

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Irena Kačinská

Autofagie jako klíčový mediátor benefičních účinků kalorické restrikce

Autophagy as a key mediator of beneficial effects of caloric restriction

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2021

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za trpělivost a rady k vypracování této práce. Chci také poděkovat své rodině, přátelům a svému partnerovi za podporu a empatii.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 5.05.2021

Podpis:

Abstrakt

Kalorická restrikce je ve vědeckém světě již dlouho známá jako život-prodlužující stav a čím dál více důkazů nasvědčuje tomu, že za tyto účinky je mimo jiné zodpovědný efekt aktivace neselektivní autofagie. V této práci budou popsány molekulární mechanismy autofagie při stavu kalorické restrikce a shrnuty její benefiční účinky na stárnutí organismu a různé zdravotní problémy spojené se stárnutím a moderním způsobem života. Taktéž budou zmíněna některá rizika, která by mohla z neodborného zásahu do vlastního těla vyplývat. Nabízí se hypotéza, že praktikování kalorické restrikce pod dohledem odborníka přináší prevenci civilizačních chorob a onemocnění spojených se stárnutím a prodloužení kvalitního života, což by mimo jiné pomohlo snížit náklady na zdravotní a sociální péči.

Klíčová slova: Autofagie, kalorická restrikce, molekulární mechanismy

Abstract

Caloric restriction has long been known in the scientific world as a life-prolonging condition, and there is growing evidence that the effect of activation of non-selective autophagy is responsible for these effects. In this thesis, the molecular mechanisms of autophagy in the state of caloric restriction will be described, as well as its beneficial effects on the aging of the organism and various health problems associated with aging and the modern way of life will be summarized. Some risks that could result from unprofessional intervention in one's own body will also be mentioned. It is hypothesized that practicing caloric restriction under the supervision of an expert brings prevention of diseases of civilization diseases and diseases associated with aging and prolongs quality of life, which would, among other things, help reduce the cost of health and social care.

Keywords: Autophagy, caloric restriction, molecular mechanisms

Obsah

Úvod	1
1. Autofagie	1
1.1. Funkce autofagie	3
1.2. Molekulární mechanismus autofagie	4
2. Kalorická restrikce	7
2.1. Kontinuální kalorická restrikce	7
2.2. FMD	9
2.3. Přerušovaný půst	9
2.4. Dlouhodobý půst	11
3. Regulace autofagie při kalorické restrikci	11
3.1. AMPK	12
3.2. mTORC1	13
3.3. Vliv aminokyselin	13
3.4. Další způsoby regulace	13
4. Benefity autofagie pro organismus	14
4.1. Diabetes mellitus	14
4.2. Neurodegenerativní choroby	15
4.3. Onkologická onemocnění	17
4.4. Kardiovaskulární choroby	19
4.5. Stárnutí	20
4.6. Virová onemocnění, COVID-19	22
5. Možné nepříznivé účinky autofagie na organismus	23
Závěr	24
Seznam Použité literatury	25
Seznam internetových zdrojů	37

Seznam použitých zkratek

AD	Alzheimer's disease, Alzheimerova choroba
ADF	Alternate-day fasting, Půst každý druhý den
AKT	Protein kinase B, Proteinkináza B
AL	ad libitum, dle libosti
AMBRA1	Autophagy And Beclin 1 Regulator 1
AMPK	5'AMP-activated protein kinase, 5'AMP-aktivovaná protein kináza
APC	antigen-presenting cells, antigen-prezentující buňky
APOE-ε4	Alela ε4 pro apolipoprotein E
ATG	autophagy-related gene, gen asociovaný s autofagií
ATP	Adenosine triphosphate, Adenosintrifosfát
BCAA	Branched-chain amino acids, Aminokyselina s rozvětveným řetězcem
BECN1	gen kódující protein Beclin-1
BMI	Body Mass Index, index tělesné hmotnosti
CKR	chronická kalorická restrikce
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
DFCP1	Double FYVE-containing protein 1
DMI	Diabetes mellitus I. typu
DMII	Diabetes mellitus II. typu
DNA	Deoxyribonucleic acid, Deoxyribonukleová kyselina
ER	endoplazmatické retikulum
FIP200	FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa
FMD	fasting-mimicking diet, půst-napodobující dieta
GABARAP	GABA Type A Receptor-Associated Protein
GBM	Glioblastoma multiforme
HOMA-IR	Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance
HOPS	homotypic fusion and vacuole protein sorting
IF	intermittent fastinf, přerušovaný půst
IGF-I	Insulin-like growth factor 1
IKR	intermittent caloric restricrion, přerušovaná kalorická restrikce
IL-6	interleukin-6
KO	kardiovaskulární onemocnění

