

ЕКСПРЕСИЯ НА МАРКЕРИТЕ ЗА АПОПТОЗА И НЕКРОПТОЗА КАСПАЗА-3 И ВЗАИМОДЕЙСТВАЩА С РЕЦЕПТОРА ПРОТЕИН КИНАЗА-3 ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕНИ НЕОПЛАЗМИ

Пламен Василев¹, Илко Бакърджиев²

¹Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология, Факултет по медицина, Медицински университет – Варна

²Медицински колеж, Медицински университет – Варна

EXPRESSION OF THE APOPTOSIS AND NECROPTOSIS MARKERS CASPASE-3 AND RECEPTOR-INTERACTING PROTEIN KINASE-3 IN MALIGNANT NEOPLASMS

Plamen Vasilev¹, Ilko Bakardzhiev²

¹Department of General and Clinical Pathology, Forensic Medicine and Deontology, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

²Medical College, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Известни са редица видове клетъчна смърт, но апоптозата и некроптозата продължават да са обект на задълбочени научни проучвания. Двете форми на клетъчна смърт са програмирани и съществуват редица доказателства, които подкрепят ролята им при възникване и прогресия на редица заболявания с различна етиология, включително и при неоплазми. Анализът на сложните сигнални пътища, чрез които туморните клетки успяват да избягат и потиснат двете форми на клетъчна смърт, е от съществено значение за създаването на нови противотуморни лекарствени препарати. Апоптозата се активира чрез външен и вътрешен сигнален път и се осъществява чрез активиране на цистеиновите протеази, известни още като каспази. Централна роля в апоптотичната некротична смърт играе каспаза 3. Некроптозата, която обединява морфологични характеристики на некрозата и някои от молекулярните регулаторни механизми на апоптозата, се медира от рецептор-взаимодействащите протеин кинази (RIP), като RIP3 има главно значение за формирането на комплекса, наречен некрозома, където чрез конформационни промени и каскадно фосфорилиране се повлиява пермеабилитетът на клетъчната мембрана. Съвременните терапевтични стратегии се базират на медикаментозно повлияване на участващи в сигналните пътища на

ABSTRACT

Although there is a lot of evidence about different types of cell death, apoptosis and necroptosis continue to be the subject of extensive scientific research. Both forms of cell death are programmed, and there is evidence that supports their role in the onset and progression of a number of diseases of different etiologies, including neoplasms. Analysis of the complex signaling pathways through which tumor cells manage to avoid and suppress both forms of cell death is essential for the development of new antitumor drugs. Apoptosis is activated by extrinsic and intrinsic signaling pathways and occurs through the activation of cysteine proteases, also known as caspases. Caspase 3 plays a central role in apoptotic necrotic death. Necroptosis, which combines the morphological features of necrosis with some of the molecular regulatory mechanisms of apoptosis, is mediated by receptor-interacting protein kinases (RIP), with RIP3 having a major role in the formation of the complex called the necrosome, where the permeability of the cell membrane is affected by conformational changes and cascade phosphorylation. Modern therapeutic strategies are based on drug-influencing molecules involved in the signaling pathways of both processes and, accordingly, on the subsequent cascade reactions. Malignant tumors have developed mechanisms by which they do not respond to apoptotic stimuli, which causes their uncontrolled growth. The expression of both markers in patients with malignant neoplasms and the accumula-

двата процеса молекули и съответно на последващите каскадни реакции. Малигнените тумори са развили механизми, чрез които не отговарят на апоптотичните стимули, което обуславя техния неконтролируем растеж. Експресията на двата маркера при пациенти с малигнени неоплазми и натрупването на достатъчно научни данни относно способността на неопластичните клетки да избягват програмираната клетъчна смърт е от значение за откриването на нови терапевтични подходи и възможности базирани на стимулирането на некроптоза. В тези случаи обаче някои от туморите еволюционно са развили защитни механизми и срещу некроптозата, което е още по-голямо предизвикателство за детайлно изучаване на двата процеса и експресията на посочените маркери.

Ключови думи: апоптоза, некроптоза, каспази, кинази, малигнени тумори

ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години стана известно, че освен некроза и апоптоза съществуват и редица други форми на клетъчна смърт: автофагия, некроптоза, аноиксис, автоза, ентоична клетъчна смърт, фероптоза, имуногенна клетъчна смърт, лизозомно зависима клетъчна смърт, митохондриално предизвикана некроза, митотична катастрофа, партанатос, пироптоза, регулирана клетъчна смърт и др. Нарушаването на тъканната хомеостаза, предизвикано от външни и/или вътрешни за клетката стимули, до степен несъвместима със съществуването ѝ води до клетъчна смърт (15). Най-манифестният белег както на ранните, така и на късните етапи на апоптозата е активирането на цистеиновите протеази, наречени каспази. Анализът на експресията на каспаза 3 (CASP3) в клетките и тъканите е важен за изясняване механизмите на апоптозата, индуцирана от множество апоптотични сигнали (31). Апоптозата може да се осъществи по т. нар. външен и вътрешен път. Рецепторите и лигандите, които активират външния път на апоптозата, могат да инициират и друга форма на клетъчна смърт - некроптоза (7,15,17). Тя винаги е свързана с експресията на RIP3 и може да се осъществи независимо от RIP1 (15). RIP3 е ключова сигнална молекула по пътя на некроптозата и този сигнален път играе важна роля при различни физиологични и патологични състояния (48). В процеса на елиминиране и унищожаване на туморните клетки механизмите и пътищата на различни-

tion of sufficient scientific data on the ability of neoplastic cells to avoid programmed cell death are relevant for the discovery of new therapeutic approaches and opportunities based on the stimulation of necroptosis. In these cases, however, some of the tumors have evolutionarily developed protective mechanisms against necroptosis as well, which is an even greater challenge for a detailed study of both processes and the expression of the indicated markers.

Keywords: apoptosis, necroptosis, caspases, kinases, malignant tumors

те видове клетъчна смърт могат да бъдат в сложни взаимодействия.

Каспази. Видове и действие

Каспазите са семейство ендопротеази, секретирани като неактивни цимогени, които получават каталитична активност след поредица от сигнали, стимулиращи агрегирането им в димери или макромолекулни комплекси. Дисрегулацията на тези ендопротеази е в основата на редица заболявания при човек, включително и при тумори. Каспазите, участващи в апоптозата, са групирани в зависимост от техния механизъм на действие на инициращи каспази (каспаза 8 и 9) и езекуторни (ефекторни) каспази (каспаза - 3, 6 и 7). Секретират се като неактивни мономерни прокаспази и за активирането им е необходима димеризация и последващо разцепване. За образуването на димери важна роля имат различни адапторни протеини, които се свързват към специфични области в продомейна на прокаспазата. Точният механизъм на агрегация зависи от конкретния адапторен протеин. Различните каспази имат различни домейни за взаимодействие с адапторните протеини, което им позволява да образуват комплекси с различни адапторни протеини. Например каспази 1, 2, 4, 5 и 9 съдържат CARD (Caspase Activation and Recruitment Domains) домейн, докато каспази 8 и 10 имат домейн на ефектор на смъртта (Death-Effector Domain, DED) (50). Инициращите каспази активират езекуторните каспази, които впоследствие координират своите дейности, за да разрушат ключови структурни протеини и да активи-

рат други ензими. Активирането на екзекуторните каспази 3, 6 и 7 става, като неактивните им прокаспазни димери са разцепени от инициращите каспази. Разделянето на голямата и малката субединици предизвиква конформационни промени и създава функционална активна протеаза (43). В подкрепа на основната екзекуторна роля на каспаза 3 са данни за 906 субстрата, към които е насочено действието ѝ (3).

