 1214. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-11724-2>.
- McCaughan GW, Clark MJ, Barclay AN. Characterization of the human homolog of the rat MRC OX-2 membrane glycoprotein. *Immunogenetics* 1987; **25** (5): 329–35. <https://doi.org/10.1007/BF00404426>.
- Nip C, Wang L, Liu C. CD200/CD200R: Bidirectional role in cancer progression and immunotherapy. *Biomedicines* 2023; **11** (12): 3326. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11123326>.
- Shin SP, Goh AR, Kang HG, et al. CD200 induces epithelial-to-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma via β -catenin-mediated nuclear translocation. *Cancers (Basel)*. 2019; **11** (10): 1583. <https://doi.org/10.3390/cancers11101583>.
- Khan IZ, Del Guzzo CA, Shao A, et al. The CD200-CD200R axis promotes squamous cell carcinoma metastasis via regulation of cathepsin K. *Cancer Res* 2021; **81** (19): 5021–32. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-3251>.
- Chandrasekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, et al. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia* 2022; **25**: 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.01.001>.
- Tang Z, Li C, Kang B, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res* 2017; **45** (W1): W98–W102. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx247>.
- Hänzelmann S, Castelo R, Guinney J. GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* 2013; **14**: 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-7>.
- Györfly B. Survival analysis across the entire transcriptome identifies biomarkers with the highest prognostic power in breast cancer. *Comput Struct Biotechnol J* 2021; **19**: 4101–9. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.07.014>.
- Li T, Fu J, Zeng Z, et al. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells. *Nucleic Acids Res* 2020; **48** (W1): W509–W514. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa407>.
- Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res* 2023; **51** (D1): D638–D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>.
- Li Y, Xu J, Chen L, et al. HAb18G (CD147), a cancer-associated biomarker and its role in cancer detection. *Histopathology* 2009; **54** (6): 677–87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2009.03280.x>.
- Liu F, Cui L, Zhang Y, et al. Expression of HAb18G is associated with tumor progression and prognosis of breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2010; **124** (3): 677–88. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0790-6>.
- Liu Y, Xin T, Jiang QY, et al. CD147, MMP9 expression and clinical significance of basal-like breast cancer. *Med Oncol* 2013; **30** (1): 366. <https://doi.org/10.1007/s12032-012-0366-x>.
- Wang C, Shan M, Niu RJ, et al. Expression of CD147 in triple negative breast cancer and its relationship with prognosis. *J Shanghai Jiaotong Univ (Med Sci)* 2017; **37** (1): 55–9. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-8115.2017.01.012>.
- Li F, Zhang J, Guo J, et al. RNA interference targeting CD147 inhibits metastasis and invasion of human breast cancer MCF-7 cells by downregulating MMP-9/VEGF expression. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2018; **50** (7): 676–84. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmy062>.
- Chen M, Liu Z, Zheng K, et al. The potential mechanism of HIF-1 α and CD147 in the development of triple-negative breast cancer. *Medicine (Baltimore)* 2024; **103** (23): e38434. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000038434>.
- Siva A, Xin H, Qin F, et al. Immune modulation by melanoma and ovarian tumor cells through expression of the immunosuppressive molecule CD200. *Cancer Immunol Immunother* 2008; **57** (7): 987–96. <https://doi.org/10.1007/s00262-007-0429-6>.
- Li L, Tian Y, Shi C, et al. Over-expression of CD200 predicts poor prognosis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Med*

