

Utjecaj tienopiridinskog derivata na izražaj CD15s epitelnih i mezenhimalnih stanica karcinoma dojke

Vučenović, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:852945>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-25**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Nikolina Vučenović

**UTJECAJ TIENOPIRIDINSKOG DERIVATA NA IZRAŽAJ CD15s EPITELNIH
I MEZENHIMALNIH STANICA KARCINOMA DOJKE**

Diplomski rad

Akadska godina:

2020./2021.

Mentor:

prof. dr. sc. Anita Markotić

Split, srpanj 2021.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Nikolina Vučenović

**UTJECAJ TIENOPIRIDINSKOG DERIVATA NA IZRAŽAJ CD15s EPITELNIH
I MEZENHIMALNIH STANICA KARCINOMA DOJKE**

Diplomski rad

Akadska godina:

2020./2021.

Mentor:

prof. dr. sc. Anita Markotić

Split, srpanj 2021.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Tumori	2
1.1.1. Obilježja tumorskih stanica.....	4
1.1.2. Tumorske matične stanice	6
1.2. Tumor dojke	8
1.2.1. Epidemiologija i etiologija raka dojke.....	8
1.2.2. Patohistologija i stadij raka dojke	10
1.2.3. Molekularna klasifikacija raka dojke.....	11
1.3. Građa i fiziološka i patološka važnost liganda endotelnog selektina CD15s	13
1.4. Tienopiridinski derivati	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	16
2.1. Cilj istraživanja	17
2.2. Hipoteze istraživanja.....	17
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Stanična linija MDA-MB-231 i tienopiridinski derivat.....	19
3.2. Protočna citometrija	20
3.2.1. Postupak tretiranja stanica i određivanja protočnom citometrijom	21
3.3 Statistička analiza	23
4. REZULTATI	24
4.1. Određivanje različitih staničnih subpopulacija	25
4.2. Izražaj CD15s u mezenhimalnim (CSC) i epitelnim (CD44-) subpopulacijama prije i nakon tretmana spojem 1	26
4.3. Ekspresija CD44 u mezenhimalnim CSC pozitivnim i negativnim za CD15 nakon tretmana spojem 1	28
5. RASPRAVA	30
6. ZAKLJUČCI	34
7. POPIS CITIRANE LITERATURE	36
8. SAŽETAK	44
9. SUMMARY	46
10. ŽIVOTOPIS	48

Zahvala

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Aniti Markotić, na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem se cijeloj Katedri za medicinsku kemiju i biokemiju na prihvaćanju i vodstvu kroz znanstveni projekt koji je rezultirao i objavljenim znanstvenim radom.

Hvala mojim prijateljima što su mi uljepšali studentske dane i bili mi nepresušan izvor motivacije, ohrabrenja i veselja.

Posebno hvala mojem Anti, na svojoj ljubavi, podršci i razumijevanju tijekom ovih godina.

Na kraju, hvala mojim roditeljima, Adelmi i Nikici, na požrtvornosti i bezuvjetnoj ljubavi i sestri Dunji na podršci tijekom cijelog mog školovanja.

1. UVOD

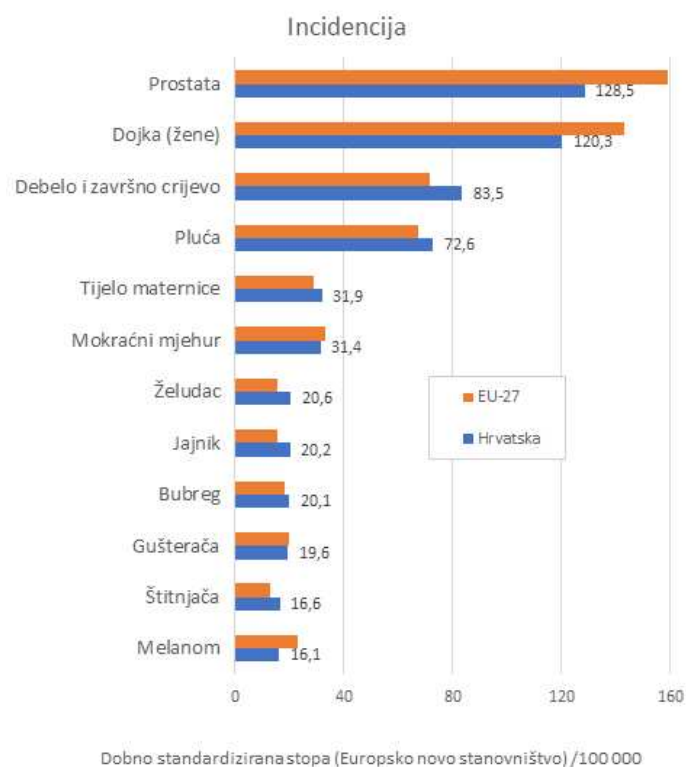
1.1. Tumori

Novotvorine ili tumori su patološke tvorbe koje nastaju prekomjernim umnažanjem abnormalnih stanica. Za potrebe kliničke prakse i terapijskog odlučivanja većina se novotvorina može podijeliti u dvije skupine: dobroćudne i zloćudne tumore. Dobroćudni ili benigni tumori većinom imaju povoljan klinički ishod, rastu polagano, a rast im je ograničen na organ u kojem je tumor nastao. Zloćudni ili maligni tumori rastu brzo i infiltrativno, razarajući normalno tkivo organa u kojem se tumor razvio; šire se u druge organe krvlju ili limfom i imaju nepovoljniji klinički ishod (1).

Histološki se tumori svrstavaju u nekoliko većih skupina kao što su epitelni tumori, mezenhimalni tumori, tumori limfocita i hematopoetskih stanica, neuralni tumori i srodne novotvorine, tumori potpornih stanica živčanog sustava te tumori spolnih stanica. Epitelni benigni tumori nazivaju se epitelomi ili češće adenomi, makar bi tim pojmom trebalo označavati samo tumore nastale iz epitela žlijezda i žljezdanih vodova. Maligni epitelni tumori općenito se nazivaju karcinomi, a oni nastali iz epitela žlijezda i žljezdanih vodova, kao što su karcinomi dojke, adenokarcinomi (1).

Broj oboljelih od malignih bolesti u svijetu je u stalnom porastu. Razlozi tomu su produljenje očekivanog trajanja života (procjene za 2020. godinu su da se 62% procijenjenih novih dijagnoza i 76% procijenjenih smrti od malignih bolesti javlja kod starijih od 65 godina) i porast koji nije ovisan o trendu starenja stanovništva što pokazuju dobno standardizirane stope incidencije malignih bolesti. Svjetska zdravstvena organizacija predviđa da će u svijetu broj oboljelih porasti s 18 milijuna u 2018. godini na 29,5 milijuna u 2040. godini, dok će se broj umrlih povećati s 9,5 milijuna na 16,4 milijuna godišnje. Na razini Europske unije, rak dojke je najčešće dijagnosticirana maligna bolest i čini 13.3% svih dijagnoza raka. Prema procjenama za 2020. godinu, više od 350.000 žena će, u zemljama članicama EU, biti suočeno s dijagnozom raka dojke. Slijede rak debelog i završnog crijeva s 12,7%, rak prostate 12,5% i rak pluća 11,9% ukupno dijagnosticiranih zloćudnih bolesti (2).

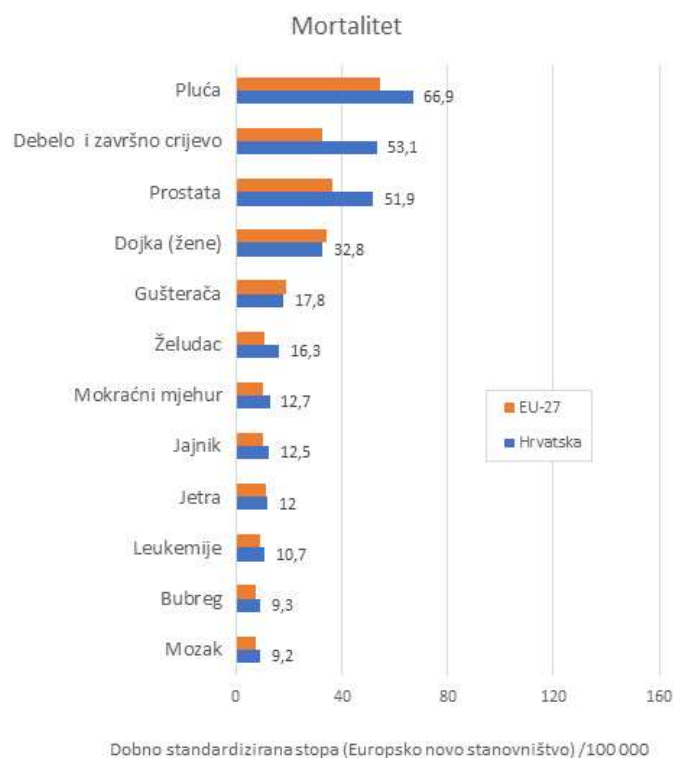
Kako u svijetu, tako su i u Hrvatskoj maligne bolesti značajan zdravstveni problem. One su drugi najčešći uzrok smrti, odmah nakon kardiovaskularnih bolesti i odgovorne su za 27% svih smrti u Hrvatskoj u 2018. godini. Kod osoba mlađih od 65 godina, maligne bolesti su najčešći uzrok smrti, te uzrokuju preko 40% svih smrti u toj dobi. Kao što je prikazano na Slici 1, najčešći novodijagnosticirani rak u Hrvatskoj u 2020. godini je rak prostate, zatim rak dojke kod žena, odnosno rak debelog i završnog crijeva, te rak pluća u ukupnoj populaciji (2).



Slika 1. Incidencija raka u Hrvatskoj i EU-27 u 2020. godini.

IZVOR: Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak Republike Hrvatske [Internet]. Incidencija raka u Hrvatskoj; 2018. [citirano 3. lipnja 2021.]. Dostupno na <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevenција-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/> (2).

Vodeći uzroci smrti među malignim bolestima su rak pluća, rak debelog i završnog crijeva, rak prostate te rak dojke, što je vidljivo na Slici 2 (2).



Slika 2. Mortalitet raka u Hrvatskoj i EU-27 u 2020. godini.

IZVOR: Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak Republike Hrvatske [Internet]. Incidencija raka u Hrvatskoj; 2018.[citirano 3. lipnja 2021.]. Dostupno na <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/> (2).

Preliminarne procjene na temelju podataka iz registra za rak pokazuju da je u Hrvatskoj, u nekom trenutku života, 4% stanovništva oboljelo od maligne bolesti ili da je prevalencija raka oko 170 000 ljudi. Bitno je naglasiti da se stopa preživljenja za skoro sve tipove malignih bolesti povećava, kako u svijetu, tako nešto sporije i u Hrvatskoj (3).

1.1.1. Obilježja tumorskih stanica

Promjene koje su odgovorne za pretvorbu normalnih stanica u maligne su uglavnom genske mutacije, stoga tumore možemo definirati kao genske bolesti. Mutacije većinom nastaju u somatskim stanicama kao posljedica djelovanja mutagena ili nasumično kao posljedica pogreške pri umnažanju DNA. U manjem broju slučajeva mutacije mogu biti naslijeđene (4).

