

НЕКРОПТОЗА – МОЛЕКУЛЯРНИ МЕХАНИЗМИ И РОЛЯТА Й ПРИ ТУМОРНИЯ РАСТЕЖ

Мартина Стоева^{1,2}, Любен Стоев^{1,2}, Мария Цанева^{1,2}

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

²Клиника по обща и клинична патология, УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна,
Медицински университет – Варна

NECROPTOSIS—MOLECULAR MECHANISMS AND ROLE IN TUMOR GROWTH

Martina Stoeva^{1,2}, Lyuben Stoev^{1,2}, Maria Tzaneva^{1,2}

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

²Clinic of General and Clinical Pathology, St. Marina University Hospital,
Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Некроптозата представлява некротична форма на програмирана клетъчна смърт с мощна имуногенност, която участва в сложно взаимодействие с други видове клетъчна смърт като автофагия и апоптоза. Съществуват все повече доказателства, че некроптозата играе ключова роля в регулирането на различни нормални физиологични процеси, особено през периода на развитието на организмите. Освен това се приема, че дерегулираните сигнални пътища, участващи в контрола на некроптозата, са в основата на много човешки заболявания, като вирусни или бактериални инфекции, исхемично-реперфузионно увреждане, невродегенеративни заболявания или злокачествени новообразувания. Сред ключовите молекули, участващи в некроптотичния процес, са белтъците RIPK1 и RIPK3, формиращи некрозомата, и псевдокиназата MLKL, явяваща се неин основен ефектор. RIPK1 присъства постоянно както в ядрото, така и в цитоплазмата, докато RIPK3 и MLKL се намират в непрекъснато движение между тези две клетъчни структури. Експерименталното фармакологично блокиране на транспортния механизъм води до невъзможност за образуване на некрозомата и по този начин се постига предотвратяване на клетъчната смърт.

ABSTRACT

Necroptosis is a necrotic form of programmed cell death with potent immunogenicity that is involved in complex interactions with other types of cell death such as autophagy and apoptosis. There is growing evidence that necroptosis is involved in the regulation of various normal physiological processes, especially during the development of organisms. In addition, deregulated signaling pathways involved in the control of necroptosis are thought to underlie many human diseases, such as viral or bacterial infections, ischemic-reperfusion injury, neurodegenerative diseases, or malignancies. Among the key molecules participating in the necroptotic process are the RIPK1 and RIPK3 proteins, forming the necrosome, and the pseudokinase MLKL, which is its main effector. RIPK1 is constitutively present in both the nucleus and cytoplasm, while RIPK3 and MLKL perform continuous shuttling transport between these cell structures. Experimental pharmacological blocking of the transport mechanism leads to the impossibility of necrosome formation and thus prevention of cell death is achieved.

Suppression of cell death is a hallmark of malignant tumors. While the mechanism by which tumor cells avoid apoptosis has been well studied, information on how necroptosis is controlled by oncogenic signals in cancer cells is scarce. Many types of malignant cells have defense mechanisms against necroptot-

Потискането на клетъчната смърт е отличителен белег на малигнените тумори. Докато механизмът, чрез който туморните клетки избягват апоптозата, е добре проучен, информацията за това как некроптозата се контролира от онкогенните сигнали в туморните клетки е оскъдна. Много видове малигнени клетки имат защитни механизми срещу некроптотичните процеси чрез разработване на системи, които могат да потискат компонентите, участващи в некроптозата. Фармацевтичното повлияване на формирането на некрозомата би дало възможност за инхибиране на канцерогенезата чрез потенциране на некроптозата и неутрализиране на антинекроптотичните механизми, които редица малигнени тумори еволюционно са придобили. Задълбоченото изучаване на този процес може както да разкрие маркери с важно прогностично значение в онкологията, така и може да определи клетъчни протеини като молекулни мишени в персонализираната медицина.

Ключови думи: некроптоза, RIPK1, RIPK3, MLKL, злокачествени тумори

ic processes by developing systems that can suppress the components involved in necroptosis. Pharmaceutical influence on the formation of the necrosome would make it possible to inhibit carcinogenesis by potentiating necroptosis and neutralizing the antinecrototic mechanisms that a number of malignant tumors have evolutionarily acquired. In-depth study of this process can both reveal markers of important prognostic value in oncology and can identify cellular proteins as molecular targets in personalized medicine.

