

РЕГУЛИРАНЕ НА КЛЕТЪЧНАТА СМЪРТ ПРИ РАКОВИ ЗАБОЛЯВАНИЯ – ЗНАЧЕНИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕН ЕФЕКТ

Камелия Братоева¹, Елеонора Димитрова², Николай Цонев², Георги Тодоров³,
Калин Калчев⁴, Мария Раданова⁵, Иван Донеv².

¹Катедра по физиология и патофизиология, МУ-Варна

²Клиника по медицинска онкология, УМБАЛ „Св. Марина“,

Катедра по пропедевтика на вътрешни болести, МУ-Варна

³Катедра по образна диагностика и лъчелечение, МУ-Варна

⁴Катедра по обща и клинична патология, МУ-Варна

⁵Катедра по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика, МУ-Варна

REGULATION OF CELL DEATH IN CANCER DISEASES- IMPORTANCE AND THERAPEUTIC EFFECT

Kameliya Bratoeva¹, Eleonora Dimitrova², Nikolay Conev², Georgi Todorov³,
Kalin Kalchev⁴, Mariya Radanova⁵, Ivan Donev².

¹Department of Physiology and pathophysiology, Medical University of Varna

²Clinic of Medical Oncology, UMHAT „St. Marina“, Department of Propedeutics of Internal Diseases, Medical University of Varna

³Department of Diagnostics Imaging and Radiotherapy, Medical University of Varna

⁴Department of General and Clinical Pathology, Medical University of Varna

⁵Department of Biochemistry, Molecular Medicine and Nutrigenomics, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Комплексната роля на различните видове клетъчна смърт при раковите заболявания е сложна и продължава да се разкрива. Наблюденията показват, че и трите процеса: апоптоза, автофагия и некроза, могат да съществуват в един тумор и тяхното относително участие диктува траекторията на туморния растеж, регресия и отговор към антитуморна терапия. Анализът на клетъчната сигнализация може да разкрие и да осигури нови биомаркери, отразяващи функционалната активност на тези процеси, които ще подпомогнат индивидуализираната терапия при карциномно болните. В този преглед сме се спрели на някои основни пътища и регулатори, свързани с клетъчната смърт и оцеляване, които осигуряват метаболитна устойчивост в туморите, водещи до резистентност към химиотерапия и неуспешно лечение на рака.

Ключови думи: автофагия, клетъчна смърт, солидни тумори

ABSTRACT

The complex role of different types of cell death in cancer is very complicated and continues to be revealed. The observations show that all three processes - apoptosis, autophagy and necrosis may exist in a tumor, and their relative involvement dictates the trajectory of tumor growth, regression and response to anti-tumor therapy. Cellular signaling analysis may reveal and provide new biomarkers reflecting the functional activity of these processes that will support individualized therapy in cancer patients. In this review we have accentuated of some major roads and regulators associated with cell death and survival, which provide the metabolic stability in tumors, leading to resistance to chemotherapy and unsuccessful cancer treatment.