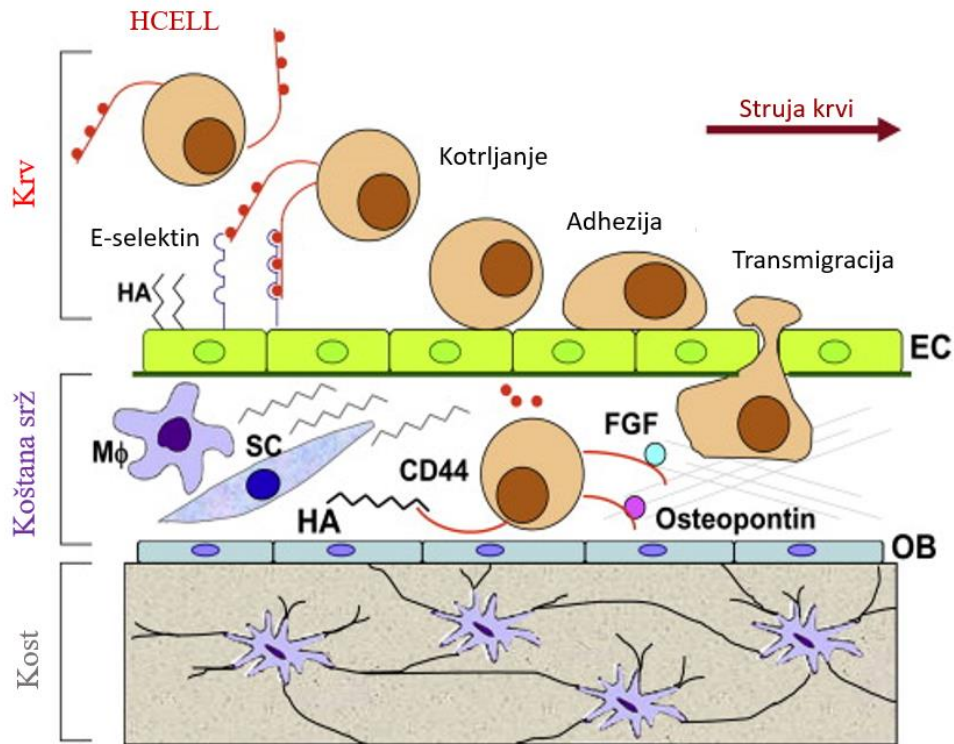
Većina mutacija koje se nalaze u genomu stanica raka su usputne mutacije koje nisu bitne za nastanak i progresiju raka, a najvjerojatnije su posljedica genske nestabilnosti. Pokretačke (engl. *driver*) mutacije su one odgovorne za nastanak raka (onkogeni, tumorsupresorski geni i neki drugi), a pojedine stanice raka ih najčešće imaju nekoliko (4).

Onkogeni su promijenjena varijanta inače normalnih staničnih gena, protoonkogeni, koji su bitni za prijenos staničnih signala, odnosno, za staničnu proliferaciju i diferencijaciju. Čest način na koji se prenose signali u stanici je fosforilacija proteina, pa su mnogi protoonkogeni geni za tirozin-kinaze. Posljedično aktivaciji onkogeni dolazi do nekontrolirane proliferacije stanica što dovodi do nastanka raka. Aktivacija onkogeni može nastati zbog mutacije u genima, genske amplifikacije (kao što je kod onkogeni *HER2/neu* kod raka dojke) ili kromosomske translokacije (4).

Tumorsupresorski geni imaju različite funkcije u stanici, a gubitak ili njihova inaktivacija dovode do razvoja raka. Obično je potrebna inaktivacija oba alela jer tumorsupresorski geni imaju recesivni učinak, a ona nastaje kao posljedica mutacije ili epigenetičke promjene. Primjer tumorsupresorskog gena koji nedostaje ili je inaktiviran u različitim tipovima raka je gen *p53* odgovoran za popravak oštećene DNA i poticanje apoptoze. Geni skrbnici (engl. *caretakers*) su važni geni za očuvanje genomske stabilnosti, a potrebne su inaktivirajuće mutacije oba alela da bi došlo do razvitka raka. U ovu skupinu se ubrajaju geni *BRCA1* i *BRCA2* koji su povezani s nasljednim rakom jajnika i dojke (4).

1.1.2. Tumorske matične stanice

Matične stanice imaju sposobnost samoobnavljanja, neograničenog dijeljenja i diferencijacije u najmanje jedan tip visoko diferenciranih stanica (5). Tumorske matične stanice (CSC, engl. *cancer stem cells*) predstavljaju posebnu subpopulaciju stanica tumorskog tkiva koje, za razliku od diferenciranih klonalnih stanica koje imaju ograničen proliferacijski potencijal, imaju sposobnost samoobnavljanja i klonalne ekspanzije (6). One imaju sposobnost izbjegavanja stanične smrti i metastaziranja, iako mogu i drugo vremena provesti u stadiju mirovanja (engl. *dormant*). Također, pokazuju i svojstvo plastičnosti, odnosno mogućnost prelaska iz stadija matične stanice u diferenciranije stadije (7). Teoriju o postojanju tumorskih matičnih stanica postavio je Moore 1973. godine (8). Pretpostavlja se da odrasla matična stanica razvije određenu genetsku mutaciju i onda ona postaje izvornom tumorskom matičnom stanicom (engl. *cancer stem cell of origin*). Stjecanje novih genetskih mutacija rezultira nastankom malignog tumora (9). Činjenica da se matične stanice sporo dijele pridonosi njihovoj otpornosti na kemoterapiju. U tumorima mozga, dojke, kolona, jajnika, prostate, melanoma te multiplog mijeloma identificirane su tumorske matične stanice, ali se njihov postotak u ukupnoj tumorskoj masi u različitim vrstama razlikuje (10). Tumorske matične stanice su u suvremenoj onkologiji prepoznate kao velika ciljna skupina stanica na koje bi trebalo terapijski djelovati kako bi se ostvarili bolji rezultati u liječenju malignih tumora. Brojna su istraživanja pokazala da je citokinska mreža bitna za regulaciju rasta, samoobnavljanja, preživljenja i diferencijaciju CSC. Tako su receptori iz porodice epidermalnih čimbenika rasta, uključujući i receptor 2 ljudskog epidermalnog čimbenika rasta, *HER2* (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*), izraženi na epitelnim matičnim stanicama (11). Ekspresija *HER2* receptora, koji je član porodice transmembranskih receptorskih tirozin kinaza, povećana je kod 20-30% invazivnih karcinoma dojke (12). Utkivljenje matičnih stanica (engl. *homing*) je fiziološki proces kojemu, naprimjer, podliježu hematopoetske matične stanice u brojnim organima. Međutim, u većini solidnih organa, matične stanice ne prolaze procese utkivljenja i redistribucije osim ako se ne pretvore u metastazirajuće tumorske matične stanice. U tom složenom procesu bitnu ulogu imaju citoadhezijski receptori uključujući integrine, selektine, CD44 ili članove kadherinske obitelji (Slika 3). U progresiji bolesti, tumorske matične stanice sve više prestaju biti ovisne o interakciji sa svojim mikrookolišem u tkivu i započinju proces metastaziranja. Epitelni tumori prolaze proces epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) u kojem gube adhezijske veze s okolinom. Kod solidnih tumora su L1 i E-kadherin povezani s procesom EMT-a (11).



Slika 3. Shematski prikaz interakcije CD44 liganda za vrijeme utkviljenja mezenhimalne stromalne stanice. HCELL-sijalofukozilirana glikoforma CD44, HA-hijaluronan, EC-endotelne stanice, MΦ-makrofag, SC-stromalne stanice, FGF- fibroblastni čimbenik rasta. IZVOR: Khaldoyanidi S. Directing Stem Cell Homing. Cell Stem Cell. 2008; 3:198-200 (13).

1.1.2.1. Identifikacija tumorskih matičnih stanica

Postoji više tehnika koje se koriste za izdvajanje populacije matičnih tumorskih stanica. Jedna od češće korištenih metoda je višebojna protočna citometrija u kojoj se antitijela vežu na određene površinske antigene izražene na površini tumorskih stanica. Obično se koristi nekoliko markera od kojih su jedan ili dva specifična za organ (njime se može potvrditi hematopoetsko podrijetlo stanice ili isključiti leukocit u uzorcima iz solidnih organa) i dodatna protutijela za razlikovanje tumorskih matičnih od diferenciranih stanica. Marker CD44 je izražen kod tumorskih matičnih stanica, kao što je prikazano u Tablici 1, ali mu je mana što se nalazi i u drugim stanicama, npr. leukocitima, u istom organu. Glavni problem u prepoznavanju CSC je njihova plastičnost i heterogenost (14).

Tablica 1. Površinski markeri tumorskih matičnih stanica

Fenotipi staničnih površina matičnih tumorskih stanica kod različitih tipova tumora	
Tip tumora	Markeri na površini CSC stanice
Leukemija	CD34+, CD38-, HLA-DR-, CD71-, CD90-, CD117-, CD123+
Dojka	ESA+, CD44+CD24-/(low)
Mozak	CD133+, CD49f+, CD90+
Pluća	CD133+, ABCG2
Kolon	CD133+, CD44+, CD166+, EpCAM+, CD24+
Gušterača	CD133+, CD44+, EmCAM+, CD24+
Melanom	CD20+

IZVOR: Dawood S, Austin L, Cristofanilli M. Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology (Williston Park)*. 2014;28(12):1101–1107,1110 (15).

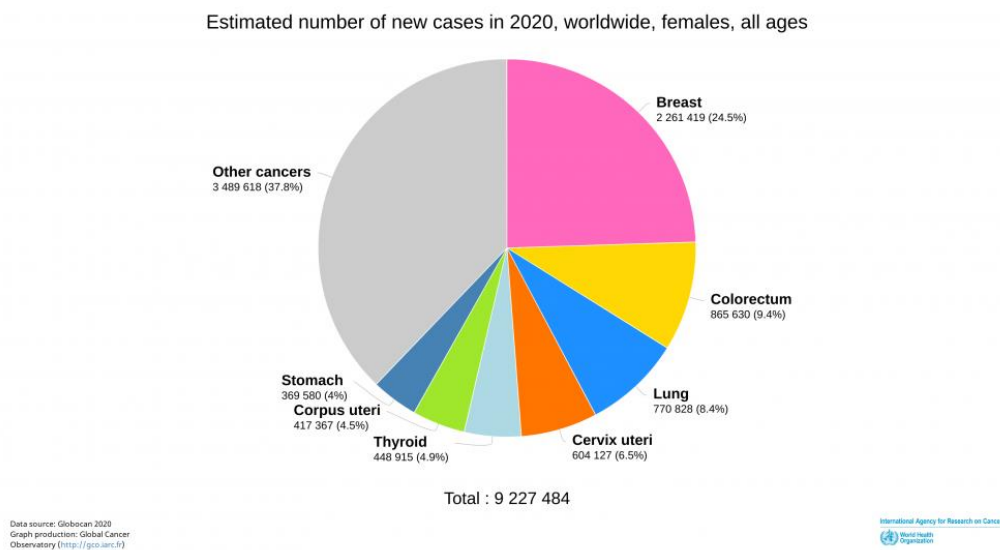
1.2. Tumor dojke

1.2.1. Epidemiologija i etiologija raka dojke

Rak dojke je najčešće sijelo raka u žena i predstavlja veliki javnozdravstveni problem. Čini gotovo četvrtinu novodijagnosticiranih tumora u žena i 15% smrti od raka. U prosjeku svaka deveta žena oboli od ove maligne bolesti kroz život. U 2020. godini u svijetu je zabilježeno preko 2,3 milijuna novih slučajeva raka dojke (Slika 4) i preko 600 000 preminulih (15). Kako u svijetu, tako je i u Hrvatskoj rak dojke na prvom mjestu po incidenciji kod žena (4). Prema podacima Registra za rak u Hrvatskoj je u 2017. godini zabilježeno 2767 novih slučajeva (stopa od 129,7/100 000), a u 2019. godini su od ove maligne bolesti umrle 752 žene (stopa 35,9/100 000) (2). Stope incidencije povišene su u Australiji/Novom Zelandu, Europi i Sjevernoj Americi, a posebno u Belgiji (113 slučajeva na 100 000 žena) i Luksemburgu (109). Suprotno tomu, stope incidencije u subsaharskim afričkim regijama, posebno u istočnoj (30 slučajeva na 100 000 žena) i srednjoj Africi (28), kao i u Južnoj središnjoj Aziji (26), bile su znatno niže (16/100 000) (Slika 5). Stope preživljavanja od raka dojke vrlo su visoke kada se rak otkrije rano i u područjima u kojima je dostupno liječenje. Nažalost, u 50 do 80% slučajeva,