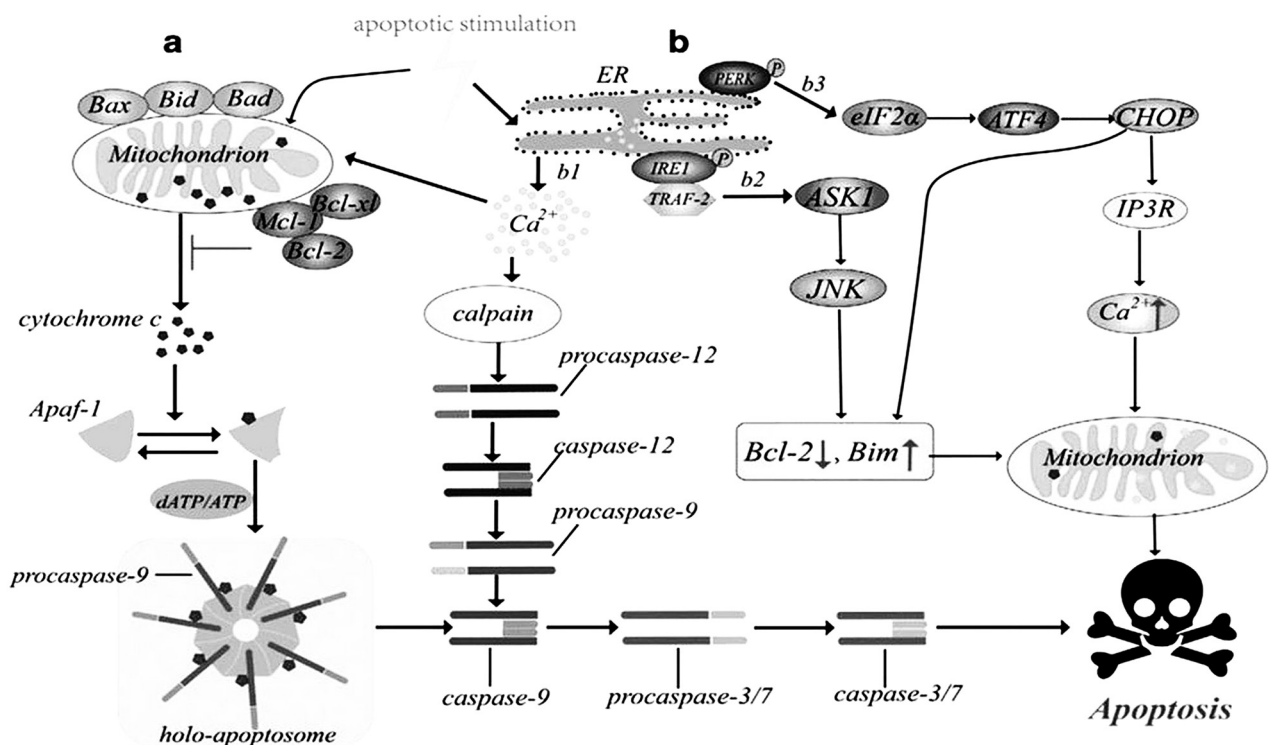
Рецептор взаимодействия протеин кинази

RIP са група треонин серинови протеин кинази с относително общ киназен домейн, но с различни некиназни региони. Различни домейнни структури, като домейни на смъртта и CARD домейн, са открити в различни членове на семейството на RIP и тези домейни са ключови при определянето на специфичната функция на всяка RIP киназа (60). RIP3 е третият идентифициран член на семейството на RIP киназите и се състои от N-терминален киназен домейн, подобно на други RIP кинази, RHIM (RIP homotypic interaction motif) домейн и уникален C-терминален домейн, който се различава от всички известни протеинови домейни. Доказателства за съществената роля на RIP3 в независимата от каспаза некроза са получени при различни научни изследвания. Cho YS et al. (2009) установяват, че RIP1 и RIP3 са сред десетте кинази, необходими за клетъчно програмираната некроза в отго-

вор на лечението с TNF и по време на вирусна инфекция. Киназата RIP3 регулира специфичното за некроза RIP1 фосфорилиране. Фосфорилирането на RIP1 и RIP3 може да стабилизира взаимодействието им в рамките на пронекротичния комплекс, да активира пронекротичната киназна активност и да задейства производството на кислородни радикали надолу по веригата, което да доведе до некротична клетъчна смърт (6). Друга група учени откриват, че RIP1 и RIP3 са ключовите медиатори на TNF-индуцирана некроза в миши фибробласти и човешки клетки, третиран с комбинация от TNF- α , Smac миметик и zVAD. Те съобщават, че при индуциране на некроза RIP3 образува комплекс с RIP1 и настъпва некроза (18).

Апоптоза. Пътища на активиране

Два основни пътя активират апоптозата: външен (extrinsic) и вътрешен (intrinsic), като и при двата се активират Cys (Cysteine) протеазите, наречени каспази, които задействат протеолитична каскада (39). Цитокинови рецептори от фамилията на туморния некротизиращ фактор (Tumor necrosis factor, TNF), като TNFR1 и Fas, активират външния път на апоптозата, като иницират каскадна реакция, водеща до клетъчна смърт посредством участието на каспаза 8, Fas-свързания с домейна на смъртта протеин (FAS-associated death domain protein, FADD), домейна на смъртта (Domain Dead, DD), DED и др. Освобождаване-