KR	kalorická restrikce
LAMP-2	lysosome-associated membrane protein-2
LC3	light chain 3
LDL	low density lipoprotein
LIR	LC3-interacting region
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NAD+	Nikotinamidadenindinukleotidový kation
NBr1	Neighbor of BRCA1 gene 1 protein
NFT	neurofibrillary tangles
PAS	pre-autophagosomal structure, pre-autofagozomální struktura
PE	Fosfatidylethanolamin
PI3	Fosfatidylinositol-3
PI3KC3	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3
PI3P	Fosfatidylinositol 3-fosfát
PLEKHM1	Pleckstrin homology domain-containing family M member 1
Rhes	Ras homolog enriched in the striatum
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2
SNAP29	Synaptosomal-associated protein 29
SNARE	SNAP receptor
STX17	Syntaxin 17
TNBC	Triple-negative breast cancer
ULK1	Unc-51 like autophagy activating kinase 1
VAMP8	Vesicle-associated membrane protein 8
VPS34	vacuolar protein sorting class III PI 3-kinase
WIPI2	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2
WT	wild type, divoký typ

Úvod

Půst je velmi stará praxe objevující se v různých náboženstvích i kulturách. Jeho přínosy byly v minulosti vnímány zejména jako spirituálně-očistné, ale jeho zdravotní přínosy rozeznával už Hippokrates v pátém století. Od nástupu intenzivního zemědělství čelí druh Homo sapiens masivnímu nárůstu příjmu potravy, které v jeho evoluci nemá obdoby. Tuto relativně nedávnou a prudkou změnu doprovází civilizační choroby neboli nemoci z blahobytu, jako je diabetes mellitus, hypertenze, obezita, ateroskleróza, Alzheimerova choroba, rakovina a další.

Kalorická restrikce by se mohla ukázat jako levná a všemi dostupná prevence proti civilizačním chorobám, kterým země prvního světa musí dnes čelit. Aktivuje nespočet unikátních metabolických procesů, které mohou přinést mnoho pozitivních efektů, nicméně nejzajímavější z těchto mechanismů je autofagie. Díky stoupající popularitě tohoto vědeckého tématu se o kalorickou restrikci začala zajímat i široká veřejnost. Stoupá povědomí o půstu jako potenciálně ozdravné praxi a čím dál více lidí zkouší efekty kalorické restrikce sama na sobě. V této práci se zaměřím na různé metody kalorické restrikce a jejich relevance pro autofagii, benefity, které by mohly díky autofagii přinést celému organismu a zmíním i případné negativní účinky a potenciální rizika spojená s praktikováním KR za účelem aktivace autofagie bez dohledu odborníka.

1. Autofagie

Eukaryotická buňka za život vyprodukuje spoustu materiálu: strukturních proteinů, enzymů, membrán, nukleových kyselin, organel a mnoho dalších struktur. Každá z nich plní nějaký účel a působí s určitou životností, která může být pro některé molekuly krátkodobá (např. neurotransmitery), a pro jiné dlouhodobá (např. DNA, mitochondrie). Přesahování životnosti může silně zvyšovat riziko poškození a změny dané struktury a tím měnit její fyzikální a chemické vlastnosti, a nakonec i funkci v buňce. Taková situace je silně nepředvídatelná a nekontrolovatelná, může narušovat homeostázu, tvořit těžko odstranitelné shluky, poškozovat buněčné struktury až způsobovat nevratné změny v DNA. Aby v buňce k takovým situacím nedocházelo, je vybavena silně konzervovanými mechanismy degradace opotřebovávaných struktur, zejména proteinů. Část produktů degradace může být znovu využita k postavení nových struktur, a tak má buňka schopnost recyklovat a regenerovat svůj vlastní obsah tak, aby byl udržen co nejdéle funkční. Mezi hlavní degradační mechanismy patří:

- Proteazom-ubiquitinový systém likvidující proteiny s krátkou životností
- Proces autofagie, který degraduje materiál ve velkém pomoci systému lyzozomů