Keywords: autophagy, cell death, cancer

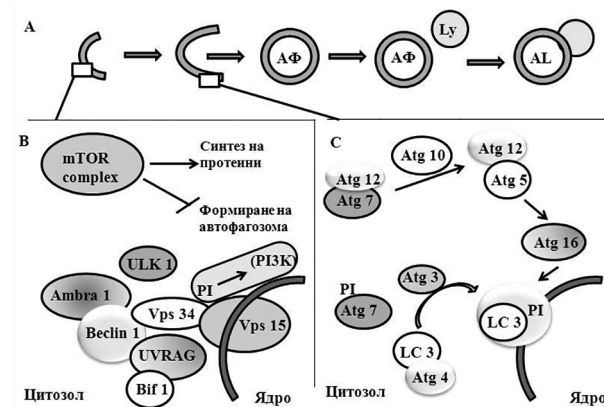
ВЪВЕДЕНИЕ

Съществува трудност при идентифициране на терапевтични възможности за предотвратяване на ракови заболявания поради способността на туморните клетки да преминават в необратими режими на клетъчна смърт, които индуцират макроавтофагия (наричана по-нататък автофагия), водеща парадоксално до тяхното оцеляване. В отговор на различни съвременни терапевтични подходи (вкл. химиотерапия и лъчелечение) при туморните клетки се наблюдават едновременно няколко клетъчни процеса - на автофагия, апоптоза и некроза, чиято активност невинаги води до смъртта им (16). Докато апоптозата и некрозата се необратими форми на клетъчна смърт, автофагията е самостоятелно ограничен процес, който провокира серия от адаптивни реакции, а не смъртоносни сигнали в раковите клетки. Обикновено дефекти в апоптозата позволява продължително оцеляване, прогресия и резистентност към терапия (2). От друга страна, генетичното и фармакологично потискане на автофагията насърчава клетъчна смърт чрез некроза *in vitro* и *in vivo*, което предполага, че туморните клетки използват автофагията за оцеляване в стресови условия (17). Проучването на тези процеси и техните регулатори е от решаващо значение за развитието на противоракови терапии с максимална ефективност и минимална резистентност.

Автофагия - клетъчно оцеляване или смърт

Автофагията опосредства клетъчното оцеляване като механизъм, чрез който клетките разграждат повредени органели и дългоживеещи протеини (11, 14) и рециклират макромолекули за поддържане на биоенергетичния баланс (21). Тя е еволюционно консервативен процес, наблюдаващ се във всички еукариотни клетки (18), и има важно значение за оцеляването на клетката в условията на стрес-хипоксия, недостиг на хранителни вещества, растежни фактори и др. Парадоксално, но автофагията може да доведе и до "nonapoptotic" клетъчна смърт (15). За разлика от апоптозата, която е тип I програмирана клетъчна смърт, в началото на 21 век в научните среди се заговори, че „автофагията ще е вълната на бъдещето и ще се превърне в „новата апоптоза“, приемана като тип II програмирана клетъчна смърт. Активирането ѝ е свързано с формирането на изолационна мембрана (фагофор) в цитоплазмата, включваща каскадно активиране на белтъци (Atg) от т.нар. комплекс на вакуолното сортиране, необходим за образуване на автофагозома. Автофагозома се удължава (елонгация), обхва-

ща разграждащите се продукти, които в последващи етапи се подлагат на ензимно смилане (матурация) и рециклиране (25) (вж. Фиг. 1).



Фигура 1. Автофагия - активиране, етапи

Легенда: А: формиране на автофагозома - АФ; елонгация на автофагозомата; сливане на автофагозомата с лизозома - Ly; лизозомно разграждане на автофагозомата.

В: mTOR комплексът, включващ фосфатидилинозитол-3- (PI3K)-АКТ киназа; комплекс на вакуолно сортиране, включващ Beclin 1, Vps34, PI3K3, P150, Ambra1 и UVRAG-Bif

С: елонгация на автофагозомата - експресия на LC3 протеина; Atg- гени регулиращи етапите на автофагия

Все още се знае твърде малко за начина, по който се регулира автофагията както в нормални, така и в туморни клетки. Устойчиви увреждания на ДНК, предизвикани от активни форми на кислорода, мутантни протеини, увредени митохондрии и др. в тъкани с потисната автофагия са причина за повишено образуване на тумори (23). Все повече доклади обаче представят данни за двойствена роля на автофагията в туморогенезата, която може да доведе до резистентност към химиотерапия чрез въздействието на регулатори и на други видове клетъчна смърт. От една страна в някои тумори автофагията води до клетъчна смърт, а при други тумори промотира клетъчното оцеляване на туморните клетки (28). Тази двойствена роля може да бъде обяснена с различните стадии на туморогенеза, напр. премахването на увредените органели и белтъци може да предотврати туморната инициация, докато при вече развилия се тумор тя подпомага клетъчното оцеляване на туморните клетки при различни стресови условия – хипоксия, химио- и лъчетерапия и др. (17,31).

Автофагията - многостъпален процес, върху който оказват влияние различни сигнални пътища.