Keywords: necroptosis, RIPK1, RIPK3, MLKL, cancer

ВЪВЕДЕНИЕ

Клетъчната смърт и оцеляване, клетъчната пролиферация и диференциация са основни процеси в живите организми. Клетъчната смърт играе ключова роля в ембрионалното развитие за елиминиране на излишните клетки при формиране на тъканите и органите, участва в поддържане на тъканната хомеостаза и в отстраняване на увредените клетки, представляващи заплаха за възрастния организъм. Тя е естествен изход на клетъчния цикъл, до който се достига след сложни молекулярни механизми. Може да настъпи при премахване на остарелите клетки, които са заменени от нови, или да е предизвикана от патологични фактори като заболяване, локализирана увреда или смърт на организма.

Видове клетъчна смърт

Първоначално клетъчната смърт е разделена на три типа: тип I (апоптоза), тип II (автофагия) и тип III (некроза) (10). През последните години бяха идентифицирани много нови видове клетъчна смърт, различаващи се по предизвикващите ги стимули, молекулярни механизми и морфологичен вид. Някои от тези видове притежават припокри-

ващи се, но не идентични сигнални пътища, поради което не могат да бъдат включени в една от трите посочени категории. През 2018 г. Комитетът по терминология на клетъчната смърт публикува списък с много различни типове клетъчна смърт, различаващи се помежду си по молекулярните им механизми на възникване (9). Yan et al. (2020) представят опростена класификация на различните видове клетъчна смърт, като ги разделя на две групи в зависимост от инициращия ги фактор – програмирана клетъчна смърт (ПКС) и непрограмирана клетъчна смърт (неПКС) (32). ПКС може допълнително да се подраздели на апоптотична и неапоптотична клетъчна смърт. Програмираната апоптоза се представя с апоптоза и анойкис. Програмираната неапоптотична клетъчна смърт включва множество механизми и фенотипове като клетъчна смърт, свързана с вакуолизиране на клетката (автофагия, ентоза, метуоза и парптоза), клетъчна смърт, зависима от митохондрии (митоптоза и партанатос), желязо-зависима клетъчна смърт (фероптоза),

имуно индуцирана клетъчна смърт (пироптоза и NETоза), както и други видове като некроптоза. Накрая трябва да се спомене и некрозата, която представлява форма на не програмирана клетъчна смърт.

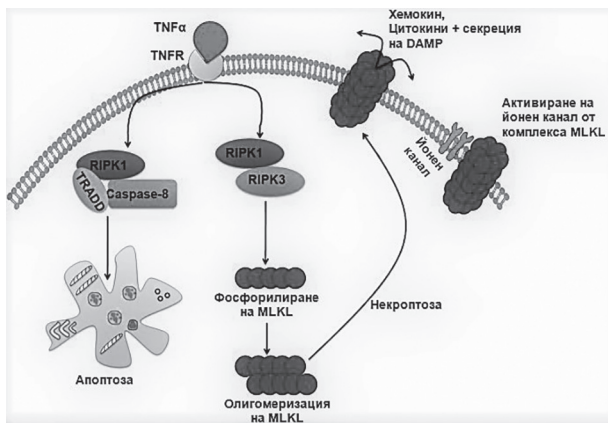
Некроптоза

През последните 10 години некроптозата, открита наскоро форма на регулирана клетъчна смърт, е обект на задълбочени проучвания (8). Докато некрозата отдавна се приема за непрограмиран вариант на клетъчна смърт, през последното десетилетие беше открита форма на клетъчна смърт с морфологични белези на некроза, която обаче се регулира по програмиран начин чрез определени пътища за сигнално предаване. Съществуват все повече доказателства, че некроптозата участва в регулирането на различни физиологични процеси и в нормалното развитие на организмите. Допуска се, че нарушения в регулацията на сигналните пътища, участващи в контрола на некроптозата, са в основата на много заболявания при хора, като вирусни и бактериални инфекции, исхемично-реперфузионно увреждане, невродегенеративни заболявания и злокачествени новообразувания (7). По тази причина е напълно обяснимо задълбоченото изследване на тази форма на клетъчна смърт и по-специално на нейното участие при малигнените тумори.