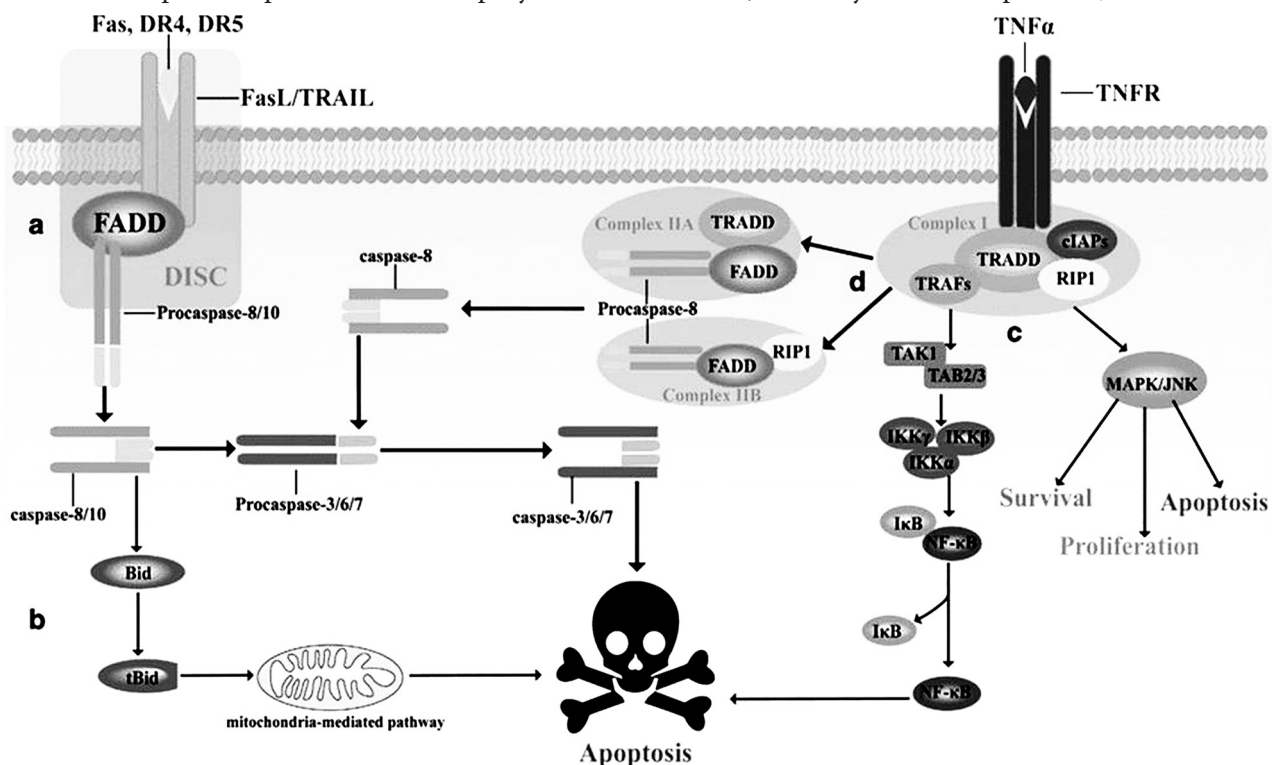


Фиг. 1. Вътрешен път на апоптозата (адаптирано от Yu You, 2017)

то на цитохром С от митохондриите, стимулирано от проапоптотични протеини от фамилията на Bcl-2 като Бах и др., активира вътрешния път. Цитохром С активира апоптотичния протеазен инхибиращ фактор Araf-1 (Apoptotic protease activating factor 1), който активира прокаспаза 9. Активната каспаза 9 от вътрешния път и каспаза 8 от външния сигнален път директно активират ефекторната каспаза 3 и настъпва апоптоза. Други каспази също могат да бъдат въввлечени в тези процеси (40). Апоптозата се характеризира морфологично с кондензация на хроматина, фрагментация на ядрото и образуването апоптотични телца, обвити с мембрана. Впоследствие апоптотичните телца се фагоцитират от тъканните макрофаги, без да предизвикат възпалителен отговор (12,41), като процесът продължава няколко минути. Индукцията на апоптозата в туморните клетки играе важна роля и за ефикасността на лъчетерапията (21,54).

Вътрешният апоптотичен път се задейства от вътреклетъчни апоптотични стимули (а), които се регулират от проапоптотичната Bcl-2 фамилия, протеини като Бах, Bid, Bak и Bad, което води до митохондриално освобождаване на цитохром С, който пък се свързва с Araf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) (фиг. 1). Заместването на ADP с dATP/ATP в Araf-1 задейства образуването на хептамерна апоптозома, която се свързва с прокаспаза 9 и образува хо-

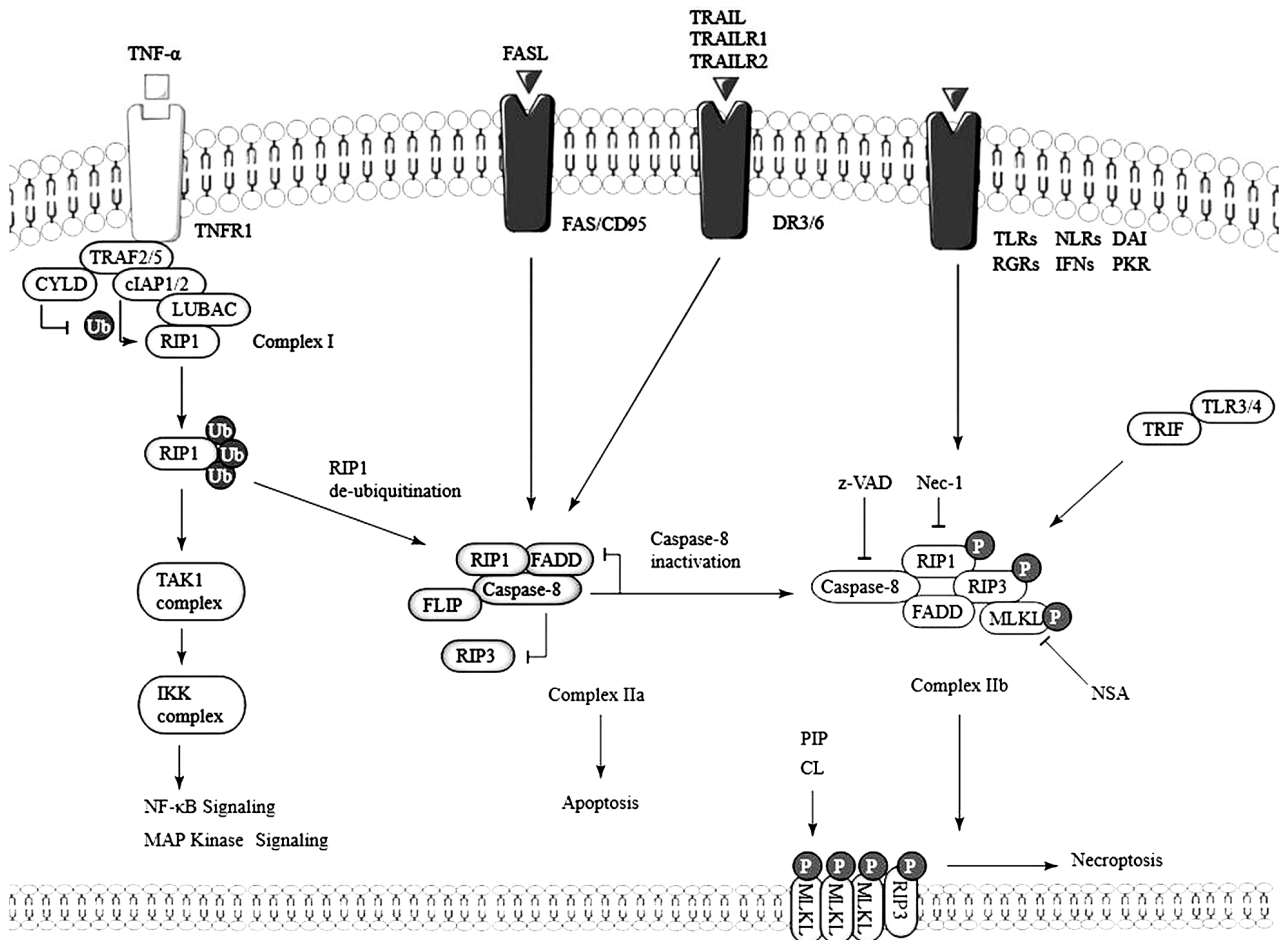
ло-апоптозома. Апоптозомата Araf-1 катализира разцепването и активирането на прокаспаза 9, което задейства каспазната каскада, а активирането на каспаза 3 и каспаза 7 води до евентуална апоптоза. (b) При ER (Endoplasmic Reticulum) стрес се активират три сигнални протеина по веригата: IRE1 (Inositol-requiring enzyme 1), PERK (Protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase) и ATF6 (Activating transcription factor 6) и каскадно се индуцира апоптоза (b1). От лумена на ER в цитоплазмата се освобождава Ca^{2+} , което задейства апоптоза чрез активиране на калциево зависимата киназа CaMKII (Calcium-calmodulin (CaM)-dependent protein kinase II). След това CaMKII активира участващите прокаспази, което от своя страна задейства каскадно активиране на каспазите (b2). Продължителното активиране на IRE1 може да потенцира апоптозата. Фосфорилираният IRE1 се свързва с TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) и задейства каскада от реакции на фосфорилиране като активирането на ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1), която в крайна сметка фосфорилира и активира JNK (c-Jun N-terminal kinases). Следва активиране на проапоптотичния Bim и блокиране на антиапоптотичния Bcl2 (b3). Хомомултимеризацията и автофосфорилирането на PERK водят до фосфорилиране на eIF - 2 α (Eukaryotic Initiation Factor 2, еукариотен фактор за инициране на транслацията 2 α), което увеличава транслацията на ATF4