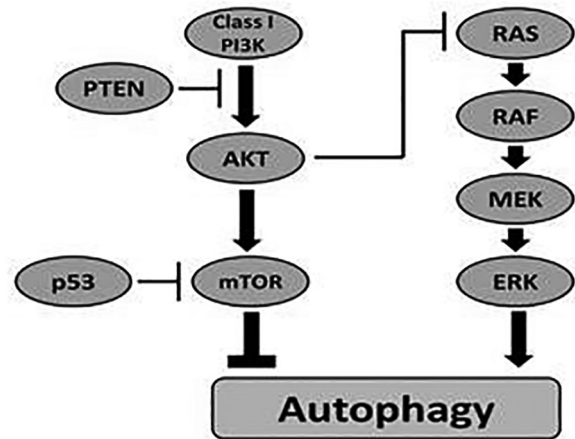
Скорошни изследвания разкриха, че фосфатидилинозитол-3-киназният (PI3K)-АКТ-mTOR

път, който е активиран в много видове рак, е от основните повлияващи автофагията (Фиг. 1). В богата на нутриенти среда оста на (PI3K)-АКТ-mTOR се активира, като по този начин води до инхибиране на автофагията и стимулация на клетъчната пролиферация. Обратно, клетъчният стрес потиска дейността на mTOR киназата и предизвиква активация на автофагията, като mTOR инхибиторите, включително рапамицин, са показали, че индуцират автофагия и в туморни клетки.

Установено е, че при злокачествените заболявания някои белтъци от регулаторните пътища за автофагия са мутирани или са абнормно експресирани (напр. RAS, B-Raf, PI3K и Akt) (24) (Фиг. 2). Активността на PI3K-АКТ-mTOR пътя в туморите е много често постоянно свръхстимулирана от различни растежни фактори, както и от мутации в PTEN-тумор-супресорния ген (напр. при малигнен глиом, простатния и ендометриалния карцином). Онкогенните Ras мутации се откриват в повече от 30% от всички човешки злокачествени заболявания. В тумори, при които има експресия на онкогенния H-Ras или K-Ras, автофагията съдейства за клетъчно-то оцеляване при изчерпани хранителни вещества. Ако се инхибират някои от пътищата на автофагия, се стига до клетъчна смърт на туморните клетки (12). Екзогенната експресия на един от регулаторите на автофагия Beclin 1 (Фиг. 1) в човешката клетъчна култура MCF7 (от карцином на млечна жлеза, която ендогенно не го продуцира) води до потискане на пролиферацията и туморогенезата (20). Ниското ниво на експресия на Beclin 1 при рак на млечната жлеза, яйчник и простата предполага действието му като имуносупресор (29). Противно на това при дебелочревния и стомашния карцином нивото му на експресия е значително по-високо, отколкото в нормална тъкан (1). В действителност такива регулатори са и много от сегашните антитуморни терапии, вкл. някои от химиотерапевтичните агенти, лъчелечението и тирозин киназни инхибитори (4,7). Все още остава спорен въпросът дали автофагията е директно отговорна за действието на тези терапии.

Връзка между автофагия, апоптоза и некроза

Веднъж активиран, процесът на автофагия е устойчив, като преработва нарушените клетъчни органели и протеини, но може да доведе и до каспаза-независима форма на клетъчна смърт. В клетки с активирана автофагия може да се наблюдават и белези на апоптоза като например



Фиг. 2. Сигнални молекули - инхибитори и активатори на автофагия

Фигура по Netea-Maier R. et al., (2015).

Легенда: Инхибиране на ключови молекули в PI3K / Akt. Съкращение: PTEN и p53: тумор-супресорни гени; PI3K, фосфоинозитид 3-киназа; Akt: протеин киназа B, mTORC: инхибитор на рапамицин при бозайници; Ras: протеиново подсемейство на малки GTP-ази, Raf: протонкоген серин / треонин-протеин киназа; Mek: Мар киназа; Erk: извънклетъчна сигнално регулирана киназа