Молекулярни механизми на некроптозата

Большинството от проучванията са насочени към изследване на тумор-некротизиращия фактор алфа (TNF α), рецептор взаимодействащата протеин киназа 3 (RIPK3) и каспаза-8, за да се разбере молекулярният механизъм на некроптозата. Последната може да бъде инициирана от TNF рецепторната суперфамилия, Toll-like рецептори (TLR3 и TLR4), интерферон рецептори и др. Тумор-некротизиращ фактор рецептор 1 (TNFR1) медираната некроптоза е най-добре проучена. В зависимост от предизвикващите я фактори некроптозата се разделя на три категории: външна некроптоза, стимулирана от TNF α , вътрешна некроптоза, която се инициира от реактивни кислородни радикали (ROS), и исхемично медирана вътрешна некроптоза (2,3,8). TNF α -медираната некроптоза е класически пример за този вид програмирана клетъчна смърт, при която TNF α се свързва със своя комплементарен рецептор на клетъчната мембрана, което води до образуване на краткотраен мембранен сигнален комплекс (известен като комплекс I). Последният е изграден от белтъци, които имат death (смъртен) домейн (TRADD), Fas-свързан death домейн (FADD),

RIPK1, TNFR-свързани фактори (TRAF), като TRAF2/TRAF5 и клетъчен инхибитор на апоптозен белтък 1 и 2 (cIAP1/cIAP2). TRADD е адапторна молекула, включваща RIPK1 към TNFR1 (16,11). Следва присъединяване на cIAP1, cIAP2 и TRAF2/3/5 към комплекс I (28). Вече активирани, cIAP1/2 и TRAF2/5 спомагат за убиквитинирането на RIPK1, което води до образуване на стабилен комплекс I и се инициира алтернативен път, като NF- κ B- и MAPK-медиран път, завършващ с оцеляване на клетката (18). Сигнализирането от NF- κ B играе ключова роля в противодействието на цитотоксичния ефект на TNF α , а насочващият към оцеляване ефект на NF- κ B се медира от cIAP1/2 и cFLIPL (клетъчен FLICE-подобен инхибиторен протеин) (14,22). Следователно комплекс I е от решаващо значение за оцеляването на клетките и некроптозата (21). Обикновено апоптозата се инхибира от образуването на хетеродимер на каспаза-8 и cFLIPL, което води до инактивиране на каспаза-8. Последната индуцира екзогенната апоптоза и дезактивира некроптозата чрез потискане на активността на RIPK3 и RIPK1. Елиминирането или инхибирането на каспаза-8 води до активиране на RIPK1 чрез деубиквитиниране, медирано от тумор-супресорния ензим цилиндроматоза (CYLD), като по този начин дестабилизира комплекс I (20,23). Премахването на убиквитиновата верига от RIPK1 предизвиква нейното взаимодействие с FADD, TRADD, RIPK3 и каспаза-8, което в крайна сметка води до образуване на комплекс II. RIPK1 взаимодейства с RIPK3 чрез рецепторен хомоложен домейн (RHD), което спомага за формиране на некрозома, която впоследствие инициира сигнализирането надолу по веригата, което накрая завършва с некроптоза (31). Въпреки че и двете рецептор-взаимодействащи протеин-кинази са необходими за индуциране на последната, RIPK3 може и сам да я стимулира, когато е свърхекспресиран в клетките (5). При активиране RIPK3 фосфорилира псевдокиназата MLKL (смесена линия на киназен домейно-подобен протеин), което играе ключова роля в предизвикването на некроптоза. MLKL действа по два начина: I. Като платформа в плазмената мембрана за активиране на Na⁺ или Ca⁺⁺ канали или II. Увеличава формирането на пори в плазмената мембрана чрез взаимодействие с аминокрая на фосфотидил инозитол фосфата (фиг. 1) (26,1). Wang et al. (2012) съобщават за ролята на митохондриалната молекула PGAM (фосфатаза фосфоглицерат мутаза) 5 при некроптоза (29). Значението на PGAM-5 все още е спорно, тъй като много проучвания показ-



Фиг. 1. Молекулярни механизми на апоптозата и некроптозата. Адаптирано по Dhuriya, Sharma, 2018г. (4)

ват, че дори пълното изчерпване на митохондриите не повлиява процеса на некроптоза (27).