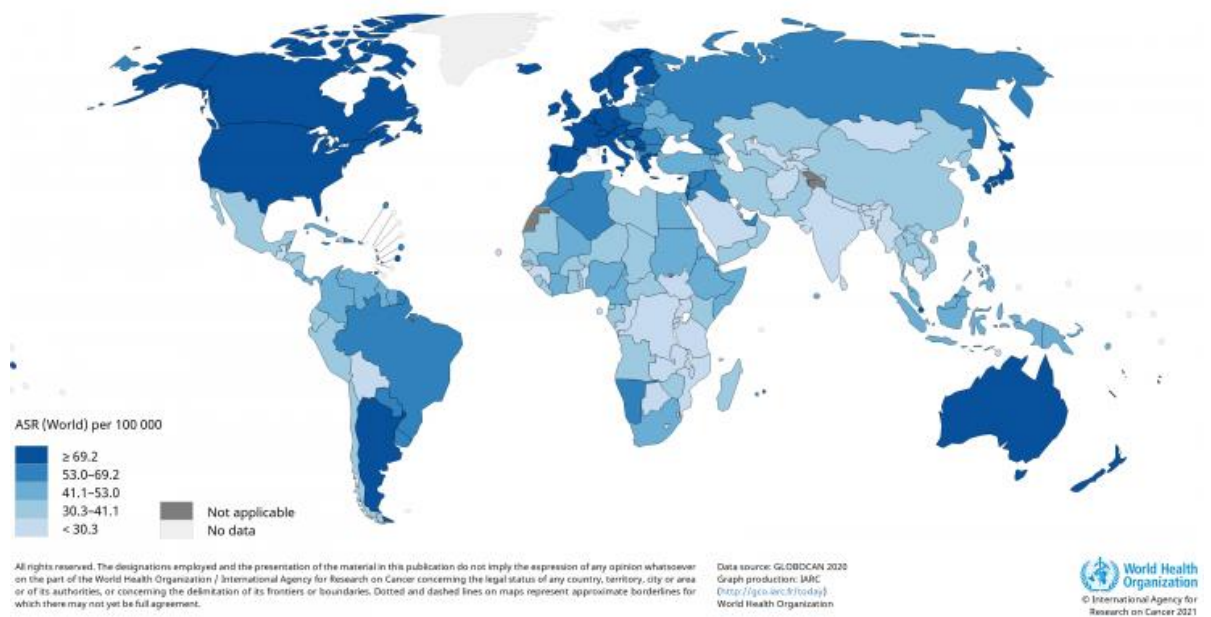
rak dojke se dijagnosticira u podmakloj fazi, kada je rak skuplje i teže liječiti, a nerijetko i nemoguće izliječiti (14). Čimbenici rizika koji pogoduju nastanku raka dojke su starija životna dob, pozitivna obiteljska anamneza, starija dob pri prvom porođaju ili nerađanje uopće, rana menarha, kasna menopauza, izloženost ionizirajućem zračenju, pretilost, oralni kontraceptivi, hormonska nadomjesna terapija i prethodna dijagnoza dobroćudnih parenhimatoznih promjena na dojci.

Dob je najznačajniji čimbenik rizika jer incidencija raka dojke kontinuirano raste nakon 35. godine. Svega se 10% tumora dojke može povezati s genetskom predispozicijom, a u tim se slučajevima rak pojavljuje u ranijoj životnoj dobi i često je obostran. Neki od nasljednih gena su *BRCA1* i *BRCA2* (engl. *breast cancer gene 1 i 2*), *PALB2* (engl. *partner and localizer of BRCA2*), *PTEN* (engl. *phosphatase and tensin homolog*), *ATM* (engl. *ataxia teleangiectasia mutated*), *TP53* i drugi. Općenito, dulja izloženost djelovanju estrogena povećava rizik od raka dojke, tako da kod rane menarhe, kasne menopauze, debljine i primjene oralnih kontraceptiva postoji povećan rizik nastanka tumora (4).



Slika 4. Procijenjen broj novodijagnosticiranih slučajeva malignih bolesti kod žena, globalno u 2020. godini za sve dobne skupine.

IZVOR: <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data>.



Slika 5. Procijenjena dobno-standardizirana incidencija raka dojke u svijetu 2020. godine.
 IZVOR: <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-dat>.

1.2.2. Patohistologija i stadij raka dojke

Rak dojke je vrlo heterogena skupina bolesti s različitim histološkim, morfološkim i molekularnim karakteristikama. Na temelju međunarodnih smjernica klinički se dijeli u tri podvrste ovisno o statusu estrogenskog i progesteronskog receptora (ER i PR) i HER2 (ERBB2) (13). Najčešći histološki tip tumora je invazivni duktalni karcinom (invazivni karcinom nespecifičnog tipa, NST) na kojeg otpada 70-80% svih tumora i invazivni lobularni karcinom u koje spada 10-15% tumora dojke. Rjeđe se dijagnosticiraju neki specifični podtipovi kao što su tubularni, metaplastični, mucinozni, papilarni, mikropapilarni i karcinom s medularnim karakteristikama. U patohistološkom opisu tumora se osim vrste opisuje i veličina, stupanj zloćudnosti, proliferativna aktivnost kroz Ki-67 indeks, hormonski status (receptori za estrogen i progesteron), status *HER2* receptora, broj pregledanih i otkrivenih pozitivnih limfnih čvorova aksile, te položaj limfnih i krvnih žila prema tumoru. Sa svim ovim podacima definira se TNM status, nakon kojeg se odredi stadij bolesti. Cilj određivanja patohistološkog statusa i proširenosti bolesti je u što boljoj procjeni prognoze, odabira terapijskog postupka i procjeni odgovora na liječenje (4).

1.2.3. Molekularna klasifikacija raka dojke

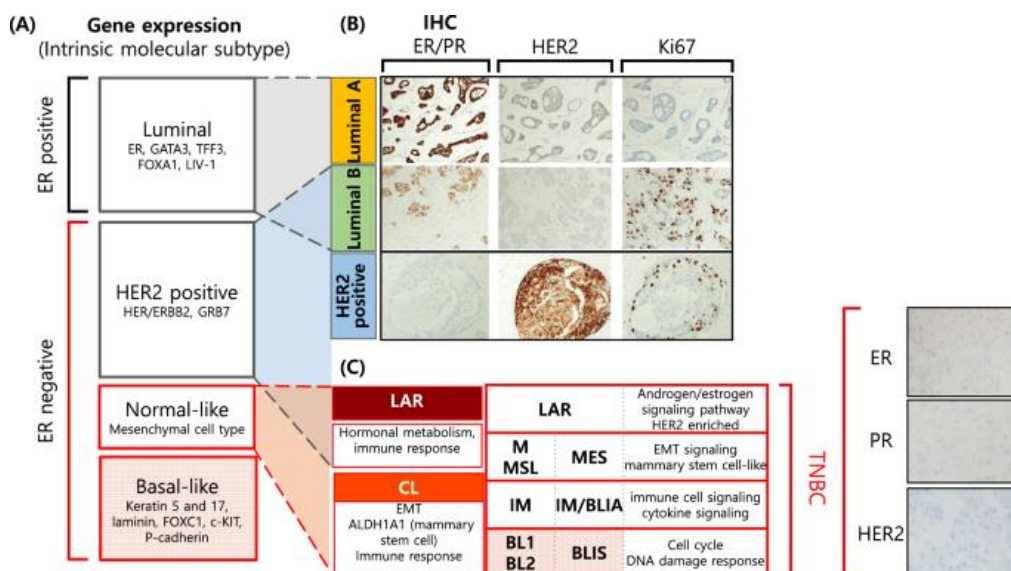
Rak dojke predstavlja biološki i fenotipski heterogenu skupinu bolesti s različitim kliničkim ishodima i odgovorom na terapiju. Danas, u eri moderne onkologije samo morfološka klasifikacija i kliničko-patološki parametri (veličina tumora, zahvaćenost limfnih čvorova, metastaze), nedovoljni su za predviđanje stvarnog ponašanja tumora dojke. Molekularni podtipovi raka dojke snažni su prognostički i prediktivni čimbenici. Na temelju opsežnih istraživanja profila ekspresije gena, otkrivena su četiri klinički relevantna molekularna podtipa: luminalni A, luminalni B, *HER2*+ i trostruko negativni (TN) (17). Skupine gena odgovorne uglavnom za segregaciju molekularnih podtipova raka dojke su geni povezani s ekspresijom estrogenskih receptora (ER), progesteronskih receptora (PR), *HER2* i regulatorom proliferacije stanica (Ki-67). Međutim, sve veća potreba za poboljšanjem stratifikacije rizika i točnim određivanjem prognoze, uz bolje razumijevanje biologije tumora, doveli su do razvoj mnogih multigenskih testova, poput Oncotype DX, Prosigna PAM50 i MammaPrint (18). Profili ekspresije 70 gena (MammaPrint) i 21 gena (Oncotype DX) koriste se u bolesnica s ER + tumorom u ranoj kliničkoj fazi kako bi se razlikovale žene koje mogu imati veći rizik od recidiva i koje bi imale koristi od adjuvantne kemoterapije (19). PAM50 (Prosigna) je također klasifikator podtipova raka dojke kojim se procjenjuje rizik pacijentici za povratak bolesti kao i korist od neoadjuvantne kemoterapije (18).

Luminalni A je najčešći molekularni podtip kojem pripada približno polovica novodijagnosticiranih tumora dojke. Imunohistokemijski profil ovog podtipa definiran je kao: ER+ ($\geq 1\%$), visoka ekspresija PR ($\geq 20\%$), *HER2*- ($\leq 10\%$) i niska razina Ki-67 ($<14\%$) (20). Ovaj je podtip povezan s vrlo povoljnom prognozom, indolentnijim kliničkim tijekom i općenito pokazuje manju zahvaćenost limfnih čvorova (21).

Luminalni B podtip čini oko 20-30% novodijagnosticiranih tumora dojke. Nadalje se može imunofenotipski kategorizirati u luminalni B (*HER*-): ER+ ($\geq 1\%$), PR- ili $<20\%$, *HER2*- ($\leq 10\%$) i visoke razine Ki-67 ($\geq 20\%$); i luminalni B (*HER2*+): ER+ ($\geq 1\%$), *HER2*+ ($> 10\%$) i bilo koja razina PR-a i Ki-67 (22). Ova skupina tumora se smatra najagresivnijom skupinom tumora dojke ovisnih o hormonima i zahtijeva dodatne tretmane hormonalnom terapijom, kao što je kemoterapija (kada je *HER2*+/-) ili ciljana terapija (kada je *HER2*+). Glavna razlika u molekularnom aspektu između ovih podskupina je u povećanoj ekspresiji gena povezanih s proliferacijom stanica, kao što je NSEP1 i ciklin E1 (CCNE1) (23).