Фиг. 2. Външен път на апоптозата (адаптирано по Yu You, 2017)

(Activating transcription factor 4, активиращ транскрипционен фактор - 4). След това ATF4 регулира експресията на CHOP (C/EBP-хомоложен протеин), който апоптозата чрез два от основните пътища на клетъчна смърт - пътя IP3R - Ca²⁺ - CaMKII и пътя на членовете на семейството Bcl - 2 (59).

ветните им лиганди. TNFR1 свързва TRADD (TNFRSF1A Associated Via Death Domain) - адапторен протеин, който пък се свързва с TNF рецептор - свързани фактори (Tumor necrosis factor receptor-associated factors, TRAFs), RIP1 и клетъчни инхибитори на апоптозата (Cellular inhibitor of apoptosis proteins, cIAPs), образувайки първона-



Фиг. 3. Сигнални пътища при некроптоза (адаптирано по Pasparakis M, Vandenabeele P, 2015)

Външен път на апоптозата (фиг. 2). (a) Fas и DR4/5 се активират чрез свързването на съответните им лиганди FasL и TRAIL. След това рецепторите се свързват с FADD чрез домейна на смъртта (DD). Ефекторният домейн на смъртта (DED) на FADD се свързва с прокаспаса 8/10, образувайки индуциращия смърт сигнален комплекс (DISC). Следва автопротеолитично разцепване на прокаспаса 8/10, с което се индуцира активирането на каспазната каскада и в крайна сметка води до апоптоза. (b) В конкретни клетки активираната каспаза 8 разцепва проапоптотичния протеин Bid - разцепен Bid (tBid), и това води до активиране на митохондриално-медирания апоптотичен сигнален път. (c) TNFR1, EDAR и DR3/6 се активират чрез свързването на съот-

чалния мембранен комплекс за оцеляване (комплекс I), който стимулира MAPK/JNK (Mitogen-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase) и NF-κB (Nuclear Factor Kappa B) пътища за клетъчното оцеляване или апоптоза. (d) Комплекс I образува два вида цитоплазмени апоптотични комплекси, TRADD зависим комплекс IIA и RIP1 зависим комплекс IIB, които активират каспаза 8, като по този начин инициират апоптоза (59).

Некроптоза

Различна от познатите видове клетъчна некроза е описана в клетки, при които апоптозата е потисната, но екстрацелуларната апоптотична стимулация продължава (5,8). Този тип некроза може да се блокира чрез потискане активността на рецептор взаимодействащите протеини RIP1

и RIP3 от химичния агент Necrostatin-1 (Nec-1), а също и от други инхибитори на апоптозата на различните й етапи, което доказва молекулярно-то регулиране на процеса. В некротичните клетки са наблюдавани ултраструктурни промени като разрушаване на клетъчната мембрана, кондензация на хроматина, разрушаване на цитоплазмените компоненти, характерни и за двата типа клетъчна смърт - апоптоза и некроза, поради което този вид клетъчна смърт е бил наречен некроптоза. Морфологично некроптозата наподобява повече некротичния тип клетъчна смърт (9,14). Тя се задейства от фактори, които активират външния път на апоптозата (7,17,52,64) при едновременно инхибиране на каспазите и активиране на рецептор взаимодействиящите протеини RIP1 и RIP3 или активиране само на RIP3 (14). Некроптозата като форма на клетъчна смърт е известна неотдавна и точните механизми все още са обект на изследване. (7,53). Тя се индуцира от множество сигнални пътища като рецепторите от суперфамилията на TNF, интерфероновите рецептори и др. (47). Самата клетъчна смърт се осъществява чрез RIP3 - зависима активация и фосфорилиране на смесен киназоподобен протеин (Mixed lineage kinase domain like pseudokinase, MLKL), и образуване на комплекс с висока молекулна маса, съставен от RIP1, RIP3, FADD и каспаза 8. Този комплекс е наречен некрозома/IIb комплекс (52) и разрушава клетките чрез транслокация към цитоплазмената мембрана. FADD и каспаза 8 регулират негативно некроптозата, а блокирането им оказва пронекроптотично влияние. Множество протеини участват поотделно и комбинирани в протичането на процесите на апоптоза и некроптоза. Доминиращата форма на клетъчна смърт се определя от стимулите на клетъчната среда и са обект на задълбочено проучване (16,20,25,29,56). Двата процеса се индуцират от свързване на TNF- α и Fas с мембранни рецептори и формиране на мембранно свързан белтъчен комплекс - комплекс I (56), съставен от белтъци съдържащи „домейн на смъртта“ - TRADD, FADD, RIP1, TRAF2, TRAF5, cIAP1, cIAP2 (19), от който зависи съществуването на клетката (37). Свързването на освободения от комплекс I деубиквитиран чрез ензима cylindromatosis RIP1 (7) с FADD, TRADD, RIP3 и каспаза 8 води до обособяването на комплекс II и активиране на некроптоза, а разцепването на RIP1 и RIP3 от активна каспаза 8 активира външния път на апоптозата (53).

Разработването на противотуморни терапевтици се базира на въздействието на открити-

те молекулярни механизми при апоптоза и некроптоза. Например RIP и MLKL инхибитори фармакологично потискат некроптозата (22) и усилията на изследователите са насочени, от една страна, към изясняване на механизмите на индуциране на некроптозата при тумори резистентни на апоптоза, а от друга, към ограничаването на процеса на некроптоза изолирано само в туморните клетки (47).