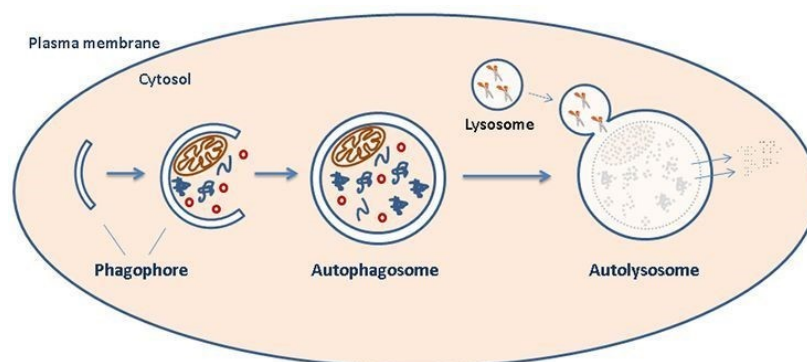
Tyto systémy neustále spolupracují v udržování homeostázy a jsou všechny pro správnou funkci buňky nepostradatelné. Jejich hlubší pochopení by mohlo pomoci podpořit prevenci chorob, které jsou spojené s nahromaděním nefunkčních nebo toxických molekul, či poškozených a pro buňku nebezpečných organel.

Samotná autofagie má 3 formy:

- Autofagie ovládaná chaperony
- Mikroautofagie
- Makroautofagie

Makroautofagie je zodpovědná za většinu intracelulární proteinové degradace a považuje se zejména za ten typ autofagie, který je indukován stresovými podněty včetně hladovění/kalorické restrikce. Proto se budu v této práci věnovat pouze tomuto typu a budu na něj dále odkazovat pouze pojmem autofagie.

Proces autofagie lze pro zjednodušení rozdělit na tři fáze. V první, iniciační fázi, se tvoří dvouvrstvá membrána, fagofor (viz obrázek 1). Membrána se v elongační fázi prodlužuje, obaluje úsek cytoplazmy obsahující proteiny, organely a jiné částice a splývá ve dvouvrstvý váček uzavírající úsek cytoplazmy určený k degradaci – autofagozom. Ve fázi elongace je možnost selekce materiálu pro degradaci, v takovém případě jde o autofagii selektivní. Po formaci autofagozomu začíná maturační fáze, kdy dochází k úpravám jeho povrchu, oddělování enzymů a přípravu na fúzi s lysozomem. Fúzí autofagozomu a lysozomu vzniká autolysozom a začne tím degradační fáze, kdy veškerý materiál uvnitř vnější membrány degraduje a jeho stavební prvky mohou být využívány. Díky tomuto procesu buňka dokáže likvidovat nejen vlastní kompartmenty, které jsou nefunkční, škodlivé či jiným způsobem nežádoucí, ale také intracelulární patogeny (Y. Choi et al., 2018).



Obrázek 1. Zjednodušené schéma procesu autofagie [1]

Tato práce je založena na předpokladu zvýšené aktivity autofagie po navození hladovějících nebo kaloricky restriktivních podmínek. Tento předpoklad potvrzuje například vizualizace pomocí

fluorescenčně značeného LC3 proteinu, který odráží míru autofagie v pozorovaných tkáních. Už 24 hodin hladovění navozuje zvýšený průběh autofagie v játrech, ledvinách, pankreatu a svalových buňkách (Mizushima et al., 2004). Autofagie byla spojena s hladověním ještě před hlubšími znalostmi její regulace, a to díky pozorování inhibičního efektu inzulínu (Pfeifer & Warmuth-Metz, 1983) a stimulačního efektu glukagonu (Deter et al., 1967) na tvorbu autofagosomů v myších a krysách. Oba tyto efekty jasně ukazují, že autofagie je silně regulována příjmem potravy.

1.1. Funkce autofagie

Autofagie má tolik funkcí v buňce, že se považuje za nástroj udržování homeostázy. Může být selektivní, nebo hromadná neboli neselektivní. Selektivní autofagie, jak už název napovídá, dokáže cíleně vybrat objekty k degradaci, které jsou pro buňku nepotřebné nebo nebezpečné. Selektivně můžou být odstraňovány proteinové agregáty, intracelulární patogeny, lipidové kapénky, endozomy, nepotřebné peroxizomy či ribozomy, poškozené mitochondrie nebo i části endoplazmatického retikula (Zaffagnini & Martens, 2016). Selektivní autofagie se jeví běžnou součástí života buňky a na bazální úrovni probíhá téměř neustále.

I přesto, že jsou tyto typy autofagie aktivovány různými podněty, sdílejí velmi podobný mechanismus lišící se nejvíce ve způsobu výběru svého „nákladu“. Selektivní autofagie potřebuje k úspěšné selekci splněná tři kritéria: cílový náklad musí být úspěšně rozeznán, musí být následně úspěšně navázán do elongujícího fagoforu, a nežádoucí náklad musí být vyloučen. Toho je dosaženo pomocí autofagických receptorů, které rozeznávají ubiquitin nebo přímo funkční skupiny nákladu (Khaminets et al., 2016) a po rozeznání žádoucích skupin je vážou. Tyto receptory jsou ukotveny v membráně fagoforu pomocí proteinů rodiny Atg8 (u savců jsou to proteiny skupin GABARAP a LC3) (Behrends & Fulda, 2012).