HER+ podtipu pripada oko 15-20% novootkrivenih tumora dojke. Ovaj podtip karakterizira visoka ekspresija HER2 ($> 10\%$), negativnost za ER ($<1\%$) i PR ($<20\%$) i visoka ekspresija Ki-67 ($> 20\%$) (20). Prema najnovijim smjernicama za kliničku praksu koje je pružilo Američko društvo kliničke onkologije (ASCO), ako rezultati IHC-a pokazuju potpuno bojenje stanične membrane s jakim obilježavanjem, dijagnoza je pozitivna na HER2; ako je bojenje od niskog do umjerenog intenziteta, bit će potrebno koristiti FISH (fluorescentna *in situ* hibridizacija) test s dodatnim detektorom za potvrdu pozitivnosti i, konačno, u slučajevima s negativnim obilježavanjem i slabim bojenjem membrane, dijagnoza se može potvrditi kao negativna za HER2. Amplifikacija gena i povišena ekspresija proteina HER2 povezana je s tumorom većeg histološkog stupnja, visokim proliferativnim indeksom i sklonosti metastaziranju, što sve skupa dovodi do lošije prognoze (24). Međutim, ovi tumori mogu dobro reagirati na lijekove koji blokiraju aktivnost HER2, posebno humanizirana monoklonska antitijela (Trastuzumab) i inhibitore tirozin kinaznih receptora (Lapatinib) (25).

Trostruko negativni (TNBC) rak dojke čini 10% do 20% svih tumora dojke. Ovaj podtip karakterizira nedostatak ekspresije hormonskih receptora ER ($<1\%$) i PR ($<20\%$) te onkoproteina HER2 ($\leq 10\%$); također, ovo su vrlo proliferativni tumori, prema indeksu Ki-67 ($> 30\%$) (20). TNBC tumori su češći u bolesnika s BRCA1 mutacijama, u mladih žena, s višim histološkim stupnjem, s većim rizikom loko-regionalnog recidiva, kontralateralne bolesti i sistemskog recidiva (26). Po profilu genske ekspresije, TNBC tumori mogu se podijeliti u sedam skupina što je i vidljivo iz Slike 6. Po toj podjeli postoje dva tipa slična bazalnom (engl. *basal-like*), BL1 i BL2, s bazalnim uzorkom ekspresije gena, ali s razlikom u imunološkom odgovoru; jedan luminalni tip s androgenim receptorima (LAR) koji prikazuje različitu ekspresiju gena koji sudjeluju u metabolizmu androgena; jedan imunomodulacijski tip (IM), koji prikazuje važne promjene u ekspresiji gena uključenih u imunološke signalne putove; jedan CL (engl. *claudin-low*) tip, karakteriziran niskom ekspresijom proteina staničnog spoja (kladini 3, 4 i 7, uz E-kadherin); i dva mezenhimalnog tipa - sam mezenhimalni (M) i sličan mezenhimalnom, MSL (engl. *mezenhimal stem-like*), oba s pozitivnom regulacijom signalnih putova koji su uključeni u EMT, ali s razlikom u signaliziranju gena povezanih s matičnim stanicama i angiogenim čimbenicima (27). Unatoč jednostavnosti definicije trostruko negativnih tumora dojke, ovaj je podtip izazov za kliničku praksu zbog njegove morfološke, molekularne i kliničke heterogenost te nedostatka ciljanih terapija (28).



Slika 6. Molekularni podtipovi trostrukonegativnog raka dojke. PR- progesteronski receptor, HER2- receptor 2 humanog epidermalnog čimbenika rasta, IHC- imunohistokemija, LAR – luminalni tip s androgenim receptorima, CL- kladin siromašni tip, M- mezenhimalni, MSL- sličan mezenhimalnom, IM- imunomodulatorni, BL- bazalni, MES općenito mezenhimalni, BLIA- bazalni imuno-aktivirani, BLIS- bazalni imunosuprimirani; crvenom bojom su označeni podtipovi trostrukonegativnog tumora dojke. IZVOR: Lee YM, Oh MH, Go JH, Han K, Choi SY. Molecular subtypes of triple-negative breast cancer: understanding of subtype categories and clinical implication. *Genes and Genomics*. 2020;42:1381-7. (29).

Zaključno, razvrstavanje raka dojke u relevantne molekularne podtipove važan je aspekt terapijskog odlučivanja.

1.3. Građa i fiziološka i patološka važnost liganda endotelno selektina CD15s

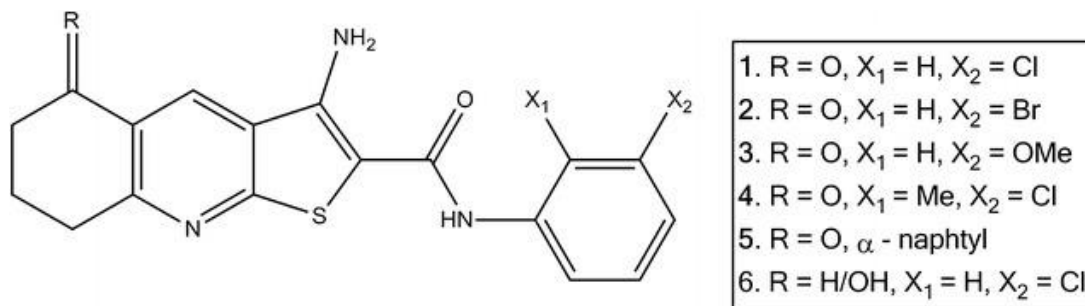
Sijal-Lewis X (sLe^x) je tetrasaharid koji se sastoji od sijalinske kiseline, fukoze i N-acetilaktozamina. Njegovo sustavno ime je 5-acetilneuraminil-(2-3)-galaktozil-(1-4)-(fukopiranozil-(1-3))-N-acetilglukozamin(Neu5Aca2-3Galβ1-4[Fuca1-3]GlcNAcβ).

Prekursor sLe^x je Le^x, poznat i kao skup diferencijacije 15 (CD15) ili embrionalni antigen 1 specifičan za određenu fazu, SSEA-1 (engl. *stage specific embrional antigen 1*), koji ima mnoštvo funkcija u ljudskom organizmu (30). Stoga se sLe^x naziva još i CD15s te je specifičniji ligand od CD15 za tri selektina (leukocitni L, endotelni E, te trombocitni P-selektin), i time igra važnu ulogu u više fizioloških procesa posredovanih interakcijom sa selektinima (31). Jedan je od najvažnijih antigena krvnih grupa i nalazi se na kraju glikolipida

ili glikoproteina prisutnih na površini stanica (30). CD15s se konstitutivno eksprimira na granulocitima i monocitima i posreduje u upalnoj ekstravazaciji tih stanica, dok ga T i B-limfociti u mirovanju ne ekspimiraju nego tek nakon što se aktiviraju (32). Također, CD15s omogućuje spermijima da prepoznaju jajnu stanicu i oplode je. Ljudska *zona pellucida* je glikoproteinski matriks koji oblaže jajnu stanicu, a sastoji se od gustog sloja N- i O-glikana kojima je CD15s završna sekvenca (33). CD15s ima i važnu ulogu u metastaziranju raka, olakšavajući ekstravazaciju stanica raka iz krvotoka (34). Upravo je adhezija stanica raka na vaskularni endotel ključan proces u hematogenom metastaziranju i nalikuje na proces regrutiranja leukocita na mjesto upale. Odvijanje ovog procesa je moguće zahvaljujući E-selektinu i njegovim ligandima kao što je CD15s koji može biti ekspimiran kao oligosaharidna grana CD44 glikoproteina ili kao samostalni glikosfingolipid (35). Karakteristika glikana ekspimiranih u karcinomu dojke, otkrivenih pomoću panela antitijela, pokazala je da stanice BT-20 ekspimiraju CD15s kao glikoprotein, dok je kod MDA-MB-468 stanica CD15s funkcionalni E-selektinski ligand u obliku glikosfingolipida (36). U slučaju glikoproteina CD15s, [NeuAc-Gal-(Fuc)-GlcNAc] terminalni tetrasaharid povezan je s CD44 transmembranskim glikoproteinom (37). CD44 varijanta izoforme 4 (CD44v4) glavni je glikoprotein s CD15s glikozidnim ograncima u metastatskim MDA-MB-231 stanicama (38). Novija istraživanja su, primjenjujući tretman proteazama, dokazala da su glikosfingolipidni CD15s u stanicama raka dojke ligandi E-selektina i time vrijedan potencijal za liječenje usmjereno na sprječavanje metastaza (36).

1.4. Tienopiridinski derivati

U organskoj kemiji, derivati piridina spojeni s tiofenskim jezgrama važna su skupina heterocikličkih spojeva i privlače značajan interes zbog svoje velike praktične koristi, a posebno zbog različitih bioloških aktivnosti (39). Poznato je šest izomernih tienopiridinskih struktura, kao što je prikazano na Slici 7, koje karakteriziraju različiti načini anulacije (stvaranja prstenova). Neki od njih pokazuju antibakterijska, antivirusna svojstva ili antihipertenzivno djelovanje (40). Također, računalnim modeliranjem specifične fosfoinozimid-fosfolipaze C- γ 2, otkrivena je i skupina antikancerogenih tieno [2,3-b]piridina, za koje je utvrđeno da su učinkoviti protiv različitih staničnih linija raka. To je zbog mnogih bioloških procesa koje tieno [2,3-b] piridini moduliraju, a bitni su za funkcioniranje tumora (41).



Slika 7. Strukture derivata tieno [2,3-b] piridina. IZVOR: Reynisson J, Jaiswal JK, Barker D, D'mello SAN, Denny WA, Baguley BC i sur. Evidence that phospholipase C is involved in the antitumour action of NSC768313, a new thieno[2,3-b]pyridine derivative. *Cancer Cell Int.* 2016;16:1-9. (41).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. Cilj istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja na MDA-MB-231 staničnoj liniji su:

1. Odrediti izražaj CD15s na epitelnim (CD44-CD24+ i CD44-CD24-) i mezenhimalnim (CD44+CD24- tj. CSC) stanicama nakon primjene tienopiridinskog derivata.
2. Odrediti izražaj CD44 kod CSC CD15s+ i CSC CD15s- stanica nakon primjene tienopiridinskog derivata.

2.2. Hipoteze istraživanja

1. Primjena tienopiridinskog derivata smanjit će izražaj CD15s biljega na epitelnim i mezenhimalnim stanicama karcinoma dojke.
2. Primjena tienopiridinskog derivata smanjit će izražaj CD44 biljega na mezenhimalnim (CSC) CD15+ i CD15- stanicama karcinoma dojke.