Взаимодействие между компонентите на некроптозата в клетката

Както вече беше споменато, участниците в сигналния път на некроптозата се приближават едни към други с цел сглобяването на цитозолна сигнална платформа, наречена некрозома, която води до активирането на нейния ефектор надолу по веригата, MLKL. RIPK1 и RIPK3, ключови компоненти на некрозомата, действат като сигнални междинни продукти за активиране на MLKL. Weber et al. (2018) съобщават, че RIPK3 и MLKL непрекъснато се движат между ядрото и цитоплазмата, докато RIPK1 присъства постоянно и на двете места. По време на TNF-индуцирана некроптоза ядреният RIPK1 става убиквитиран, като по този начин служи за скеле за активиране на ядрената RIPK3 киназа. След нейното фосфорилиране RIPK3 се свързва с MLKL, което води до фосфорилиране на MLKL. След това фосфорилираните RIPK3 и MLKL се изна-

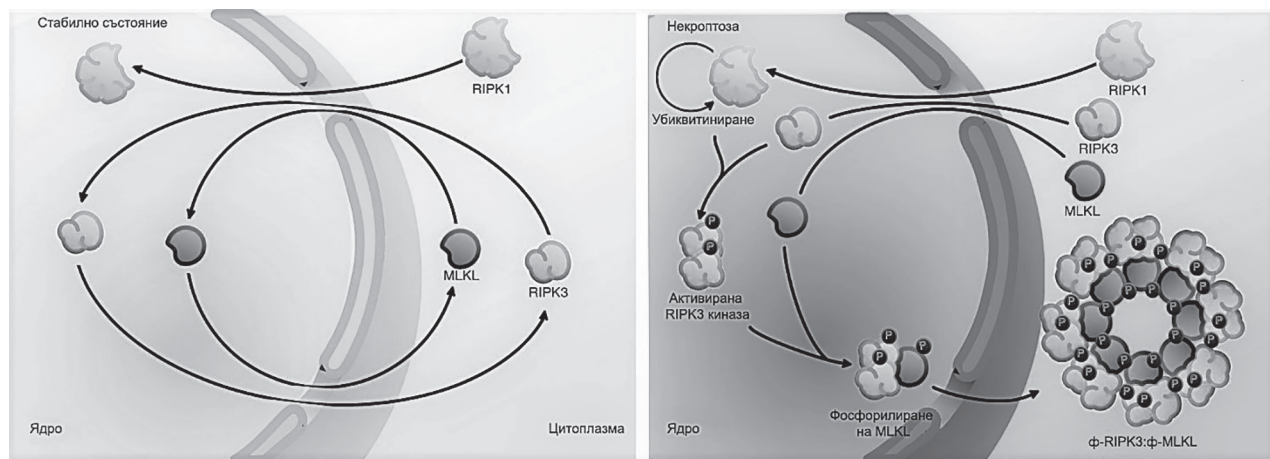
сят заедно от ядрото, за да осъществят образуването на цитозолната некрозома и следователно да предизвикат клетъчната смърт (фиг. 2).

По данни на Weber et al. (2018) фармакологичното инхибиране на ядрения експортен механизъм води до задържане на RIPK3 и MLKL в ядрото, предотвратява процеса на цитозолната RIPK3/MLKL олигомеризация и по този начин намалява клетъчната смърт. Техните резултати предполагат, че преминаването на некроптолитични сигнални компоненти през ядрото е механизъм за регулиране на образуването на цитозолна некрозома и следователно некроптолитична клетъчна смърт.

Инхибирането на клетъчната смърт е отличителен белег на малигнените тумори. Докато механизмът, чрез който туморните клетки избягват апоптозата, е добре проучен, информацията за това как некроптозата се контролира от онкогенните сигнали в раковите клетки е оскъдна (25). Много видове малигнени тумори избягват некроптозата чрез изработване на сигнални молекули, които могат да потискат компонентите, участващи в некроптозата, като RIPK3, което се случва вероятно на епигенетично, посттранскрипционно и посттранслационно ниво. Тези наблюдения косвено показват, че в хода на туморната прогресия се селектират неопластични клетки, притежаващи антинекроптолитични механизми, което им осигурява оцеляване, но също така дава възможност за манипулиране на некроптозата с цел инхибиране на туморния растеж (15).