Podle typu nákladu autofagozomu bylo rozlišeno spousta typů specializovaných autofagií. Váčky mohou téměř výlučně obsahovat mitochondrie (mitofagie), proteinové agregáty (agrefagie), patogenní organismy nebo jejich části (xenofagie, virofagie), ribozomy (ribofagie), liposomy (lipofagie), endoplazmatické retikulum (retikulofagie) a mnoho dalších typů materiálu (Khaminets et al., 2016).

Například xenofagie hraje důležitou roli v adaptivní imunitě proti intracelulárním patogenům. Díky spolupráci s intracelulárními receptory pro molekulární vzory dokáže fagofor selektivně vybírat molekuly identifikované jako patogenního původu a ty zahrnout do tvorby autofagozomu. Degradovaný materiál patogenů se potom využívá při prezentaci antigenů na antigen-prezentujících receptorech (Y. Choi et al., 2018).

Mitofagie je obranný mechanismus buňky před opotřebovanými mitochondriemi, které by mohly ohrožovat homeostázu reaktivními formami kyslíku nebo nechtěnému propouštění mitochondriálních proteinů do cytoplazmy (Rubinsztein et al., 2012).

Dále se budu zaměřovat především na neselektivní autofagii, neboť právě ta je aktivována kalorickou restrikcí. Savci využívají neselektivní autofagii k přežití nedostatku potravy už od narození, kdy díky autofagii přečkávají čas mezi placentální výživou a prvním příjmem mléka. V určitých tkáních je první den po porodu prudce zvýšená exprese Atg. Pokud například neonatální myši postrádají gen ATG5 (jeden z genů asociovaných s autofagií), je u nich pozorována úplná absence autofagie, takže se tito jedinci nedokážou přizpůsobit krátkodobému nedostatku živin a nanejvýš den po vrhu zahynou (Kuma et al., 2004). Při současné inhibici autofagie a omezení příjmu energie savčích buněk in vitro byla pozorována zvýšená míra apoptózy (Boya et al., 2005). Bez autofagie buňka přichází o důležitou schopnost správné reakce ve stresových podmínkách, tj. zastavit růst a „plýtvání“ zdroji a místo toho šetřit a recyklovat. Takové buňky nejsou schopny udržet homeostázu, a proto jsou v určitých podmínkách neživotaschopné a podstupují apoptózu.