3. MATERIJALI I METODE

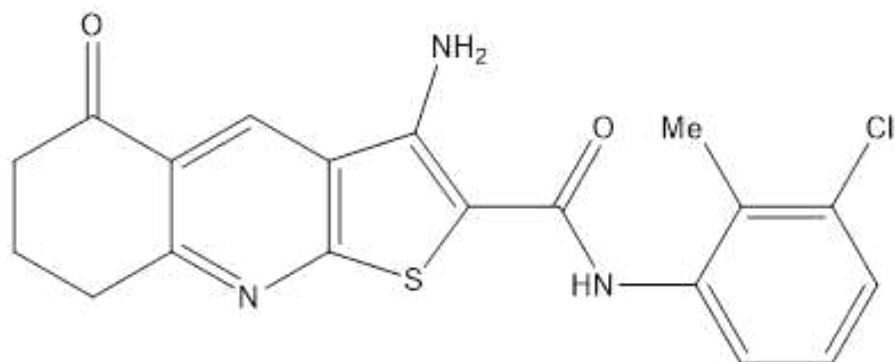
3.1. Stanična linija MDA-MB-231 i tienopiridinski derivat

MDA-MB-231 je jedna od najčešće korištenih staničnih linija raka dojke u medicinskim istraživačkim laboratorijima. To je epitelna, ljudska stanična linija raka dojke koja je uspostavljena iz pleuralnog izljeva 51-godišnje bjelkinje s metastatskim adenokarcinom dojke (42). MDA-MB-231 vrlo je agresivna, invazivna i slabo diferencirana stanična linija trostruko negativnog karcinoma dojke (TNBC) (43). Zbog nedostatka ekspresije receptora za estrogen i progesteron i HER2 amplifikacije ova se stanična linija nekoć klasificirala kao bazalna linija raka dojke. Sada se svrstava u molekularni podtip s niskom razinom kladina, i to kladina-3 i 4. Također ima i nisku ekspresiju Ki-67 markera proliferacije, a izraženi su markeri povezani s epitelno-mezenhimalnom tranzicijom i značajkama povezanim s matičnim stanicama raka dojke (CSC) kao što je CD44+CD24- fenotip (44). Unutar TNBC staničnih linija postoje različite podpopulacije stanica, kao što su već spomenute CD44+CD24- stanice karakterizirane mezenhimalnim fenotipom i one predstavljaju matične stanice raka dojke (CSC), a CD44-CD24+ stanice su uglavnom prisutne u udaljenim metastazama i izražavaju epitelni fenotip (45). Zbog različitih signalnih putova u populacijama epitelnih i matičnih mezenhimalnih stanica raka, one različito reagiraju na različite terapije, stoga se dvostruka inhibicija čini bitnom za učinkovito liječenje TNBC-a (46). Općenito u trodimenzionalnoj kulturi, ova stanična linija prikazuje morfologiju sličnu endotelu i odlikuje se svojim invazivnim fenotipom i zvjezdastim razgranjenjem koje često premošćuje više staničnih kolonija (47).

Stanice su uzgajane u ovlaženom inkubatoru na 37°C uz 5% CO₂, u Dulbeccoovom modificiranom mediju Eagle (DMEM, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka). Medij se sastoji od 10% fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS) koji sadržava sve potrebne hranjive tvari za rast stanica (EuroClone, Milano, Italija) i 1% antibiotika (EuroClone) za prevenciju infekcije stanične kulture.

Probirom na osnovu računalnog modeliranja metodom vHTS (engl. *virtual high throughput screen*), otkrivena je skupina tieno[2,3-*b*]piridina kojima je ciljani enzim fosfoinozimid specifična fosfolipaza C- γ 2. Kako tieno[2,3-*b*]piridin modulira više različitih procesa vezanih uz biologiju tumora, otkriveno je da su ovi inhibitori djelotvorni na mnogim malignim staničnim linijama (41).

Tienopiridin je hidrofobna molekula pa je 1 mM koncentracija pripremljena otapanjem u dimetil sulfoksidu (DMSO-u, engl. *dimethyl sulfoxide*), a daljnje razrjeđivanje provedeno je u fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatom (PBS-u, engl. *phosphate buffered saline*).



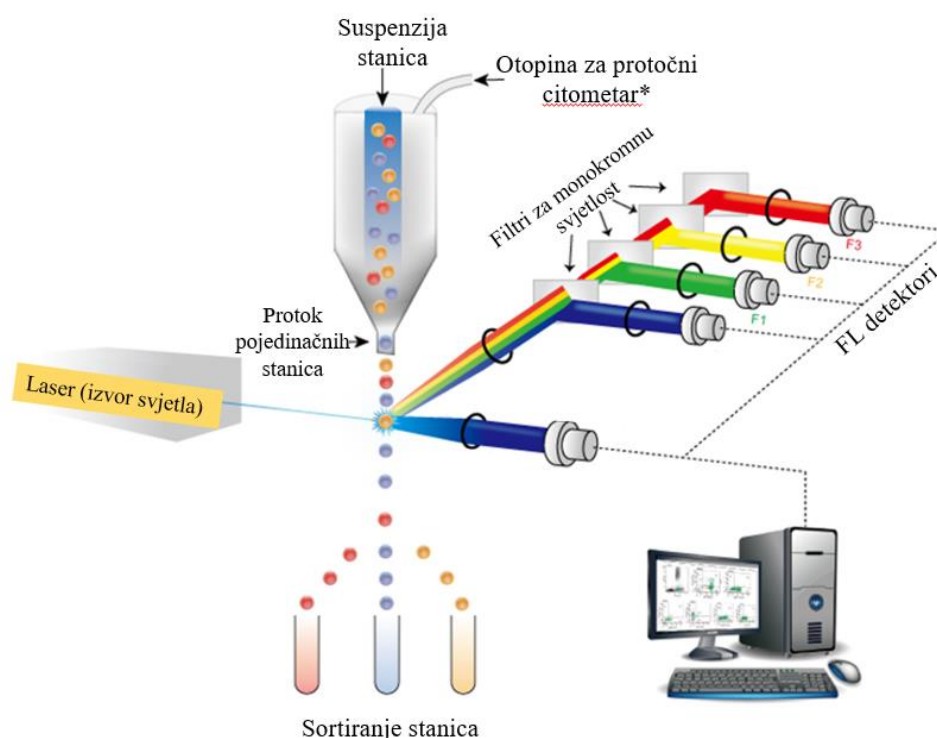
Slika 8. Molekularna struktura antitumorskog spoja 1, derivata tienol[2,3-*b*]piridina, 3-amino *N*-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamida.

3.2. Protočna citometrija

Protočna citometrija (engl. *flow cytometry*) je široko korištena metoda za analizu fizikalnih i kemijskih osobina stanica ili bioloških čestica tijekom njihovog prolaska u tekućoj suspenziji kroz mjerni uređaj (48). Ova tehnika omogućuje višeparametarsku analizu pojedinačnih stanica. Tako se njome mogu izdvajati i definirati različiti tipovi stanica u heterogenoj populaciji stanica, procijeniti čistoća izoliranih subpopulacija i analizirati veličina i volumen stanica. Uglavnom se koristi za mjerenje intenziteta fluorescencije nastale od antitijela obilježenih fluorokromomima koji su vezani na specifične molekule na proteinima ili ligandima na stanici (49).

Suspenzija pojedinačnih stanica inkubiranih s antitijelima obilježenima fluorokromomima se pripremi u zasebnim epruветama te se uvodi u sustav za protok stanica na protočnom citometru. Stanice iz epruветe uvode se u struju tekućine i protječu pojedinačno dok ih laserska zraka osvjetljava. Osim lasera, optički sustav protočnog citometra sastoji se i od leća koje fokusiraju i oblikuju lasersku zraku i fotodetektora koji prikuplja svjetlosne signale. Nakon što laserska zraka obasja stanicu, dolazi do raspršenja svjetlosti (čime se dobiju informacije o veličini i unutrašnjoj strukturi stanice) i emitira se fluorescencija. FL-detektori

hvataju fluorescentne signale, te za pojedine uže intervale valnih duljina postoje posebni detektori. Protočni citometar ima najmanje 4 detektora (FL1-FL4), za 4 različite boje kovalentno vezane za 4 različita antitijela. FSC-detektor (eng. forward scatter) otkriva raspršenje svjetla difrakcijom (koja je razmjerna veličini stanice), a SSC-detektor (engl. side scatter) mjeri stupanj kompleksnost unutarnjih struktura stanice (staničnih organela) i nebojenih stanica. Kao rezultat, fotodetektori pretvaraju pulseve fotona u elektronske signale koji se dodatno pojačavaju i pretvaraju u digitalni oblik koji se može računalno obrađivati.



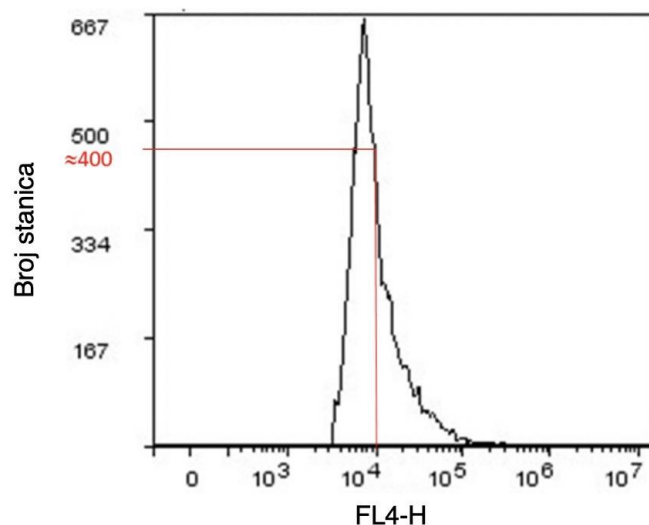
Slika 9. Princip rada protočnog citometra koji ima i funkciju sortiranja stanica ovisno o prisutnom markeru. IZVOR: Mckinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. Current protocols in immunology 2018. doi:10.1002/cpim (50).

3.2.1. Postupak tretiranja stanica i određivanja protočnom citometrijom

Podjednak broj stanica MDA-MB-231 stanične linije nasijan je na ploče sa šest jažica i tretiran s inhibitorom koncentracije 2 μM tijekom 48 sati. Kao i netretirane kontrole, stanice su potom tripsinizirane i isprane s PBS-om. Također, stanice su tretirane i reagensom koji blokira Fc receptor (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka)

kako bi se spriječilo nespecifično vezanje. Nakon 15 minuta inkubacije s anti-CD15s otopljenim u PBS-u (1:3; BD Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA) na sobnoj temperaturi, stanice su inkubirane otopinom s anti-CD44-FITC (1:13; BD Biosciences), anti-CD24-PE (1:3; eBioscience) i sekundarnim antitijelom na anti-CD15 konjugiranim s eFluor 660 fluorokromom (1:10; eBioscience) 15 minuta u mraku, resuspendirane u PBS i nakon toga analizirane protočnom citometrijom. Prikupljanje podataka fluorescencije trostruko obojenih uzoraka izvedeno je na citometru BD Accuri C6 (BD Biosciences) i analizirano pomoću softvera FlowLogic.

Geometrijski srednji intenzitet fluorescencije, GMI (engl. *geometric mean fluorescence intensit*) izračunat je u FlowLogic-u iz broja stanica u odnosu na logaritamsku vrijednost fluorescencije u FL4 dobivenu protočnim citometrom, sa standardnim optičkim filtrom od 675/25 nm (Slika 10). Valna duljina emisijskog vala imuno-fluorescencije eFluor 660, fluorokroma koji je konjugiran sa sekundarnim antitijelima protiv CD15s, iznosi 660 nm.



Slika 10. Strategija izračuna geometrijski srednje intenziteta fluorescencije (GMI). Napomena: Intenzitet fluorescencije od 10 000 ima otprilike 400 stanica. GMI se dobiva množenjem broja stanica s pripadajućim fluorescencijama, zbrajanjem svih rezultata i dijeljenjem ukupnog zbroja s ukupnim brojem stanica.

3.3 Statistička analiza

Za statističku analizu korišten je program GraphPad Prism 7.0 (San Diego, CA, USA) u kojemu su analizirani podaci dobiveni protočnom citometrijom. S obzirom na to da su uspoređivane dvije skupine, tretirane i kontrolna, provedena je analiza Studentovim t-testom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost eksperimenta izvedenog u triplikatu \pm standardna devijacija. Statistička značajnost postavljena je na $P=0,05$.