Експресия на CASP3 при злокачествени тумори

CASP3 често се използва за мониториране на ефикасността при лечение на злокачествените неоплазми с цитотоксични медикаменти, имуно-терапия или лъчелечение, чието действие причинява смърт на туморните клетки именно чрез активирането й. Ролята й при колоректален карцином е обект на задълбочени дискусии (63). Въпреки че повишени нива на активност на CASP3 се считат за положителен индикатор при лечението на тумора, съществуват и противоположни данни, че CASP3 може да стимулира растежа на неопластичните клетки, миграция, туморна ангиогенеза и инвазивност (11,28,34,62). Z Touloumis et al. (2020) публикуват резултати от имунохистохимичната експресия на CASP3 при 85 пациенти оперирани за спорадичен колоректален карцином. Те установяват, че почти половината от туморите експресират ензима, но зависимост с клинично-морфологичните параметри не се открива. Авторите наблюдават тенденция при пациентите с негативна експресия на CASP3 тригодишна обща преживяемост да е по-малка (51).

Едно мащабно ретроспективно проучване на експресията на CASP3 върху 359 пациенти с карцином на стомаха в IV клиничен стадий показва, че 43,5% от туморите експресират ензима и тази експресия е независим предиктор за лош отговор на лечението и намалена преживяемост на пациентите. Авторите откриват също, че CASP3 е асоциирана с повишен апоптотичен индекс (2).

Анализът на експресията на CASP3 в туморната тъкан на простатен карцином и Глийсън скор не показва статистическа значимост (33). Според други автори пациентите с редуцирана експресия на ензима имат по-лоша прогноза в сравнение с пациентите с висока експресия (1). O'Neill AJ et al. (2001) наблюдават висока експресия на CASP3 в базалните и секреторните епителни клетки при 81,1% при всички пациенти с доброкачествена простатна хиперплазия, докато при простатен карцином има значителна загуба на експресия в секреторните епителни клетки (38).

При карцином на гърдата позитивната експресия на CASP3 показва негативна корелация с TNM стадия, но не е асоциирана с диференциацията на тумора, със статуса на аксиларните лимфни възли, рецидивите или метастазите. Позитивна корелация се установява между експресията на протеина PTEN и CASP3 (58). Според Yang et al. (2008) едновременната експресия на двата протеина: PTEN и CASP3 е важен показател при оценката на патобиологичното поведение и прогнозата на карцинома на гърдата.

Zhang L et al. (2022) анализират имунохистохимично тъканните нива на експресия на HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) и CASP3 на папиларен тиреоиден карцином във връзка с клинично-морфологичните параметри. Експресия на HIF-1 α и CASP3 в туморната тъкан е по-висока в сравнение с нормалната тъкан и позитивната експресия на двата маркера корелира с инвазия в капсулата и с папиларния тиреоиден карцином, като при висококлетъчния субтип папиларен карцином (papillary carcinoma tall variant) е най-висока. Свърхекспресия на HIF-1 α и CASP3 може да послужи за предиктор на агресивно протичащ папиларен тиреоиден карцином (61).

От доброкачествените тумори е проучена експресията на CASP3 при хемангиома на кожата. Позитивна експресия на антиятлото е установена в ендотелните клетки на хемангиома, като по-висока е в хемангиом в инволюция в сравнение с ендотела на пролифериращия хемангиом и нормалната кожа. Според Yang et al. (2006) CASP3 спомага за преминаването на хемангиома от фаза на пролиферация към фаза на инволюция чрез индуциране на апоптоза на ендотела на хемангиома (57).

Wang XS et al. (2014) изследват експресията на CASP3 имунохистохимично при езофагеален плоскоклетъчен карцином и регионални метастатични лимфни възли. Те установяват по-висока експресия на антиятлото при метастази в лимфните възли отколкото при първичния тумор. Експресията на CASP3 в първичните тумори се свързва с по-дълга средна преживяемост, докато по-високата експресия в метастатични лимфни възли се свързва с по-кратка (55).

Kovtunen et al. (2019) анализират връзката между нивата на експресия на p63 и CASP3 и клинично-морфологичните характеристики на плоскоклетъчен карцином на максиларния синус. Увеличена експресията на CASP3 има в метастазите от плоскоклетъчния карцином, но корелация между имунохистохимичната експре-

сия на този маркер и рецидивите не се откриват (27).

Изследванията на CASP3, CASP8 и CASP9 туморната тъкан на плоскоклетъчен карцином на езика показват, че имунохистохимичната експресия на трите маркера в туморната тъкан е по-висока в сравнение със съседната нетуморна тъкан. Високата експресия на CASP3 се свързва с по-къс период на преживяване без заболяване. На базата на получените резултати авторите стигат до заключението, че нивото на експресия на CASP3 може да бъде прогностичен биомаркер за пациенти с плоскоклетъчен карцином на езика (30).

Huang JS et al. (2017) анализират зависимостта между експресията на CASP3 и прогнозата на пациенти с плоскоклетъчен карцином на букалната лигавица. Те установяват по-висока ниво на експресия на CASP3 в туморната тъкан в сравнение със съседната на тумора нормална тъкан. Високата експресия на CASP3 е свързана с авансирал стадий на тумора и лоша преживяемост без заболяване при пациенти на следоперативна лъчетерапия (19).

Експресия на RIP3 при злокачествени тумори

Michael и You-Sun (2015) изследват ролята на експресия на RIP3 при различни туморни клетъчни линии и установяват, че метилирането на RIP3 потиска отговора на клетките на проне-критични стимули (32). Kasof et al. (2000) изследват експресията на mRIP3 чрез Northern blotting в 16 нормални тъкани на възрастни индивиди и установяват специфично тъканно разпределение. Експресия на RIP3 е установена в сърце, мозък, плацента, скелетни мускули, бъбреци, панкреас, слезка и периферни бели кръвни клетки. Авторите откриват два отчетливи транскрипта с размери 2.1 kb и 2.6 kb, като транскриптът 2.1 kb RIP3 е открит в малки количества в простата, тестиси и дебело черво. RIP липсва в тъкани от бели дробове, черен дроб, тимус, яйчници и тънки черва (24). Koo et al. (2015) анализират повече от 60 неопластични клетъчни линии и установяват, че експресията на RIP3 е потисната в почти в 2/3 от тях.

Тъканни различия в експресията RIP3 в зависимост от рецепторния статус са установени при имунохистохимично изследване на RIP3 при пациентки с първичен карцином на гърдата. В около 80–85% от тъканните проби експресията на RIP3 е намалена в сравнение със съседната нетуморна тъкан, като при луминал А, луминал В,

HER2 и тройно негативните случаи липса е установена съответно в 73%, 84%, 95% и 90%. (26).

Najafov A et al. (2018) установяват, че при хората нивата на RIP3 mRNA прогресивно намаляват при локално авансиране на карцинома на дебело черво, стомах и яйчници. При човек загубата на експресия на RIP3 е асоциирана с появата на метастази при карцином на простата и на гърда (35). In vivo резултатите на същите автори, получени при трансплантация на човешки RIP3 позитивни туморни клетки върху имунокомпрометирани мишки, показват загуба на експресия на RIPK3, което доказва, че адаптивният имунен отговор (напр. Т клетки) не е необходим за загуба на експресия на RIPK3 в туморни клетки. Авторите предполагат, че загубата на RIPK3 може да бъде присъщ механизъм на туморните клетки in vivo или поради взаимодействия със стромални или вродени имунни клетки (35).