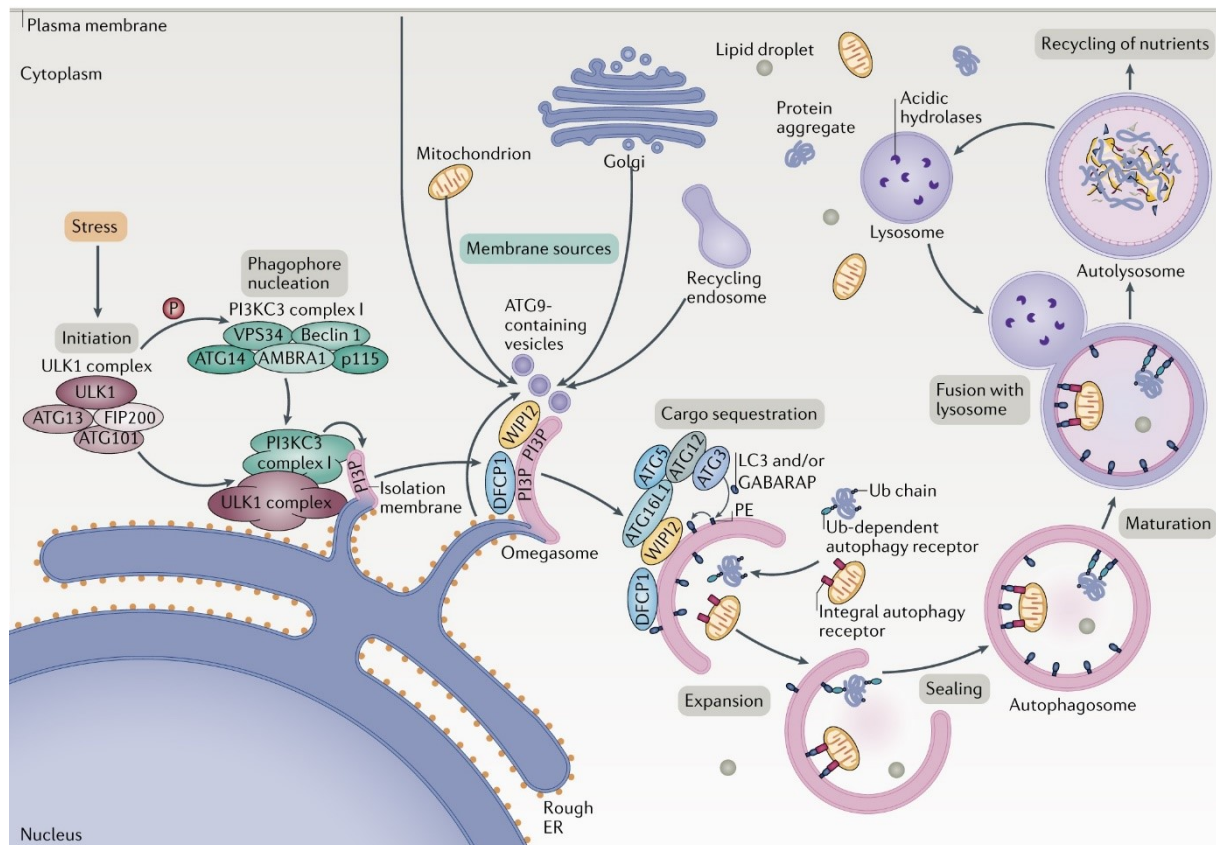
Chronicky nedostatečná funkce signalizace, iniciace či samotného průběhu autofagie byla spojena s mnoha chorobami, zahrnujícími neurodegenerativní onemocnění jako je Alzheimerova a Parkinsonova choroba a také některé typy rakovin (Zachari & Ganley, 2017), avšak některé studie poukazují, že určité typy rakovin jsou na autofagii závislé jako na strategii přežití a léčba rakoviny může jako vedlejší efekt dokonce autofagii podporovat, což může mařit snahy o léčbu. U těchto typů nádorů může farmakologického potlačování autofagie pomoci vůči zabránění vzniku rezistence nádoru (J. Y. Guo et al., 2011). To, jestli je potřeba při léčbě rakovin autofagii inhibovat nebo naopak stimulovat, je vysoce závislé na kontextu.

1.2. Molekulární mechanismus autofagie

Mechanismus průběhu autofagie je intenzivně studován, ale u savců je spousta věcí ještě nejasných. U kvasinek bylo nalezeno nejméně 30 „Atg“ proteinů asociovaných s autofagií. Jsou to proteiny nezbytné pro každou fázi autofagie a jsou napříč eukaryotními organismy konzervovány, proto nalezneme spousta analogů i u savců a zhruba u poloviny případů nesou i stejné pojmenování, jako u kvasinek (Mizushima et al., 2002), přičemž se píšou velkými písmeny („ATG“). V této práci se zaměřím hlavně na savčí mechanismus.

V současné době se většina výzkumníků přiklání k názoru, že u savců se začátek vzniku membrány budoucího autofagozomu odehrává na ER na místě zvaném PAS (Yu et al., 2018). Poté, co se buňka ocitne ve stresovém stavu v důsledku nedostatku živin (především aminokyselin a cukrů), aktivují se příslušné stresové signály, například inaktivace mTORC1 (viz Regulace autofagie při kalorické

restrikci), které vedou ke společnému bodu, a to k aktivaci komplexu ULK1. Komplex ULK1 (homolog kvasinkového Atg1) se skládá z proteinu ULK1, ATG13, FIP200 a ATG101. Je to kináza, která fosforylací aktivuje komponenty kinázového komplexu PI3KC3 a tím je přiměřeně vytvořit terciární strukturu (Dikic & Elazar, 2018). Aktivní PI3KC3 obsahuje PI3 kinázu třídy III, VPS34, Beclin1, ATG14, AMBRA1 a p115.