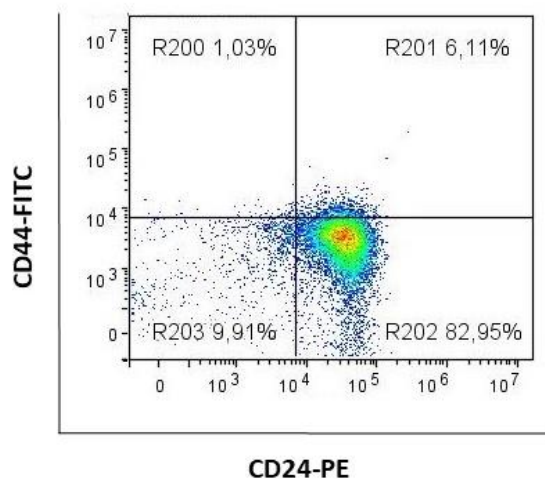
4. REZULTATI

S ciljem određivanja utjecaja tienopiridinskog derivata (spoja 1) na izražaj CD15s mezenhimalnih i epitelnih stanica tumora dojke, uspoređeni su rezultati dobiveni protočnom citometrijom tretiranih i netretiranih stanica spojem 1.

Izražaj CD15s i CD44 po stanici predstavljen je geometrijskim srednjim intenzitetom fluorescencije fluorkroma eFluor 660, odnosno FITC-a, fluorescein izocijanata. Postotak stanica koje su CD15+ je interesantan parametar, ali ima manje značenje u usporedbi s GMI. U slučaju CD15s, GMI odražava količinu, odnosno aktivnost različitih glikozil transferaza uključenih u sintezu CD15.

4.1. Određivanje različitih staničnih subpopulacija

Ovisno o izražaju CD44 i CD24, određene su granice i time definirane različite subpopulacije stanične linije MDA-MB-231 (Slika 11.). Protutijelo na CD44 konjugirano je s kromogenom FITC (BD Biosciences), a protutijelo na CD24 je konjugirano s kromogenom PE (eBioscience).

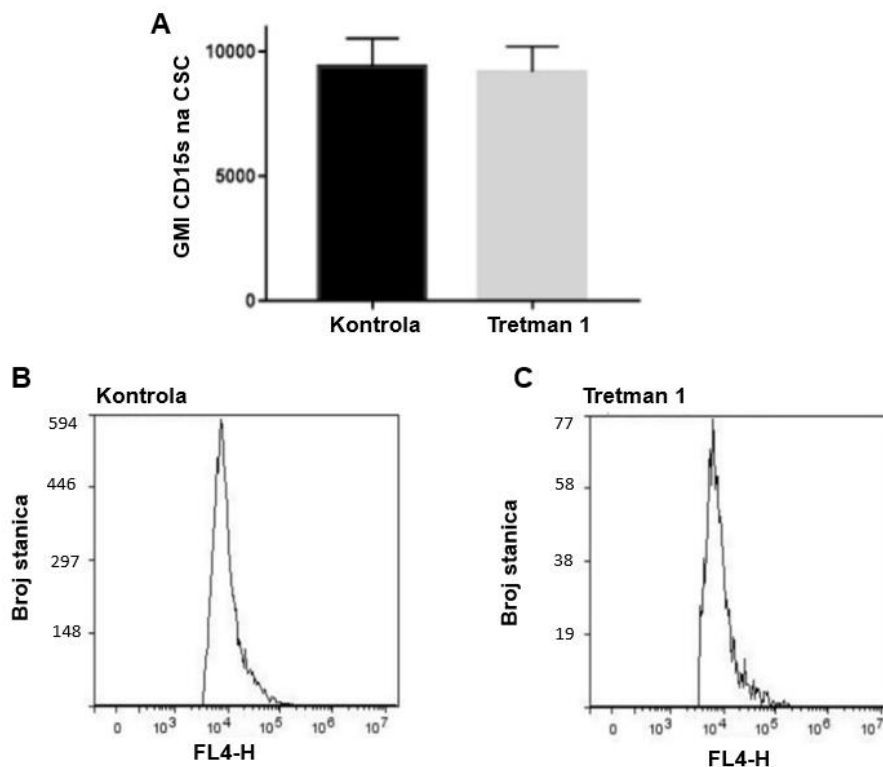


Slika 11. Strategija određivanja granica. Napomene: Reprezentativni grafički (točkasti) prikaz određivanja granica za populacije mezenhimalnih, CSC ili CD44+CD24- (vrata R202) i epitelnih, CD44- stanica (CD44-CD24+ i CD44-CD24-, vrata R200 i R203).

Granice za CSC stanice (CD44+CD24-) su postavljene na točkastom dijagramu (engl. *dot plot*) na osnovu mjerenja stanica obojanih samo anti-CD44, samo anti-CD24 te mjerenjem signala neobojenih stanica.

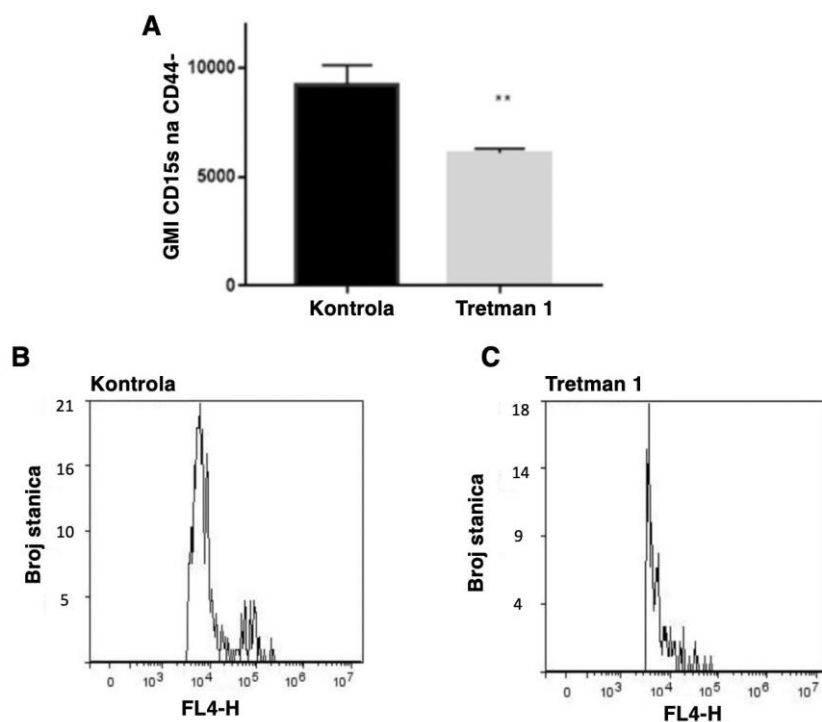
4.2. Izražaj CD15s u mezenhimalnim (CSC) i epitelnim (CD44-) subpopulacijama prije i nakon tretmana spojem 1

Tretman spojem 1 nije utjecao na ekspresiju CD15s u CSC. GMI vrijednost nakon tretmana bila je 9212 ± 1006 naspram 9396 ± 1138 u kontrolnoj skupini. Izračunata P vrijednost Studentovim t-testom bila je $P=0,844$ (Slika 12A).



Slika 12. Statistički histogrami za izražaj (GMI) CD15s na mezenhimalnim stanicama (A), procjena Studentovim t-testom nije rezultirala statistički značajnom razlikom. Pripadajuće imunofluorescencije sekundarnih antitijela na anti-CD15 u kontrolnoj skupini (B) i stanicama tretiranim spojem 1 (C). Napomene: Sekundarno antitijelo bilo je konjugirano s fluorokromom eFluor 660. Fluorescencije su izmjerene u FL4 kanalu protočnog citometra za CD15s+ CSC.

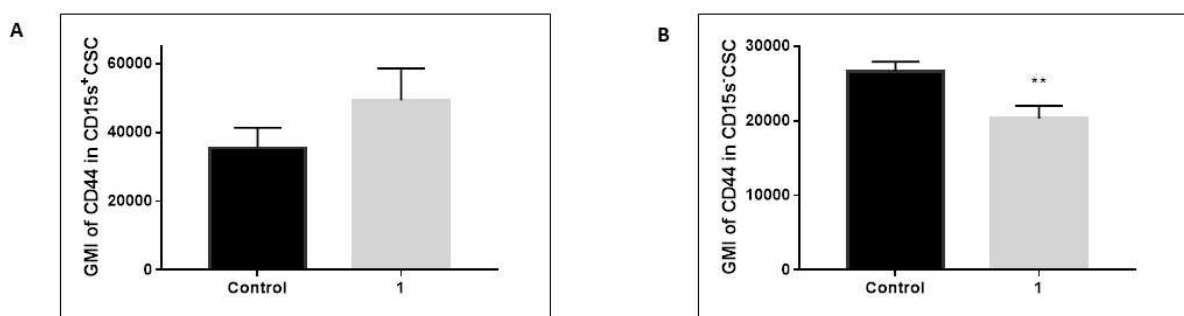
Za razliku od CSC subpopulacije, ovaj je tretman rezultirao gotovo dvostrukim smanjenjem izražaja CD15s u subpopulaciji CD44-. GMI vrijednost nakon tretmana bila je 6090 ± 191 naspram 9220 ± 899 u kontrolnoj skupini. Izračunata P vrijednost Studentovim t-testom bila je $P=0,004$ (slika 13).



Slika 13. Statistički histogrami za izražaj (GMI) CD15s na epitelnim stanicama (CD44-). Procjena Studentovim t-testom rezultirala je statistički značajnom razlikom, (** $P < 0,01$) (A). Pripadajuće imunofluorescencije sekundarnih antitijela na anti-CD15 u kontrolnoj skupini (B) i stanicama tretiranim spojem 1 (C). Napomene: Sekundarno antitijelo bilo je konjugirano s fluorokromom eFluor 660. Fluorescencije su izmjerene u FL4 kanalu protočnog citometra za CD15s+ CD44-.

4.3. Ekspresija CD44 u mezenhimalnim CSC pozitivnim i negativnim za CD15 nakon tretmana spojem 1

Tretman spojem 1 nije utjecao na ekspresiju CD44 u CD15s+ CSC (slika 14A), naime iako je došlo do povećanja GMI s 35453 ± 5850 na 49311 ± 9249 ono nije bilo statistički značajno (P-vrijednost=0,093, slika 14A). Međutim, ekspresija CD44 u CD15s-CSC značajno je snižena djelovanjem spoja 1 s 26569 ± 1340 na 20277 ± 1747 (P-vrijednost=0.008) (slika 14B).



Slika 14. Statistički histogrami za izražaj CD44 u CD15s+ CSC (A) i CD15s-CSC (B) nakon tretmana spojem 1. Procjena Studentovim t-testom rezultirala je statistički značajnom razlikom (**P<0,01).

5. RASPRAVA

Najnovija istraživanja su pokazala da ciljanje mezenhimalnih (matičnih stanica raka) nije dovoljno učinkovito kod liječenja TNBC-a (46). Zbog različitih signalnih putova u subpopulacijama epitelnih i matičnih mezenhimalnih stanica raka, one različito reagiraju na različite terapije. Stoga je posebno vrijedno istražiti inhibitore koji bi potencijalno ciljali obje subpopulacije. Leung i suradnici (51) opisali su značajne promjene morfologije i migracije stanica stanične linije MDA-MB-231 nakon tretmana spojem 1. U ovoj studiji analizirane su adhezijske molekule CD15s i CD44, koje inače posreduju transmigraciju, u različitim subpopulacijama trostruko negativnog karcinoma dojke. Tumorske matične stanice, tj. mezenhimalne stanice (CD44+CD24-) i epitelne stanice (CD44-) razlikuju se u načinu na koji je CD15s postavljen u plazmatskoj membrani. Kako matične stanice sadržavaju CD44, očekivano je da se na njima CD15s nalazi u obliku glikoproteina (38). Za razliku od matičnih stanica, izražaj CD15s na epitelnim stanicama (CD44-) se pripisuje glikosfingolipidnom CD15s (36).