- Sci Monit 2016; **22**: 1079–84. <https://doi.org/10.12659/msm.895245>.
27. **Bisgin A, Meng WJ, Adell G, et al.** Interaction of CD200 overexpression on tumor cells with CD200R1 overexpression on stromal cells: An escape from the host immune response in rectal cancer patients. *J Oncol* 2019; **2019**: 5689464. <https://doi.org/10.1155/2019/5689464>.
 28. **Rexin P, Tauchert A, Hänze J, et al.** The immune checkpoint molecule CD200 is associated with tumor grading and metastasis in bladder cancer. *Anticancer Res* 2018; **38** (5): 2749–54. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12517>.
 29. **Gao L, Zhong JC, Huang WT, et al.** Integrative analysis of BSG expression in NPC through immunohistochemistry and public high-throughput gene expression data. *Am J Transl Res* 2017; **9** (10): 4574–92. PMID: 29118919.
 30. **Zhu X, Wang S, Shao M, et al.** The origin and evolution of Basigin(BSG) gene: A comparative genomic and phylogenetic analysis. *Dev Comp Immunol* 2017; **72**: 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.02.007>.
 31. **Toole BP.** The CD147-hyaluronan axis in cancer. *Anat Rec (Hoboken)* 2020; **303** (6): 1573–83. <https://doi.org/10.1002/ar.24147>.
 32. **Philchenkov AA.** Basigin as a tumor-associated glycoprotein with prognostic value. *Oncology (Kyiv)* 2025; **27** (1): 13–26 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.15407/oncology.2025.01.013>.
 33. **Mustafa M, Ahmad R, Tantry IQ, et al.** Apoptosis: A comprehensive overview of signaling pathways, morphological changes, and physiological significance and therapeutic implications. *Cells* 2024; **13** (22): 1838. <https://doi.org/10.3390/cells13221838>.
 34. **Meng Y, Fan XY, Yang LJ, et al.** Detachment activated CyPA/CD147 induces cancer stem cell potential in non-stem breast cancer cells. *Front Cell Dev Biol* 2020; **8**: 543856. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.543856>.
 35. **Philchenkov AA, Stoika RS.** Apoptosis and cancer: Moving from laboratory to clinics. Ternopil: TDMU, 2005. 524 p. ISBN: 966-673-074-X (in Ukrainian).
 36. **Donnenberg VS, Zhang JJ, Moravcikova E, et al.** Antibody-based cell-surface proteome profiling of metastatic breast cancer primary explants and cell lines. *Cytometry A* 2018; **93** (4): 448–57. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23300>.
 37. **Leccia F, Nardone A, Corvigno S, et al.** Cytometric and biochemical characterization of human breast cancer cells reveals heterogeneous myoepithelial phenotypes. *Cytometry A* 2012; **81** (11): 960–72. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22095>.

CD147 AND CD200 EXPRESSION IN HUMAN BREAST CANCER CELLS: BIOINFORMATIC ANALYSIS AND IN VITRO STUDY

A.A. Philchenkov, M.P. Zavelevich

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. Breast cancer (BC) is a highly heterogeneous disease with different morphological variants and molecular subtypes as well as varying clinical and phenotypic features and treatment response. The cell surface proteins involved in the communications between tumor cells and the component of their microenvironment are currently the focus of attention. The study was **aimed** at the *in silico* and *in vitro* analysis of the patterns of CD147 and CD200 expression in BC cells of different molecular subtypes. **Objects and methods:** the expression and co-expression of BSG and CD200 in normal mammary gland and breast cancer tissue as well as their prognostic importance were analyzed based on UALCAN, GEPIA, TIMER2.0, and KM-Plotter web resources. The GEPIA tool was also used to identify the top 20 genes with similar expression patterns to BSG or CD200 in BC. The protein–protein interaction networks of CD147 or CD200 were constructed using the STRING v.12 database. GSCA platform was used for evaluating the association between BSG and CD200 expression and their involvements in the key cell processes/pathways in BC cells. Expression of CD147 and CD200 in MDA-MB-231, MCF-7, and T-47D cells was assessed by direct immunofluorescence technique using

flow cytometry. **Results:** according to the bioinformatic analysis, BSG mRNA expression increased significantly in BC tissue as compared to the normal mammary gland tissue. This holds true for each of the analyzed molecular subtypes of BC. On the contrary, CD200 mRNA expression decreased in BC tissue. Additionally, the majority of genes co-expressed with BSG in BC were located in the proximity of BSG on chromosome 19 at p13 locus. Nevertheless, a protein–protein interaction network of CD147 did not include any of the proteins coded by these genes. The overall survival in BC of luminal A or B subtypes was significantly shorter in patients with BSG mRNA expression in tumors exceeding its median level, while for CD200 expression this association was the reverse one. In all studied BC cell lines, most cells were CD147-positive, while CD200 expression was detected only on single cells. **Conclusions:** the oppositely directed association of the survival of BC patients with the expression of CD147 or CD200 has been revealed. This is in line with the opposite patterns of their expression in malignant cells.

Keywords: cancer, mammary gland, molecular subtypes, survival, CD147, CD200, *in silico*, cell lines of human tumors, flow cytometry.

Адреса для листування:

Фільченков О.О.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України
E-mail: apoclub@i.ua

Одержано: 08.04.2025