Obrázek 2: Molekulární schéma průběhu autofagie (Dikic & Elazar, 2018)

Poskládaný a aktivní komplex PI3KC3 přeměňuje fosfatidylinositol v membráně PAS na PI3P. Molekuly PI3P membránu ohýbají do kulovitého tvaru, čímž vytvářejí morfologicky odlišitelnou strukturu zvanou omegazom (od tvaru písmene omega) (Axe et al., 2008). Od této chvíle je omegazom ve fázi elongace a rekrutování materiálu určeného k degradaci. Omegazom dostává „membránové dávky“ cestou vezikulů, označených transmembránovým ATG9, původem z trans-Golgiho komplexu, z endozomů, z mitochondrií, (Hailey et al., 2010) či ze samotné cytoplazmatické membrány. Při hladovějících podmínkách se však ATG9 vezikuly syntetizují de novo, neboť je autofagie při nedostatku živin silně zvýšená a vezikuly z membránových organel by zvýšenou poptávkou nestačily naplnit (Yamamoto et al., 2012, s. 9). Prodlužováním omegazomu do prostoru vzniká dvoumembránový výběžek takzvané „izolační membrány“, které se také říká fagofor.

Po dostatečném prodloužení membrány již není spojení s ER nutné a v průběhu elongace je přerušeno, fagofor je tak uvolněn do cytosolu.

PI3P na sebe navazují efektorové proteiny WIPI2 a DFCP1, které navazují ATG proteiny zajišťující další elongaci fagoforu a navazování materiálu v cytoplazmě dovnitř budoucího autofagozomu. Protein WIPI2 zajišťuje připojení komplexu proteinů ATG12-ATG5-ATG16L1 (Yu et al., 2018), který způsobuje konjugaci proteinů rodiny ATG8 (u savců to jsou proteiny skupin LC3 a GABARAP) k membránovým PE, čímž je ukotvují v membráně fagoforu. LC3 proteiny jsou při konjugaci k PE pozměněny z LC3-I na LC3-II, které se nacházejí typicky pouze na autofagních membránách (Dikic & Elazar, 2018). Obsahují vazbovou skupinu, která váže LIR sekvenci na některých receptorech, díky čemuž dokážou selektovat náklad a navazovat další součásti nezbytné pro autofagii. Obě skupiny ATG8 jsou schopné prostřednictvím autofagních receptorů navazovat ubiquitínované struktury. GABARAP navíc specificky rozeznávají autofagní receptory p62 nebo NBr1, a tím také přispívají k selektivní autofagii, avšak jsou nezbytné zejména k hromadné autofagii (Szalai et al., 2015).

Splynutím okrajů fagoforu vznikne dvoumembránový útvar – autofagozom. K zacelení autofagozomu přispěly mimo jiné proteiny ATG8. Savčí autofagozom má velikost v rozmezí 0.5–1.5 μm (narozdíl od kvasinek s velikostí 500–900 nm). (Mizushima et al., 2002). Uzavřením začíná maturace autofagozomu. Některé efektorové proteiny (WIPI2, DFCP1) a ATG odpadávají z vnější membrány a probíhá příprava na splynutí s lysozomem. Autofagozom migruje k lysozomu po vláknech cytoskeletu pomocí kinesinů a dyneinů na mikrotubulech, nebo po aktinových vláknech pomocí myosinu-VI (Yu et al., 2018).

Fúze s lysozomem probíhá pomocí interakce proteinů komplexu HOPS ležících na lysozomu s proteinem SNARE STX17. HOPS váže pouze STX17 a tím zajišťuje fúzi částečně specificky s autofagozomem. Pro zajištění úplné specifity se fúze zúčastní mnoho adaptorových proteinů, například PLEKHM1, který asociuje s LC3/GABARAP na autofagozomu a zároveň asociuje s HOPS komplexem na straně lysozomu, čímž přispívá k vazbě těchto dvou membrán (McEwan et al., 2015) a umožňuje vzájemnému navázání SNARE proteinů. SNAP29 a VAMP8 se proplétají s STX17 a tvoří typický trans-SNARE komplex. Spojení je ještě stabilizováno ATG14 proteinem z autolysozomu.

Po fúzi vnější membrány autofagozomu s lysozomem vzniká autolysozom, v němž probíhá působením lysozomálních acidických hydroláz degradace vnitřní membrány společně s jejím obsahem.

Degradační produkty jsou transportovány skrz membránu pomocí transportérových proteinů (Bento et al., 2016) do okolní cytoplazmy. Objem autolysozomu se zmenšuje a jeho membrána se postupně odlučuje, recykluje a vrací do svých původních organel v malých membránových dávkách.