Има данни, че експресията на RIP3 при човек е значително намалена в туморната тъкан при колоректален карцином в сравнение със съседната нормална тъкан. При тези пациенти нивото на експресия на RIP3 е независим прогностичен фактор за преживяемост без заболяване, както и за обща преживяемост. RIP3 негативните пациентите са с по-малка преживяемост от RIP3 позитивните. Свърхекспресията на RIP3 може да потисне пролиферацията, миграцията и инвазията на клетъчни линии на колоректален карцином (4,10,49).

Sacchi et al. (2019) установяват, че при хора високата експресия на RIP3 е свързана със сигнификантно намаляване на перинеуралната инвазия и метастазите в лимфните възли при интрахепатален холангиокарцином. Високата експресия на RIP3 е свързана с увеличаване на общата преживяемост (44).

Интензивна експресия на RIP3 е установена при панкреатичен дуктален аденокарцином (46). За разлика от панкреатичния дуктален карцином нивото на експресия на анти тялото при езофагеален плоскоклетъчен карцином е понижено и редуцирането е най-изразено при авансиралите тумори. Дефицитът на RIP3 се свързва с лоша прогноза и резистентност към цисплатин при пациенти с плоскоклетъчен карцином на хранопровода, които са получили химиотерапия с цисплатина (49). Получените данни показват, че загубата на експресия на RIP3 при голям брой туморни клетки се дължи в голяма степен на метилиране на геномната последователност на RIP3 в ДНК. Експресията на RIP3 по посочения механизъм се регулира и при други тумори:

дребноклетъчен белодробен карцином (13) и при остра миелогенна левкемия (26,36).

Kalchev K (2020) сравнява имунохистохимичната експресия на RIP3 чрез H-score в туморните жлези при простатен карцином, с тези при простатна високостепенна интраепителна неоплазия и доброкачествена простатна хиперплазия и установява, че най-висока е експресията при карцинома, но разликите не са статистически значими. Според автора некроптозата, базираната на таргетна противотуморна терапия, би имала слаб ефект при лечение на конвенционалния дребноацинарен простатен карцином и по-добър ефект при простатен карцином с невроендокринна диференциация и слущообразуване (23).

Schmidt SV et al. (2015) демонстрират, че стимулирането на цервикални неопластични клетки с PolyIC индуцира некроптолитична клетъчна смърт, която е строго зависима от експресията на RIP3. Експресията на RIP3 е различна при плоскоклетъчен и аденокарцином на цервикса. При плоскоклетъчния карцином на всички тумори експресират RIPK3, като нивото на експресия варира от слабо до силно, докато аденокарциномите могат да са позитивни или негативни, определени на база на имунохистохимичен скор (45).

Експресията на RIP3 липсва при много туморни клетъчните линии и дефицитът на експресията се дължи на метилиране, което ограничава отговорите на тези клетки на проапоптолитични стимули. Експресията на RIP3 може да се възстанови в много туморни клетки с дефицит на RIP3 чрез прилагане на хипометилиращи агенти като децитабин. По този начин се възстановява чувствителността на тези клетки към програмираната некроза и се разкриват нови терапевтични възможности за лечение на малигнените заболявания чрез потенциално възстановяване на експресията на RIP3 при хора (32,42).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процеса на елиминиране и унищожаване на туморни клетки механизмите и пътищата на различните видове клетъчна смърт могат да бъдат сложни взаимодействия. Терапевтичните действия включват оперативна интервенция, таргетна, лъче- и химиотерапия, водещи до индуциране на апоптозата - естествен процес на програмирана клетъчна смърт, чрез който се осъществява елиминиране на туморните клетки. В някои случаи индуцирането на апоптозата не е възможно поради вродена или придобита резистентност на някои тумори към проапоптолитични стимули. В тези случаи терапевтичният под-

ход изисква търсене на алтернативни пътища за унищожаване на туморните клетки, резистентни на апоптоза, посредством инициация на други пътища на клетъчната смърт. Познаването в детайли на сигналните пътища, в които участват CASP3 и RIP3 и механизмите чрез които те повлияват процесите на апоптоза и некроптоза при злокачествените тумори, допринася за изясняване на предиктивната им стойност и откриване и въвеждане на нови терапевтични стратегии, насочени към конкретен сигнален път или метаболит само при малигнените клетки.

Благодарности

Статията е резултат на изследванията по проект № 21013, извършени в рамките на научноизследователска дейност към МУ – Варна, финансирана целево от държавния бюджет.

ЛИТЕРАТУРА

1. Acar V, Fernandez FLC, Buscariolo FF, Novais AA, Pereira RAM, Zuccari DAPC. Immunohistochemical Evaluation of PARP and Caspase-3 as Prognostic Markers in Prostate Carcinomas. Clin Med Res. 2021 Dec;19(4):183-191. doi: 10.3121/cmr.2021.1607. PubMed: PMID: 34933951; PubMed Central: PMCID: PMC8691432
2. Amptoulach S, Lazaris AC, Giannopoulou I, Kavantzis N, Patsouris E, Tsavaris N. Expression of caspase-3 predicts prognosis in advanced noncardiac gastric cancer. Med Oncol. 2015 Jan;32(1):416. doi: 10.1007/s12032-014-0416-7. Epub 2014 Dec 5. PubMed: PMID: 25476481
3. Araya LE, Soni IV, Hardy JA, Julien O. Deorphanizing Caspase-3 and Caspase-9 Substrates In and Out of Apoptosis with Deep Substrate Profiling. ACS Chem Biol. 2021 Nov 19;16(11):2280-2296. doi: 10.1021/acscchembio.1c00456. Epub 2021 Sep 23. PubMed: PMID: 34553588; PubMed Central: PMCID: PMC9116730
4. Bozec D, Iuga AC, Roda G, Dahan S, Yeretssian G. Critical function of the necroptosis adaptor RIPK3 in protecting from intestinal tumorigenesis. Oncotarget. 2016 Jul 19;7(29):46384-46400. doi: 10.18632/oncotarget.10135. PubMed PMID: 27344176; PubMed Central PMCID: PMC5216805
5. Brown, J.M. and Attardi, L.D. The Role of Apoptosis in Cancer Development and Treatment Response. Nature Reviews Cancer. 2005, 5, 231-237
6. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. Cell. 2009 Jun 12;137(6):1112-23. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.037. PubMed: PMID: 19524513; PubMed Central: PMCID: PMC2727676
7. Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. Curr Opin Cell Biol. 2010 Apr 22(2):263-8. doi: 10.1016/j.ceb.2009.12.003. PubMed PMID: 20045303; PubMed Central PMCID: PMC2854308
8. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. Nat Chem Biol. 2005 Jul;1(2):112-9. doi: 10.1038/nchembio711. PubMed PMID: 16408008;
9. Degterev A, Hitomi J, Gernscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. Nat Chem Biol. 2008 May;4(5):313-21. doi: 10.1038/nchembio.83. PubMed PMID: 18408713; PubMed Central PMCID: PMC5434866
10. Feng X, Song Q, Yu A, Tang H, Peng Z, Wang X. Receptor-interacting protein kinase 3 is a predictor of survival and plays a tumor suppressive role in colorectal cancer. Neoplasma. 2015;62:592-601. PubMed PMID: 25997957
11. Feng X, Yu Y, He S, Cheng J, Gong Y, Zhang Z et al. Dying glioma cells establish a proangiogenic microenvironment through a caspase 3 dependent mechanism. Cancer Lett. 2017 Jan 28;385:12-20. doi: 10.1016/j.canlet.2016.10.042. Epub 2016 Nov 5. PubMed PMID: 27826040; PubMed Central PMCID: PMC5323266
12. Fietta P. Biology Forum / Rivista di Biologia . 2006, Vol. 99 Issue 1, p69-83. 15p.
13. Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Matsubara K, Yamanaka S, Endo C et al. Microarray analysis of promoter methylation in lung cancers. J Hum Genet. 2006;51(4):368-374. doi: 10.1007/s10038-005-0355-4. PubMed PMID: 16435073
14. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell Death Differ. 2012 Jan;19(1):107-20. doi: 10.1038/cdd.2011.96; PubMed PMID: 21760595; PubMed Central PMCID: PMC3252826
15. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ . 2018 Mar;25(3):486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4. PubMed PMID: 29362479; PubMed Central PMCID: PMC5864239