активиране на каспазите (19) и некротична клетъчна смърт - оток на органелите и разкъсване на плазмената мембрана. Съществува трудност при характеризиране на преобладаващия начин на клетъчна смърт в популация от туморни клетки. За разлика от апоптозата некрозата настъпва след метаболитен или терапевтичен стрес, които водят до бърза клетъчна смърт. Туморните клетки могат да избягат тази ранна форма на клетъчна смърт, като се адаптират към по-ниските нива на АТФ чрез действието на енергетичния сензор LKB1/AMPK комплекс (6). Ролята на този комплекс е дефинирана като главен регулатор на процеса на автофагия чрез инхибицията на mTOR сигнализацията (13) и активацията на тумор-супресорите p20 и p53 (Фиг. 2). Един от таргетните гени, който се индуцира след активацията на p53, е модулатор на автофагията - лизозомален мембранен протеин, есенциален за p53 индуцирана автофагия (8). Към директната транскрипция на асоциирани с автофагията протеини p53 може индиректно да модулира mTOR сигнализацията по типа на обратната връзка (22). Често след активиране на p53 може да настъпи едновременно в различните части на тумора както апоптоза, така и автофагия. Все още не са ясни факторите, които диктуват преобладаващия стрес-отговор при активацията на p53. При Akt-обусловен туморен модел хранителният

дистрес и хипоксията предоминантно активират апоптозата (9).

В други случаи се наблюдава „комуникация“ между биохимичните процеси на апоптозата и автофагия. Инхибирането на проапоптотичните Вах и Вак протеини в култури на костномозъчни клетки настъпва активация на автофагия и клетъчна смърт (21). За това, че съществува връзка между процесите на автофагия и апоптоза, говори и противоположен експеримент, при който при инхибицията на автофагия посредством 3-метил-аденин или с малки интерфериращи РНК (siRNAs), насочени срещу асоциирани с автофагия гени, предизвиква апоптоза в HeLa клетки (5). В други условия индукцията на автофагия забавя сулиндак-сулфид (НСП-ВС)-индуцираната апоптоза в култури на клетки от карцином на дебелото черво чрез секвестриране на фактори, предизвикващи митохондриална смърт, като цитохром С (3). Докато инхибицията на автофагията от бафиломицин А1, хидроксихлороквин и монезин увеличава апоптотичната клетъчна смърт в редица карциномни клетъчни линии, третирани чрез лъче- или химиотерапия. Ето защо може да се допусне, че ако процесът на автофагия протектира раковите клетки от медикаментозно индуцираната апоптоза, агентите, блокиращи автофагията, могат да засилят антитуморната активност на цитотоксичните препарати.

Методи за детекция на апоптоза, автофагия и некроза

В момента не съществуват много специфични клинични методи за установяването на автофагията *in vivo*, както и разграничаване на отделните видове клетъчна смърт, макар че има някои маркери за апоптоза като каспаза 3, които могат да бъдат измерени в кръвта на пациенти, получаващи цитотоксична терапия, и може да определят тяхната морфология. Златен стандарт за предоставяне на максималната информация за туморната морфология е електронната микроскопия. При автофагията се наблюдава цитозолно вакуолизиране със запазване на интактни ядрена и клетъчна мембрана, докато апоптотичните клетки се характеризират с пикнотични ядра с кондензиран хроматин и цитозолно и нуклеарно вакуолизиране. За определяне степента на автофагия се използва електронната микроскопия чрез определяне на броя на двойно-мембранните автофагични вакуоли и процента на клетки с повишен брой автофагични везикули. Когато се осъществява от специалист с опит в електронната микроскопия, това изследване се превръща в

специфично и надеждно средство за характеризане на автофагия. Пречки при клиничното използване на този метод са изискването на специфична фиксация и определен размер на пробата при интраоперативни и слепи биопсии. Недостатъците на метода са, че е трудоемък и скъп. За установяване на автофагията може да се използват слабоосновни оцветители като монодансилкадаверин и акридиноранж, които се акумулират в киселите автофагозомни-лизозомни компартменти (33). Флуоресцентното количествено изражение може да бъде обективно измерено на тези клетъчни отдели, въпреки че също среща трудности при установяване на отношението сигнал/шум и репродукцията на оцветяването. Настоящият златен стандарт за молекулярна детекция на автофагия се основава на антитела, насочени срещу LC3 протеина на автофагията или нейния активатор Beclin 1. LC3 има дифузна и постоянна експресия с ниски нива в цитоплазмата на повечето клетки (32). LC3 съществува в две форми: LC3-I и LC3-II, последният се намира по мембраните на автофагозомите, получава се от LC3-I и е специфичен маркер за активирана автофагия.