Opisano je da CD15s može biti sastavni dio CD44, odnosno ogranak na molekuli, koji ima funkciju selektinskog liganda. Iako su O-glikozilirane, sijalofukozilirane izoforme CD44v prevladavajući ligandi E-selektina ekspimirani na stanicama karcinoma debelog crijeva, pokazano je da je u hematopoetskim stanicama aktivnost liganda selektina CD44 primarno povezana s N-glikoziliranom, sijalofukoziliranom izoformom CD44. Kvantitativni RT-PCR (qRT-PCR) pomoću početnica (engl. *primera*) dizajniranih za specifične izoforme omogućila je usporedbu ekspresije izoformi CD44 na razini mRNA. (52). Kod mezenhimalnih stanica stanične linije MDA-MB-231, CD44s, koji pokazuju ograničenu aktivnost liganda E-selektina, opisani su kao dominantni u usporedbi s CD44v (36), koji je izražen u epitelnoj BT-20 staničnoj liniji karcinoma dojke. Tijekom metastaziranja, tumorske stanice prolaze kroz epitelno-mezenhimalnu tranziciju (53), kao i obrnuti proces, mezenhimalno-epitelnu tranziciju (54). Mezenhimalni stadij je bitan za staničnu invaziju u tkiva za što E-selektinski ligandi nisu neophodni (55). Nasuprot tomu, u epitelnom stadiju su E-selektinski ligandi bitni za adheziju cirkulirajućih tumorskih stanica na vaskularni endotel.

U ovoj studiji se pokazalo da nema razlike u izražaju CD44 i CD15s između tretiranih i netretiranih CSC CD15s+ stanica. Međutim, spoj 1 je smanjio izražaj CD44 kod CD15s- CSC stanica, dok je povećanje izražaja CD44 na CSC CD15s+ stanicama bilo statistički neznačajno. Rezistencija izražaja CD44 kod CD15s+CSC stanica mogla bi biti zbog povećane otpornosti endoplazmatskog retikuluma na tretman spojem 1 u odnosu na CD15s- CSC. Naime, spoj 1 bi mogao inducirati stres ER-a kao što je opisano za

tienopiridinski derivat klopidogrel u želučanim epitelnim stanicama (56). Endoplazmatski retikulum je organela u kojoj se odvija finalna sinteza CD44 glikoproteina (57). Moguća hipoteza je da kod CD15s+ CSC stanica, ER ostaje sačuvan.

Pokazano je kako spoj 1 smanjuje izražaj CD15s kod CD44- stanica, što ukazuje na potencijal ove ili molekule analogne ovoj da se koriste kao nova terapija za trostruko negativni rak dojke.

Tieno [2,3-*b*] piridinske molekule se koriste za moduliranje aktivnosti mnogih molekularnih meta kao što su receptori povezani s G proteinom (58), tirozil DNA fosfodiesteraza 1-a popravljajući enzim DNA (59), mjesto vezanja kolhicina za tubulin (60) fosfolipaza C- δ 1(51), PIM-1 (61) i ciklooksigenaze (62). Zaključno, spoj 1 modulira mnoge procese koji utječu na E-selektinske molekule.

S ciljem onemogućavanja, odnosno smanjivanja metastaziranja karcinoma *in vivo*, moguće je terapijski ciljati aktivnost CD44 kao E-selektinskog liganda. Također, moguće je da bi blokirajući CD44v na stanicama karcinoma dojke, koji je prevladavajuća izoforma na epitelnim stanicama, povećali njihovu mogućnost metastaziranja zbog olakšavanja procesa epitelno-mezenhimalne tranzicije (62,63). Glikosfingolipid CD15s, E-selektinski ligand, eksprimiran na cirkulirajućim tumorskim stanicama je manje osjetljiv na regulaciju epitelno-mezenhimalne tranzicije i time može koristiti kao ključna adhezijska molekula, koja modulira adheziju za vaskularni endotel (64).

Idealno terapijsko sredstvo bi trebalo ciljati heterogene stanice, kako epitelne i mezenhimalne, tako i hibridne CD44+/CD24+ stanice. Osim učinka snižavanja izražaja CD15s na epitelnim stanicama, spoj 1 je opisan nedavno i kao učinkovit u snižavanju broja CD15+ mezenhimalnih i hibridnih stanica te postotka CD15s+ mezenhimalnih stanica (65). U nedavno objavljenom radu su Vikrama i sur. pokazali da visoka tumorigenost stanične linije MDA-MB-231 nije CD44 ovisna (66). CD44+CD24- i CD44-CD24- subpopulacije imaju sličnu metastatsku učinkovitost. Ovim eksperimentom je pokazano da spoj 1 smanjuje izražaj CD15s kod CD44- stanica i da bi sam spoj 1 ili njegovi analozi mogli biti potencijalno nova terapija za trostruko negativni rak dojke. Pokazano je da su epitelne i mezenhimalne CSC stanice prostorno razdvojene u *in vivo* raku dojke (67) i da bi tumorski mikrookoliš mogao biti ključan za preživljenje tumora. U budućnosti su potrebna *in vivo* istraživanja, kojima bi se na osnovu aktivnosti glikozidaza i glikoziltransferaza mogao dobiti detaljniji uvid u mehanizam djelovanja tienopiridinskog derivata i u njegovu učinkovitost kod životinjskih modela trostruko negativnog raka dojke.

Limitacija ove studije, kao i većine objavljenih istraživanja iz ovog područja, je u neprovođenju ekstrakcije i pročišćavanja gliksfingolipidnog CD15s iz tumorskih stanica. To bi zahtijevalo uzgoj najmanje deseterostruko veće količine stanica, provođenje ekstrakcije gliksfingolipidnog CD15s kloroformom i metanolom, vakuum uparivanje pri 37 °C, alkalne hidrolize lipida, dijalize za uklanjanje hidrolizom oslobođenih molekula, smrzavanje i liofilizaciju uzoraka (uz vakuum, pri 37 °C, s ciljem uklanjanja vode) te konačno imunobojenje tankoslojnog kromatograma visokog razlučivanja. Dosad nije objavljen sveobuhvatni znanstveni rad koji bi do kraja precizno opisao izražaj glikosfinolipidnog CD15s na pojedinim subpopulacijama stanica karcinoma dojke. Takvo istraživanje nužno bi zahtijevalo prethodno sortiranje stanica na osnovu izražaja CD44 i CD24 pomoću naprednijeg protočnog citometra (sortera) u odnosu na citometar Accuri C6, korišten u ovoj studiji.

6. ZAKLJUČCI

1. Tienopiridinski derivat je u subpopulaciji epitelnih stanica karcinoma dojke uzrokovao gotovo dvostruko smanjenje izražaja CD15s, ali nije utjecao na izražaj CD15s u subpopulaciji mezenhimalnih stanicama karcinoma dojke
2. Primjena tienopiridinskog derivata nije utjecala na izražaj CD44 na mezenhimalnim (CSC) CD15s+, ali je smanjila izražaj CD44 na mezenhimalnim CD15s- stanicama karcinoma dojke.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Marin N. Patologija. 5. izdanje. Medicinska naklada; 2018. 149-77 str.
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak Republike Hrvatske [Internet]. Incidencija raka u Hrvatskoj; 2018. [citirano 3. lipnja 2021.]. Dostupno na <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/>
3. Šekerija M, Alfirević M, Fabijanić U, Rajačić N, Antoljak N. Epidemiology of cancer in Croatia - Recent insights and international comparisons. Libri Oncologici. 2019; 84-90.
4. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Klinička onkologija. 3. izdanje. Medicinska naklada; 2018. str. 4-14.
5. Watt FM, Hogan BL. Out of eden: Stem cells and their niches. Science. 2000; 287:1427-30.
6. Nguyen L V., Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: An evolving concept. Nat Rev Cancer. 2012;12:133-43.
7. Kreso A, O'Brien CA, Van Galen P, Gan OI, Notta F, Brown AMK i sur. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. Science. 2013;339:543-8.
8. Moore MAS, Williams N, Metcalf D. In vitro colony formation by normal and leukemic human hematopoietic cells: Characterization of the colony-forming cells. J Natl Cancer Inst. 1973;50:603-23.
9. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: An old idea - A paradigm shift. Cancer Res. 2006;66:1883-90.
10. Ciurea ME, Georgescu AM, Purcaru SO, Artene SA, Emami GH, Boldeanu MV i sur. Cancer stem cells: Biological functions and therapeutically targeting. Int. J. Mol. Sci. 2014; 15:8169-8185.
11. Schulenburg A, Blatt K, Cerny-Reiterer S, Sadovnik I, Herrmann H, Marian B i sur. Cancer stem cells in basic science and in translational oncology: Can we translate into clinical application? J. Hematol. Oncol. 2015; 25:8-16.

12. Dedić Plavetić N, Kulić A, Vrbanec D. Role of HER2 signaling pathway in breast cancer: biology, detection and therapeutical implications. *Periodicum biologorum*. 2012;114:505-10.
13. Khaldoyanidi S. Directing Stem Cell Homing. *Cell Stem Cell*. 2008; 3:198-200.
14. Jiang W, Peng J, Zhang Y, Cho WCS, Jin K. The implications of cancer stem cells for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci*. 2012; 13:16636-1665.
15. Dawood S, Austin L, Cristofanilli M. Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology (Williston Park)*. 2014;28:1101-7.
16. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:394-424.
17. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011;22:1736-47.
18. van de Vijver MJ, He YD, van 't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW i sur. A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2002;347:1999-2009.
19. Huang S, Murphy L, Xu W. Genes and functions from breast cancer signatures. *BMC Cancer*. 2018;18:1-15.
20. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B i sur. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24:2206-23.
21. Hashmi AA, Aijaz S, Khan SM, Mahboob R, Irfan M, Zafar NI i sur. Prognostic parameters of luminal A and luminal B intrinsic breast cancer subtypes of Pakistani patients. *World J Surg Oncol*. 2018;16:1.
22. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J i sur. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*.

- 2009;101:736-50.
23. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P i sur. Breast cancer. *Nat Rev Dis Prim.* 2019;5:66.
 24. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L i sur. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis.* 2018;5:77-106.
 25. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv. Anat Pathol.* 2020;27:27-35.
 26. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2016;293:247-69.
 27. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y i sur. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011;121:2750-67.
 28. Russnes HG, Lingjærde OC, Børresen-Dale AL, Caldas C. Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. *Am J Clin Pathol.* 2017;187:2152-62.
 29. Lee YM, Oh MH, Go JH, Han K, Choi SY. Molecular subtypes of triple-negative breast cancer: understanding of subtype categories and clinical implication. *Genes Dis.* 2020;42:1381-7.
 30. De Vries T, Knegtel RMA, Holmes EH, Macher BA. Fucosyltransferases: Structure/function studies. *Glycobiology.* 2001;11:119-28.
 31. Jin F, Wang F. The physiological and pathological roles and applications of sialyl Lewis x, a common carbohydrate ligand of the three selectins. *Glycoconj J.* 2020;37:277-91.
 32. Trinchera M, Aronica A, Dall'Olio F. Selectin ligands Sialyl-Lewis a and Sialyl-Lewis x in gastrointestinal cancers. *Biology.* 2017;6:16.
 33. Pang PC, Chiu PCN, Lee CL, Chang LY, Panico M, Morris HR i sur. Human sperm binding is mediated by the sialyl-lewisx Oligosaccharide on the zona pellucida. *Science.* 2011;333:1761-4.