16. Gong JJ, Kumar SA, Graham G, Kumar AP. FLIP: Molecular switch between apoptosis and necroptosis. *Mol Carcinog.* 2014 Sep;53(9):675-85. doi: 10.1002/mc.22027. PubMed PMID: 23625539
17. Han J, Zhong CQ, Zhang DW. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nature Immunology* 2011;12:1143-1149
18. He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α . *Cell.* 2009 Jun 12;137(6):1100-11. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.021. PubMed PMID: 19524512
19. Huang JS, Yang CM, Wang JS, Liou HH, Hsieh IC, Li GC et al. Caspase-3 expression in tumorigenesis and prognosis of buccal mucosa squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017 Aug 24;8(48):84237-84247. doi: 10.18632/oncotarget.20494. PMID: 29137419; PMCID: PMC5663591
20. Jain MV, Paczulla AM, Klonisch T, Dimgba FN, Rao SB, Roberg K, et al. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J Cell Mol Med.* 2013 Jan;17(1):12-29. doi: 10.1111/jcmm.12001. PubMed PMID: 23301705; PubMed Central PMCID: PMC3823134
21. Jonathon MF. Diagnosis and Treatment of Basal Cell and Squamous Cell Carcinoma. East Carolina University, Brody School of Medicine, Greenville, North Carolina Am Fam Physician. 2012;86(2):161-168)
22. Jouan-Lanhout S, Riquet F, Duprez L, Vanden Berghe T, Takahashi N, Vandenabeele P. *Semin Cell Dev Biol.* 2014 Nov;35:2-13. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.08.010. Epub 2014 Aug 23. PubMed PMID: 25160988
23. Kalchev K. The role of RIP3 in prostate cancer. *Journal of the Union of Scientists - Varna. Medicine and Ecology Series.* 1'2020;25:30-33
24. Kasof GM, Prosser JC, Liu DR, Lorenzi MV, Gomes BC. The RIP-like kinase, RIP3, induces apoptosis and NF-kappa B nuclear translocation and localizes to mitochondria. *FEBS Lett.* (2000);473:285-291. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01473-3. PubMed PMID: 10818227
25. Khoury MK, Gupta K, Franco SR, Liu B. Necroptosis in the Pathophysiology of Disease. *Am J Pathol.* 2020 Feb;190(2):272-285. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.10.012. PubMed PMID: 31783008; PubMed Central PMCID: PMC6983729
26. Koo G-B, Morgan MJ, Lee D-G, et al. MethylationDependent Loss of RIP3 Expression in Cancer Represses Programmed Necrosis in Response to Chemotherapeutics. *Cell Res.* (2015);25:707-725. doi: 10.1038/cr.2015.56. PubMed PMID: 25952668; PubMed Central PMCID: PMC4456623
27. Kovtunenkov OV, Bakaiev AA, Shponka IS. Analysis of expression of p63 and caspase-3 and their predictive value in patients with squamous cell carcinoma of maxillary sinus. *Wiad Lek.* 2019;72(12 cz 1):2305-2314. PubMed PMID: 32124745
28. Lauber K, Bohn E, Kröber SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK et. al. *Cell.* 2003 Jun 13;113(6):717-30. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00422-7. PubMed PMID: 12809603
29. Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *N Engl J Med.* 2014 Jan 30;370(5):455-65. doi: 10.1056/NEJMr1310050. PubMed PMID: 24476434; PubMed Central PMCID: PMC4035222
30. Liu PF, Hu YC, Kang BH, Tseng YK, Wu PC, Liang CC et al. Expression levels of cleaved caspase-3 and caspase-3 in tumorigenesis and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2017 Jul 10;12(7):e0180620. doi: 10.1371/journal.pone.0180620. PubMed PMID: 28700659; PubMed Central PMCID: PMC5503265
31. Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol.* 2008;414:13-21. doi: 10.1007/978-1-59745-339-4_2. PubMed PMID: 18175808
32. Michael JM, You-Sun K. The serine threonine kinase RIP3: lost and found. *BMB Rep.* 2015 Jun 30; 48(6): 303-312. doi: 10.5483/BMBRep.2015.48.6.068. PubMed PMID: 25858093; PubMed Central PMCID: PMC4578615
33. Motta VP, Malafaia O, Ribas-Filho JM, Czezko NG, Ribas CAPM, Cuenca RM. CASPASE-3 and CD-34 expression in prostate adenocarcinoma. *Rev Col Bras Cir.* 2009 Jul;36(3):223-9. doi: 10.1590/s0100-69912009000300008. PubMed PMID: 20076902
34. Mukai M, Kusama T, Yukou Hamanaka, Koga T, Endo H, Tatsuta M et al. Cross talk between apoptosis and invasion signaling in cancer cells through caspase-3 activation. *Cancer Res.* 2005 Oct 15;65(20):9121-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4344. PubMed PMID: 16230365
35. Najafov A, Zervantonakis IK, Mookhtiar AK, Greninger P, March RJ, Egan RK et al. BRAF and AXL oncogenes drive RIPK3 expression loss in cancer. *PLoS Biol.* 2018 Aug 29;16(8):e2005756. doi: 10.1371/journal.pbio.2005756. eCollection 2018 Aug. PubMed PMID: 30157175; PubMed Central PMCID: PMC6114281
36. Nagues A-L, Bouazzati H El, Hétiuin D, Berthon C, Loyens A, Bertrand E et al. RIP3 is downregulated in human myeloid leukemia cells and modulates apoptosis and caspase-mediated p65/RelA cleavage. *Cell Death Dis.* 2014 Aug 21;5(8):e1384. doi: 10.1038/cddis.2014.347. PubMed PMID: 25144719; PubMed Central PMCID: PMC4454320