Характеризирането на некротичната клетъчна смърт също е свързано с редица ограничения. Наличието на органелен оток и нарушение на целостта на клетъчните мембрани са морфологични критерии при електронната микроскопия. За разграничаването на апоптозата от автофагия и некротичната клетъчна смърт се използва липсата на активация на каспаза-3. Като маркер за некротична клетъчна смърт се използва екстрацелуларната лактат дехидрогеназа, макар че според някои проучвания наличие на този ензим има и при клетки, претърпели апоптоза. В момента най-обещаващият специфичен метод за установяване на некротична клетъчна смърт е изследването на нехистонови ДНК-свързващ протеин с висока подвижност група B1 (HMGB1), който нормално е слабо прикрепен към хроматина и се свързва по-силно с него само при наличието на процес на апоптоза, като се кондензира. В контраст на клетките, подложени на некроза, PARP активацията води до освобождаването на HMGB1 от хроматина и експорт навън от ядрото с последваща секреция в междуклетъчното пространство, където той има ролята на провъзпалителен цитокин. HMGB1 може да бъде измерен в екстрацелуларното пространство след нарушаването на целостта на клетъчната мембрана. Той се свързва с рецептори като RAGE на ендотелните клетки (10) и Toll-like рецептори на

макрофагите. При активирането на макрофагите се потенцира сигнал за унищожение, като се освобождава HMGB1 за привличане на още клетки на възпалението в мястото на некроза и установява в серума на пациентите (27). Приема се за лоша прогноза повишението на серумните нива на антителата срещу HMGB1 (установени чрез ELISA метод) при пациенти със сепсис (30). Амбулаторно установени нива на HMGB1 в серума на карциномно болни пациенти е по-високо от тези на хоспитализирани пациенти със сепсис, но значението на този факт за клиничната практика не е напълно проучен. Допълнителни изследвания са необходими в посока на това как валидираните методи за детекция на некротична клетъчна смърт могат да бъдат интегрирани в клиничните проучвания при карциномните заболявания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизмите за апоптоза, автофагия и некроза са свързани и се координират помежду си. През последното десетилетие се наблюдава натрупване на открития, които предполагат, че апоптозата, некрозата и автофагията често се регулират от подобни пътища, ангажират общи субклетъчни места и органели и дори споделят инициаторни и ефекторни молекули. В зависимост от клетъчния контекст и причината за смъртта, двата основни режима на клетъчна смърт често си сътрудничат в балансирано взаимодействие, което включва автофагия. Отстраняването на повредени митохондрии чрез автофагия предотвратява апоптозата. При липса на такова прочистване освобождаване на апоптоза-индуциращи фактори от повредените митохондрии активира апоптоза и в случай на крайно увреждане и изчерпване на АТФ води до некротична клетъчна смърт. Въпросът дали автофагията е насочена към оцеляването на клетките или клетъчната смърт при различните тумори, е все още неизяснен. Все повече доклади представят данни за това, че автофагията е механизъм, използван от туморните клетки да се толерира метаболитен стрес, и участва в почти всички етапи на туморогенеза, като насърчава оцеляването на ракови клетки след химио- или лъчетерапия. От изключително важно за бъдещите проучвания е да се установят взаимодействията на автофагията с другите онкогенни пътища, повлияващи туморогенезата. Това би улеснило откриването на биомаркери, отразяващи функционалната активност на клетъчните процеси и терапии, които индуцират селективно смъртта на