34. Liang JX, Liang Y, Gao W. Clinicopathological and prognostic significance of sialyl Lewis X overexpression in patients with cancer: A meta-analysis. *Onco Targets Ther.* 2016;9:3113-25.
35. Konstantopoulos K, Thomas SN. Cancer cells in transit: The vascular interactions of tumor cells. *Annu Rev Biomed Eng.* 2009;11:1,177-202.
36. Shirure VS, Henson KA, Schnaar RL, Nimrichter L, Burdick MM. Gangliosides expressed on breast cancer cells are E-selectin ligands. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;406:423-9.
37. Zen K, Cui LB, Zhang CY, Liu Y. Critical Role of Mac-1 Sialyl Lewis X Moieties in Regulating Neutrophil Degranulation and Transmigration. *J Mol Biol.* 2007;374:54-63.
38. Zen K, Liu DQ, Guo YL, Wang C, Shan J, Fang M i sur. CD44v4 is a major E-selectin ligand that mediates breast cancer cell transendothelial migration. *PLoS One.* 2008;3:e1826.
39. Pevet I, Brulé C, Tizot A, Gohier A, Cruzalegui F, Boutin JA i sur. Synthesis and pharmacological evaluation of thieno[2,3-b]pyridine derivatives as novel c-Src inhibitors. *Bioorganic Med Chem.* 2011;19:2517-28.
40. Alinaghizadeh F, Zahedifar M, Seifi M, Sheibani H. Cascade synthesis of thieno[2,3-b]pyridines by using intramolecular cyclization reactions of 3-cyano-2-(organylmethylthio)pyridines. *J Braz Chem Soc.* 2016;27:663-9.
41. Reynisson J, Jaiswal JK, Barker D, D'mello SAN, Denny WA, Baguley BC i sur. Evidence that phospholipase C is involved in the antitumour action of NSC768313, a new thieno[2,3-b]pyridine derivative. *Cancer Cell Int.* 2016;16:1-9.
42. Cailleau R, Olivé M, Cruciger QVJ. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization. *In Vitro.* 1978;14:911-5.
43. Chavez KJ, Garimella S V., Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis.* 2010;32:35-48.
44. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2011;13:215.

45. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16:876-87.
46. Sulaiman A, McGarry S, Han X, Liu S, Wang L. CSCs in breast cancer—one size does not fit all: Therapeutic advances in targeting heterogeneous epithelial and mesenchymal CSCs. *Cancers (Basel).* 2019;11:1128.
47. Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT i sur. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol.* 2007;1:84-96.
48. Labar B, Hauptmann E. *Hematologija.* 4. izdanje. Školska knjiga; 2007. str. 320-25.
49. Abcam. Flow cytometry introduction. [Internet]; 2019 [Citirano 7. lipnja 2021.]. Dostupno na: <https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>
50. Mckinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology* 2018. doi:10.1002/cpim.40.
51. Leung E, Hung JM, Barker D, Reynisson J. The effect of a thieno[2,3-b]pyridine PLC- γ inhibitor on the proliferation, morphology, migration and cell cycle of breast cancer cells. *Med Chem Commun.* 2014;5:99-106.
52. Takeo K, Kawai T, Nishida K, Masuda K, Teshima-Kondo S, Tanahashi T i sur. Oxidative stress-induced alternative splicing of transformer 2 β (SFRS10) and CD44 pre-mRNAs in gastric epithelial cells. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2009;297:C330-8.
53. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY i sur. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell.* 2008;133:704-15.
54. Liu S, Clouthier SG, Wicha MS. Role of microRNAs in the regulation of breast cancer stem cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. J Mammary Gland Biol Neoplasia;* 2012;17:15-21.
55. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation. J Clin Invest.* 2009;119:1420-8.

56. Wu HL, Duan ZT, Jiang ZD, Cao WJ, Wang ZB, Hu KW i sur. Increased Endoplasmic Reticulum Stress Response Is Involved in Clopidogrel-Induced Apoptosis of Gastric Epithelial Cells. *PLoS One*. 2013;8:e74381.
57. Nami B, Donmez H, Kocak N. Tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress reduces in vitro subpopulation and invasion of CD44+/CD24- phenotype breast cancer stem cells. *Exp Toxicol Pathol*. 2016;68:419-26.
58. Zafar A, Sari S, Leung E, Pilkington LI, Van Rensburg M, Barker D i sur. GPCR modulation of thieno[2, 3-b]pyridine anti-proliferative agents. *Molecules*. 2017;22:2254.
59. Arabshahi HJ, Van Rensburg M, Pilkington LI, Jeon CY, Song M, Gridel LM i sur. A synthesis, in silico, in vitro and in vivo study of thieno[2,3-b]pyridine anticancer analogues. *Med Chem Commun*. 2015;6:1987-97.
60. Eurtivong C, Semenov V, Semenova M, Konyushkin L, Atamanenko O, Reynisson J i sur. 3-Amino-thieno[2,3-b]pyridines as microtubule-destabilising agents: Molecular modelling and biological evaluation in the sea urchin embryo and human cancer cells. *Bioorganic Med Chem*. 2017;25:658-64.
61. Naguib BH, El-Nassan HB. Synthesis of new thieno[2,3-b]pyridine derivatives as pim-1 inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;3:1718-25.
62. Sanad SMH, Mekky AEM. Novel Nicotinonitriles and Thieno[2,3-b]pyridines as Potent Biofilm and COX-2 Inhibitors: Synthesis, In Vitro and In Silico Studies. *ChemistrySelect*. 2020;5:8494-503.
63. Dallas MR, Liu G, Chen W, Thomas SN, Wirtz D, Huso DL i sur. Divergent roles of CD44 and carcinoembryonic antigen in colon cancer metastasis. *FASEB J*. 2012;26:2648-56.
64. Shirure VS, Liu T, Delgadillo LF, Cuckler CM, Tees DFJ, Benencia F i sur. CD44 variant isoforms expressed by breast cancer cells are functional E-selectin ligands under flow conditions. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2015;308:68-78.
65. Marijan S, Mastelić A, Markotić A, Režić-Mužinić N, Vučenović N, Barker D i sur. Thieno[2,3-b]Pyridine Derivative Targets Epithelial, Mesenchymal and Hybrid CD15s+ Breast Cancer Cells. *Medicines*. 2021;8:32.
66. Vikram R, Chou WC, Hung SC, Shen CY. Tumorigenic and metastatic role of

cd44⁻/low/cd24⁻/low cells in luminal breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12:1239.

67. Bocci F, Gearhart-Serna L, Boareto M, Ribeiro M, Ben-Jacob E, Devi GR i sur. Toward understanding cancer stem cell heterogeneity in the tumor microenvironment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116:148-57.

8. SAŽETAK

CILJEVI ISTRAŽIVANJA: Ciljevi ovog istraživanja bili su odrediti izražaj CD15s na epitelnim (CD44-CD24+ i CD44-CD24-) i mezenhimalnim (CD44+CD24- tj. CSC) stanicama MDA-MB-231 stanične linije trostruko negativnog karcinoma dojke te odrediti izražaj CD44 kod CSC CD15s+ i CSC CD15s- stanica nakon primjene tienopiridinskog derivata.

MATERIJALI I METODE: Novosintetizirani tienopiridinski derivat, 3-amino-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno [2,3-*b*] kinolin-2-karboksamid, primijenjen je u 2 μM koncentraciji u trajanju od 48 sati na MDA-MB-231 staničnoj liniji. Potom su stanice imunobojene s anti-CD15s odnosno sekundarnim antitijelom na anti-CD15s konjugiranim s eFluor 660 fluorokromom, s anti-CD44-FITC i anti-CD24-PE te je fluorescencija pojedinih kromogena konačno mjerena protočnim citometrom.

REZULTATI: U izražaju CD15s u CSC subpopulaciji nije bilo značajne razlike prije i nakon tretmana tienopiridinskim derivatom. Za razliku od CSC subpopulacije, ovaj je tretman rezultirao gotovo dvostrukim smanjenjem izražaja CD15s u subpopulaciji CD44- ($P=0,004$). Tretman nije utjecao na ekspresiju CD44 u CD15s+ CSC, ali je smanjio izražaj CD44 ($P=0,008$) u CD15s-CSC.

ZAKLJUČAK: Nalazi sniženog izražaja CD15s kod epitelnih stanica i CD44 kod CD15-mezenhimalnih stanica ukazuju na potencijal novosintetiziranog tienopiridinskog derivata kao terapijskog sredstva za trostruko negativni rak dojke.

9. SUMMARY

Objectives: The aims of this study were to analyse the expression of CD15s in epithelial (CD44-CD24+) and mesenchymal (CD44+CD24-, CSC) cells in MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell line and to measure expression of CD44 in CSC CD15s+ and CSC CD15s- cells after being treated with thieno[2,3-b]pyridine derivative.

Materials and methods: Newly synthesized thieno[2,3-b]pyridine derivative of 3-amino-*N*-(3-chloro-2-methylphenyl)-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-*b*]quinoline-2-carboxamide was used in 2 μ M concentration for 48 hours on MDA-MB-231 cell line. Thereafter, the cells were stained with anti-CD15s secondary antibody conjugated with eFluor 660 on CD15s fluorochrome, anti-CD44-FITC, anti-CD24-PE, and then chromogen fluorescence was analyzed by flow cytometry.

Results: There was no difference in expression of CD15s in CSC subpopulation before and after treatment with thieno[2,3-b]pyridine derivative. Unlike CSC subpopulation, this treatment has resulted in almost two times reduction of CD15 expression in CD44- subpopulation ($P=0.004$). The treatment didn't have any influence on the expression of CD44 in CD15s+CSC but it had reduced expression of CD44 ($P=0.008$) in CD15-CSC.

Conclusion: The finding of reduced expression of CD15s in epithelial cells and CD44- within mesenchymal cells show the potential of newly synthesized thieno[2,3-b]pyridine derivative as a potential treatment option for triple-negative breast cancer.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Nikolina Vučenović
Datum i mjesto rođenja: 06.12.1996., Šibenik, Republika Hrvatska
Državljanstvo: Hrvatsko
Adresa stanovanja: Kornatska ulica 27, Šibenik
E-mail: nikolina.vucenovic@gmail.com

Obrazovanje:

2015.-2021. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

2011. -2015. Gimnazija Antuna Vrančića, prirodoslovno-matematički smjer, Šibenik

2005.-2013. Glazbena škola Ivana Lukačića

2003.-2011. Osnovna škola Jurja Dalmatinca, Šibenik

2018.-2019. demonstrator na Katedri za kliničku mikrobiologiju i parazitologiju

Član studentske udruge CroMSIC pri kojoj sam sudjelovala u mnoštvo akcija i radionica kao što su „Think pink“, „Tjedan mentalnog zdravlja“, Akcija mjerenja tlaka i šećera, Teddy bear bolnica, projekt student-mentor, itd.

2015., 2016. i 2017. sudjelovala u organizaciji „Natjecanje u kliničkoj suradnji studenata farmacije i medicine“

Stipendistica stipendije grada Šibenika po kriteriju uspjeha u prethodnom obrazovanju- 5 godina studija

PUBLIKACIJE:

Tema ovog diplomskog rada sadržana je u znanstvenom radu: Marijan S, Mastelić A, Markotić A, Režić-Mužinić N, Vučenović N, Barker D, et al. Thieno[2,3-b]Pyridine Derivative Targets Epithelial, Mesenchymal and Hybrid CD15s+ Breast Cancer Cells. Medicines. 2021;8(7):32.