37. Oberst A, Dillon CP, Weinlich R, McCormick LL, Fitzgerald P, Pop C, et al. Catalytic activity of the caspase-8–FLIPL complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature* 2011; 471:363–367
38. O'Neill AJ, Boran SA, O'Keane C, Coffey RN, Hegarty NJ, Hegarty P et al. Caspase 3 expression in benign prostatic hyperplasia and prostate carcinoma. *Prostate*. 2001 May 15;47(3):183-8. doi: 10.1002/pros.1061. PubMed: PMID: 11351347
39. Peter ME. Programmed cell death: Apoptosis meets necrosis. *Nature* 2011; 471(7338): 310-2
40. Reed J. Caspases and cytokines - roles in inflammation and autoimmunity. *Adv Immunol*. 1999;73:265-99. doi: 10.1016/s0065-2776(08)60788-9. PubMed PMID: 10399008
41. Reed J. Mechanisms of Apoptosis. *Am J Pathol*. 2000;157(5):1415–1430
42. Ricci MS, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist*. 2006;11:342–357.
43. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Nov;5(11):897-907. doi: 10.1038/nrm1496. PubMed: PMID: 15520809
44. Sacchi D, Sarcognato S, Cillo U, Gringeri E, Fabris L, Di Giunta M. et al. Necroptosis is associated with a better survival in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Digestive and Liver Disease*. 2019;51:e2-e3
45. Schmidt SV, Seibert S, Walch-Rückheim B, Vicinus B, Kamionka E-M, Pahne-Zepfenfeld J et al. RIPK3 expression in cervical cancer cells is required for PolyIC-induced necroptosis, IL-1 α release, and efficient paracrine dendritic cell activation. *Oncotarget*. 2015 Apr 20;6(11):8635-47. doi: 10.18632/oncotarget.3249. PubMed PMID: 25888634; PubMed Central PMCID: PMC4496172
46. Seifert L, Werba G, Tiwari S, Giao Ly NN, Alothman S, Alqunaibit D. et al. The necrosome promotes pancreatic oncogenesis via CXCL1 and Mincle-induced immune suppression. *Nature*. 2016;532:245-9
47. Su Z, Yang, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer*. 2015 Feb 21;14:48. doi: 10.1186/s12943-015-0321-5. PubMed PMID: 25743109; PubMed Central PMCID: PMC4343053
48. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, Wang L, Yan J, Liu W, Lei X, Wang X. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*. 2012 Jan 20;148(1-2):213-27. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.031. PubMed PMID: 22265413
49. Sun Y, Zhai L, Ma S, Zhang C, Zhao L, Li N. et al. Down-regulation of RIP3 potentiates cisplatin chemoresistance by triggering HSP90-ERK pathway mediated DNA repair in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2018 Apr 1;418:97-108. doi: 10.1016/j.canlet.2018.01.022. Epub 2018 Jan 10., PubMed PMID: 29331417
50. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Mar;9(3):231-41. doi: 10.1038/nrm2312. PubMed: PMID: 18073771
51. Touloumis Z, Lazaris A, Griniatsos J. The prognostic significance of Caspase-3 and survivin expression in colorectal cancer patients. *J BUON*. 2020 Sep-Oct;25(5):2160-2170. PubMed: PMID: 33277831
52. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Oct;11(10):700-14. doi: 10.1038/nrm2970. PubMed PMID: 20823910
53. Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell Death Differ*. 2012 Jan;19(1):75-86. doi: 10.1038/cdd.2011.164. PubMed PMID: 22075985; PubMed Central PMCID: PMC3252835
54. Verheij M. Clinical biomarkers and imaging for radiotherapy-induced cell death. *Cancer Metastasis Rev*. 2008 Sep;27(3):471-80. doi: 10.1007/s10555-008-9131-1. PubMed PMID: 18470482
55. Wang XS, Luo KJ, Bella AE, Bu SS, Wen J, Zhang SS et al. Caspase-3 expression in metastatic lymph nodes of esophageal squamous cell carcinoma is prognostic of survival. *World J Gastroenterol*. 2014 Apr 21;20(15):4414-20. doi: 10.3748/wjg.v20.i15.4414. PubMed: PMID: 24764681; PubMed Central: PMCID: PMC3989979
56. Welz PS, Wullaert A, Vlantis K, Kondylis V, Fernández-Majada V, Ermolaeva M, et al. FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation. *Nature*. 2011 Jul 31;477(7364):330-4. doi: 10.1038/nature10273. PubMed PMID: 21804564
57. Yang H, Deng C, Shen S, Zhang D, Yu Y. Expression and significance of Bcl-2, Bax, Fas and caspase-3 in different phases of human hemangioma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2006;26(4):402-4. doi: 10.1007/s11596-006-0405-y. PubMed: PMID: 17120732
58. Yang XF, Xin Y, Mao LL. Clinicopathological significance of PTEN and Caspase-3 expressions in breast cancer. *Chin Med Sci J*. 2008 Jun;23(2):95-102. doi: 10.1016/s1001-9294(09)60019-5. PubMed: PMID: 18686628
59. You Y, Cheng AC, Wang MS, Jia RY, Sun KF, Yang Q, et al. The suppression of apoptosis by α -herpesvirus. *Cell Death Dis*. 2017 Apr 13;8(4):e2749. doi: 10.1038/cddis.2017.139. PubMed PMID: 28406478; PubMed Central PMCID: PMC5477576
60. Zhang D, Lin J, Han J. Receptor-interacting protein (RIP) kinase family. *Cell Mol Immunol*.

- 2010 Jul;7(4):243-9. doi: 10.1038/cmi.2010.10.
Epub 2010 Apr 12. PubMed: PMID: 20383176;
PubMed Central: PMCID: PMC4003224
61. Zhang L, Shi B, Hu M, Qian L. HIF-1 α and Caspase-3 expression in aggressive papillary thyroid carcinoma. *World J Surg Oncol.* 2022 Nov 4;20(1):353. doi: 10.1186/s12957-022-02815-8. PMID: 36329448; PubMed: PMCID: PMC9635136
62. Zhao X, Wang D, Zhao Z, Xiao Y, Sengupta S, Xiao Y et al. Caspase-3-dependent activation of calcium-independent phospholipase A2 enhances cell migration in non-apoptotic ovarian cancer cells. *J Biol Chem.* 2006 Sep 29;281(39):29357-68. doi: 10.1074/jbc.M513105200. Epub 2006 Aug 1. PubMed: PMID: 16882668
63. Zhou M, Liu X, Li Z, Huang Q, Li F, Li CY. Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *Int J Cancer.* 2018 Aug 15;143(4):921-930. doi: 10.1002/ijc.31374. Epub 2018 Mar 30. PubMed: PMID: 29524226; Pubmed Central PMCID: PMC6204286
64. Богданова, М., Донев, И., Цонев, Н., Димитрова, Е., Манев, Р., Стоянов, Д. et al. Некроптоза. *Studia Oncologica* 2017;1:59-68

Адрес за кореспонденция:

Пламен Василев
Катедра по обща и клинична патология, съдебна
медицина и деонтология
МУ-Варна
ул. Проф. „Марин Дринов“ 55
Варна, 9002
e-mail: drpvas@gmail.com