раковите клетки в индивидуализирана терапия при карциномно болните.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahn CH, Jeong EG, Lee JW, Kim MS, Kim SH, Kim SS et al. Expression of beclin-1, an autophagy-related protein, in gastric and colorectal cancers. *APMIS*. 2007; 115(12):1344-9
2. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest*. 2007;117(2):326-36.
3. Bauvy C, Gane P, Arico S, Codogno P, and Ogier-Denis E. Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in the human intestinal colon cancer cell line HT-29. *Experimental cell research*. 2001;268:139-149.
4. Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, Helgason GV, Soliera AR, Ronchetti M et al. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J Clin Invest*. 2009;119(5):1109-23.
5. Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Metivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T et al. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 2005; 25:1025-1040.
6. Buzzai M, Bauer DE, Jones RG, Deberardinis RJ, Hatzivassiliou G, Elstrom RL, et al. The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid beta-oxidation. *Oncogene*. 2005;24: 4165-4173.
7. Calabretta B, Salomoni, P. Inhibition of autophagy: a new strategy to enhance sensitivity of chronic myeloid leukemia stem cells to tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma*. 2011; 1:54-9.
8. Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison P.R, Gasco M, Garrone. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*. 2006; 126(1):121-34.
9. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G et al. Autophagy

- promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2006;10(1):51-64.
10. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood*. 2003;101:2652-2660.
 11. Gu Y, Wang C and Cohen A. Effect of IGF-1 on the balance between autophagy of dysfunctional mitochondria and apoptosis. *FEBS letters*. 2004;577: 357-360.
 12. Guo JY, Chen HY, Mathew R et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev*. 2011;25:460-470.
 13. Hoyer-Hansen M and Jaattela M. AMP-activated protein kinase: a universal regulator of autophagy? *Autophagy*. 2007;3:381-383.
 14. Iwata J, Ezaki J, Komatsu M, Yokota S, Ueno T, Tanida I. et al. Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. *The Journal of biological chemistry*. 2006; 281:4035-4041.
 15. Kim HS, Lee SH, Do SI, Lim SJ, Park YK and Kim YW. Clinicopathologic correlation of beclin-1 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathology, research and practice*. 2011;207: 247-252.
 16. Klionsky DJ, Emr SD. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*. 2000;290(5497):1717-21.
 17. Kondo Y, Kanzawa T, Saway R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):726-34.
 18. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004;6(4):463-77.
 19. Li JI, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008;27(48):6194-206
 20. Liang XH, Jackson S, Seaman M. *et al*. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 1999;402(6762):672-6.
 21. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, *et al*. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*. 2005; 120: 237-248.
 22. Ma XM, and Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009; 10: 307-318.
 23. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY *et al*. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*. 2009; 137: 1062-1075.
 24. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE. *et al*. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul*. 2006; 46:249-79.
 25. Mizushima, N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current opinion in cell biology*. 2010; 22: 132-139
 26. Netea-Maier RT, Klück V, Plantinga TS, Smit JW. Autophagy in thyroid cancer: present knowledge and future perspectives. *Front. Endocrinol*. 2015; 6:22
 27. Raucci A, Palumbo R, Bianchi ME. HMGB1: a signal of necrosis. *Autoimmunity*. 2007; 40:285-289
 28. Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(4):304-12.
 29. Saito H, Inazawa J, Saito S, Nakamura Y. Detailed deletion mapping of chromosome 17q in ovarian and breast cancers - 2 cm region on 17q21.3 often and commonly deleted in tumors. *American journal of human genetics*. 1993;53(3): 3382-3385.
 30. Sunden-Cullberg J, Norrby-Teglund A, Rouhiainen A, Rauvala H, Herman G, Tracey KJ *et al*. Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock. *Critical care medicine*. 2005;33: 564-573.
 31. Swampillai AL, Salomoni P, Short SC. The role of autophagy in clinical practice. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2012;24(6):387-95.
 32. Tanida I, Ueno T, and Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*. 2008 445:77-88.

33. Yang ZJ, Chee CE, Huang S and Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Molecular cancer therapeutics*. 2011; 10:1533-1541.

*Адрес за кореспонденция:
Камелия Жечкова Братоева
Катедра по физиология и патофизиология
Медицински университет
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна
9000, гр. Варна, ул. „проф. Марин Дринов“ 55,
e-mail: k_brat@abv.bg*