2. Kalorická restrikce

Myšlenka o zmenšeném kalorickém příjmu jako prostředek k lepšímu zdraví je jistě starší než dohledatelné zdroje, ale jedna z prvních vědeckých publikací věnujících se tomuto tématu se datuje už v roce 1917 (Osborne et al., 1917). Od té doby se toto téma zkoumá nejen na modelových organismech. Stále je pro tyto pokusy nejoblíbenějším organismem *Saccharomyces cerevisiae*, ale i na savcích studie dokládají, že omezení kalorického příjmu přispívá ke zpomalení nástupu onemocnění spojených se stářím, menší mortalitě spojené s těmito onemocněními, k menšímu výskytu spontánně vzniklých rakovin a delšímu průměrnému životu jedince (Colman et al., 2014; Halagappa et al., 2007; Mattison et al., 2017; Weindruch & Walford, 1982).

Pojem „kalorická restrikce“ je velmi široký. V podstatě jakékoliv zmenšení přísunu kalorií oproti doporučené denní dávce lze považovat za kaloricky restriktivní jídelníček. Ve výzkumech s KR se pokusné organismy rozdělují na skupiny s různou mírou restrikce kalorií nebo obsahují pouze jednu KR skupinu. Samozřejmě výsledky porovnáváme s kontrolní skupinou s přísunem kalorií dle libosti (*ad libitum*) nebo s kontrolovaným přísunem odpovídajícím vypočítanému množství doporučených kalorií podle bazálního metabolismu a případně jiných faktorů.

Důležité je dodat, že ve výzkumech není žádoucí, aby byly výsledky zkresleny účinky způsobenými podvýživou, obzvláště u skupin s větší restrikcí kalorií. Proto je KR jídelníček sestaven tak, aby obsahoval vyšší koncentraci esenciálních živin, a tím restrikci množství potravy kompenzoval. Tento princip by se měl uplatňovat u výzkumů, jejichž předmětem je samotná kalorická restrikce (Mattison et al., 2017). Některé však neomezují porci kalorií, ale časy, kdy k příjmu potravy dochází, a tím dosahují různě dlouhé 100% kalorické restrikce. KR má ve studiích mnoho forem a každá z nich je pro autofagii relevantní jiným způsobem.

2.1. Kontinuální kalorická restrikce

Dlouhodobá kalorická restrikce je základní a nejčastěji používaný model pro vyvolání typických metabolických procesů v reakci na KR. Dnes je otevřeně přijímána jako šetrná nefarmakologická a negenetická metoda přinášející prodloužení délky života a zpomalení nástupu chorob napříč eukaryotickými druhy (Aris et al., 2013; Colman et al., 2014; Halagappa et al., 2007; Mattison et al., 2017; Wang et al., 2005). Nejčastější restrikce kalorií se pohybuje v míře 25 - 40 %, ale některé pokusy začínají už na 10 %. KR se praktikuje každý den a to dlouhodobě, v řádu měsíců až let. Výsledky jsou vesměs přínosné pro zdraví a bez vedlejších účinků.

Pokusy s KR se nejčastěji provádí na myších, ale najdeme i několik výzkumů využívajících opice *Maccaca mulatta*, které se v zajetí dožívají průměrně 30 let. Jedna ze studií na tomto druhu

předvedla u 30% KR (nasazená v mladém dospělém věku) výrazné zmenšení úmrtnosti z onemocnění spojenými se stářím (26 %) oproti kontrolní skupině s neomezenou potravou (63%). Skupina KR se také dožívala určitého věku (20, 25, 30 let) ve vyšším počtu než kontrolní skupina, a to jak z příčin souvisejících se stářím, tak i ze všech možných příčin zahrnujících také akutní a neočekávané problémy (Colman et al., 2014). Novější výzkumy reprodukuje výsledky a pokračují ve výzkumu téměř výhradně na myších, neboť vývoz makaků z původních stanovišť je ve dnešní době značně omezen a podléhá silným etickým a ekologickým regulacím.

Na myších lze současně pomocí molekulárních metod pozorovat vliv KR na autofagii. Dlouhodobá KR skutečně stimuluje tvorbu autofagozomů v různých tkáních a tak by autofagie mohla být jedním z mechanismů způsobujících protektivní účinky KR (Wohlgemuth et al., 2007), přitom míra autofagie koreluje s mírou KR (Deros et al., 2017).