Роля на некроптозата при туморния растеж

Последните резултати от някои клинични проучвания затвърждават схващането, че некроптозата подпомага естествения или индуци-



Фиг. 2. Състояние на некроптолитичните сигнални компоненти в покой и при активиране на некроптозата. Адаптирано по Weber et al., 2018 г. (30)

рания от терапия противотуморен имунен отговор. При 112 пациенти с колоректален карцином имунохистохимичният анализ на злокачествените клетки установява намалени нива на RIPK3 в сравнение със съседните нетуморни клетки, а ниската експресия на RIPK3 представлява независим прогностичен фактор за обща преживяемост и преживяемост без заболяване (6,17). По подобен начин CD34+ бласти от костен мозък на 31 пациенти с остра миелоидна левкемия показват намалени нива на RIPK3-кодираща иРНК в сравнение със CD34+ клетки от костен мозък на здрави донори (19). Подобни промени са установени и при карцином на гърдата, при който независимо от туморния подтип, експресията на RIPK3 е понижена в туморната тъкан на всичките 75 пациенти и това е свързано с повишено метилиране на RIPK3 (13). Авторите на последното изследване анализират данните от експресията на RIPK3 от 6 предходещи проучвания, които включват 1166 жени с карцином на гърдата и установяват, че пациентите с по-висока от средната експресия на RIPK3-кодираща иРНК имат по-голяма вероятност за преживяемост без прогресия за 10-годишен период.

MLKL, един от ключовите регулатори на апоптозата, се експресира в по-голяма степен в неопластичните клетки на 54 пациенти с цервикален плоскоклетъчен карцином в сравнение с нормалните тъкани от шийката на матката. Повишената му експресия се свързва с по-висока степен на диференциация на туморите, ограничена метастатична дисеминация и по-добра обща преживяемост (24). Аналогично на представените данни, ниските нива на MLKL корелират с намалена обща преживяемост и намалена преживяемост без заболяване при проследяване на 80 пациенти с аденокарцином на панкреаса, които са били подложени на операция и незадължителна адювантна химиотерапия, както и при 153 жени с резектабилен първичен карцином на яйчниците (12). Независимо че изследванията за MLKL са все още в начален стадий, изглежда че нивата на експресия на основните участници в некроптозния механизъм, като RIPK3 и MLKL, имат прогностична стойност при пациенти с различни неоплазми. Необходими са допълнителни проучвания върху големи групи от пациенти, за да се потвърдят и разширят познанията за некроптозата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Некроптозата представлява некротична форма на програмирана клетъчна смърт с мощна

имуногенност, която участва в сложно взаимодействие с други видове клетъчна смърт като автофагия и апоптоза. Все повече се увеличават доказателствата, които показват, че тя играе жизненоважна роля при прогресията и метастазирането на туморите, имунната реакция срещу злокачествените клетки и в прогнозата на пациентите с малигнени заболявания. Стимулирането на некроптозата чрез различни медикаменти и химични съединения, предизвикващи или манипулиращи некроптотичния път, се очертава като нов подход за преодоляване на резистентността на туморните клетки към апоптоза и поддържане на антитуморния имунитет при лечението на злокачествените заболявания.

Благодарности: Статията е резултат на изследванията по проект № 19004, извършени в рамките на научноизследвателската дейност към МУ-Варна, финансирана целево от държавния бюджет.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang HC, Choksi S, Liu J, et al. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol.* 2014;16:55–65.
2. 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;1:112–9.
3. Degterev A, Hitomi J, Gemscheid 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;4:313–21.
4. Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *J Neuroinflammation.* 2018;199.
5. Dondelinger Y, Aguilera MA, Goossens V, Dubuisson C, Grootjans S, Dejardin E, et al. RIPK3 contributes to TNFR1-mediated RIPK1 kinase-dependent apoptosis in conditions of cIAP1/2 depletion or TAK1 kinase inhibition. *Cell Death Differ.* 2013;20:1381–92.
6. 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.
7. Fulda S. The mechanism of necroptosis in normal and cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2013;14(11):999-1004.
8. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S et al.

- Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19:107-20.
9. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25:486-541.
 10. Green DR and Llambe F. Cell death signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(12):a006080.
 11. Han J, Zhong CQ, Zhang DW. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat Immunol.* 2011;12:1143-9.
 12. He L, Peng K, Liu Y, Xiong J, Zhu FF. Low expression of mixed lineage kinase domain-like protein is associated with poor prognosis in ovarian cancer patients. *Oncotargets Ther.* 2013;6:1539-43.
 13. Koo GB, Morgan MJ, Lee DG, Kim WJ, Yoon JH, et al. Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics. *Cell Res.* 2015;25:707-25.
 14. Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H. NF- κ B inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol.* 2001;21:3964-73.
 15. Lee EW, Seong D, Song J. Cytoplasmic MYC is an anti-necroptotic protein. *Molecular & Cellular Oncology.* 2020; Volume 7: Issue 6
 16. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell.* 2003;114:181-90.
 17. Moriwaki K, Bertin J, Gough PJ, Orłowski GM, Chan FK. Differential roles of RIPK1 and RIPK3 in TNF-induced necroptosis and chemotherapeutic agent-induced cell death. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1636.
 18. Newton K, Dugger DL, Wickliffe KE, Kapoor N, de Almagro MC, Vucic D, et al. Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science.* 2014;343:1357-60.
 19. Nogue AL, El Bouazzati H, Hetuin D, Berthon C, Loyens A, et al. RIP3 is downregulated in human myeloid leukemia cells and modulates apoptosis and caspase-mediated p65/RelA cleavage. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1384.
 20. O'Donnell MA, Perez-Jimenez E, Oberst A, Ng A, Massoumi R, Xavier R, et al. Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nat Cell Biol.* 2011;13:1437-42.
 21. 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.
 22. Papa S, Zazzeroni F, Bubici C, Jayawardena S, Alvarez K, Matsuda S, et al. Gadd45 [beta] mediates the NF-[kappa] B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol.* 2004;6:146-53.
 23. Pop C, Oberst A, Drag M, Van Raam BJ, Riedl SJ, Green DR, Salvesen GS. FLIPL induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity. *Biochem J.* 2011;433:447-57.
 24. Ruan J, Mei L, Zhu Q, Shi G, Wang H. Mixed lineage kinase domain-like protein is a prognostic biomarker for cervical squamous cell cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:15035-38.
 25. Su Z, Yang Z, Xie L, DeWitt JP, Chen Y. Cancer therapy in the necroptosis era. *Cell Death Differ.* 2016;23:1-2.
 26. Sun X, Lee J, Navas T, Baldwin DT, Stewart TA, Dixit VM. RIP3, a novel apoptosis-inducing kinase. *J Biol Chem.* 1999;274:16871-5.
 27. Tait SW, Oberst A, Quarato G, Milasta S, Haller M, Wang R, et al. Widespread mitochondrial depletion via mitophagy does not compromise necroptosis. *Cell Rep.* 2013;5:878-85.
 28. Vandenabeele P, Galluzzi L, Berghe TV, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:700-14.
 29. Wang Z, Jiang H, Chen S, Du F, Wang X. The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell.* 2012;148:228-43.
 30. Weber K, Roelandt R, Bruggeman I, Estornes Y, Vandenabeele P. Nuclear RIPK3 and MLKL contribute to cytosolic necrosome formation and necroptosis. *Commun. Biol.* 2018;1:6.
 31. Xie T, Peng W, Yan C, Wu J, Gong X, Shi Y. Structural insights into RIP3-mediated necroptotic signaling. *Cell Rep.* 2013;5:70-8.
 32. Yan G, Elbadawi M, Efferth T. Multiple cell death modalities and their key features (Review). *World Acad. Sci. J.* 2020;2: 39-48.

Адрес за кореспонденция:

Мартина Стоева
 Клиника по обща и клинична патология
 УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, ет. 2, каб. 212
 бул. „Христо Смирненски“ 1
 Варна, 9010
 e-mail: martinakitanova@abv.bg