Díky dostupnosti myšího modelu bylo provedeno mnohem více experimentů s KR a byly pozorovány vlivy KR na mnoha onemocněních a metabolických stavech. Kalorická restrikce u myší například zlepšuje sekreci inzulínu u prediabetických myší (Corezola do Amaral et al., 2020), stimuluje specializaci adipocytů na „hnědou tukovou tkáň“ (Fabbiano et al., 2016), zmírňuje následky neurodegenerativních chorob (Wang et al., 2005) a obecně zlepšuje průměrnou délku života (Weindruch & Walford, 1982). Podobných studií je nepočítaně a díky častému ověřování roste povědomí o kalorické restrikci jako možném prostředku k podpůrné léčbě různých lidských onemocnění. Například kombinace kalorické restrikce (zmenšení denního příjmu o 600 kcal) s pravidelným posilováním u obézních pacientů po dobu 5 měsíců vedlo ke zlepšení metabolického syndromu oproti pacientům, kteří také cvičili, ale nepodstupovali kalorickou restrikci (Normandin et al., 2017). Ve studii sledující účinky 25% KR na neobézních účastnících po 2 letech byly oproti kontrolní skupině vyzorovány silné poklesy hodnot celkového cholesterolu (cca - 10 mg/dL), volných triglyceridů v krvi (cca – 20 mg/dL) a průměrného krevního tlaku (cca – 5 mmHG), což se jeví přínosné pro prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Kromě toho u pacientů výrazně klesla hodnota HOMA-IR, která ukazuje na snížení inzulínové rezistence a snížení rizika vzniku diabetu II. typu oproti kontrolní skupině s dietou *ad libitum*. Těchto výsledků bylo dosaženo i přes to, že měli pacienti obtíže dodržet 25% KR a ve skutečnosti byla menší. (Ravussin et al., 2015).

Provádění experimentů s KR na lidech je drahé a těžce udržitelné kvůli spoléhání na úsudky a motivaci účastníků. Toto úsilí přesto přináší zajímavé výsledky téměř bez vedlejších účinků a otevírá další příležitosti k novým poznatkům.

2.2. FMD

Fasting-mimicking diet neboli půst-napodobující dieta, je jídelníček sestavený tak, aby vyvolával reakci podobnou kalorické restrikci. Bohužel neexistuje jednotné schéma FMD, které by bylo konzistentní napříč všemi studijními protokoly. U lidí je spojuje přibližně pětidenní období omezeného kalorického příjmu (přibližná horní hranice 800 – 1100 kcal denně), které se cyklicky opakuje každý měsíc, přičemž zbytek měsíce nejsou žádná omezení. U myší je typický model střídání 2 až 3 dní KR s 4 až 5 dny neomezené potravy dle libosti (I. Y. Choi et al., 2016). V tyto dny omezeného kalorického příjmu se získává největší procento kalorií z tuků (40 % - 60 %), přibližně stejnou nebo menší část ze sacharidů a velmi malou část (10 – 20 %) z proteinů (Wei et al., 2017). Některé komerční FMD jídelníčky, slibující ztrátu hmotnosti a pozitivní vliv na zdraví, omezují celou dobu trvání diety na rostlinnou stravu nebo zakazují alkohol a rafinované cukry.

Díky zvladatelnému (až žádnému) pocitu hladu ve dnech s omezenými kaloriemi se jeví FMD jako lidmi nejvíce příjemná a udržitelná. Nelze se divit, že nabírá na popularitě v komerční sféře i v klinických studiích. Tato metoda je velmi nová a v kontextu s autofagií teprve začíná být zahrnována. S úspěchem dokáže u myší navozovat typické benefity vyvolané KR, jako je snížení rizikových markerů pro kardiovaskulární choroby, zánětů a neoplazií, zlepšení krevetvorby, imunologických projevů stárnutí a kognitivních schopností (Brandhorst et al., 2015).

Nicméně, důkazy o tom, zda FMD stimuluje neselektivní autofagii, jsou velmi sporadické. Jedna studie dokonce naznačuje využití FMD jako metodu inhibice autofagie pro indukci apoptózy nádorových buněk lymfoblastické leukémie na myších modelech (Buono et al., 2020). V danou dobu nelze bezpečně říct, zda FMD skutečně stimuluje autofagii. V každém případě pozitivní účinky FMD na organismus lze přisuzovat mechanismům vyplývajícím z KR, ale nesouvisejícím s autofagií (I. Y. Choi et al., 2016; Wei et al., 2017).

2.3. Přerušovaný půst

Přerušovaný půst, anglicky intermittent fasting (dále jako IF), je relativně populární metoda mezi lidmi toužícími po lepším zdraví nebo lepší postavě. Tento model je zpravidla izokalorický, tzn. neomezuje kalorickou denní dávku, ale vymezuje spíše čas, kdy je jídlo konzumováno. Nejčastější schéma pro lidi je 8:16 neboli 8 hodin pro jídlo a 16 hodin půstu pouze o vodě a nekalorických nápojích. Tato metoda spoléhá na vyvolání autofagie díky krátkodobému stavu hladovění, ke kterému by mělo docházet na konci hladovějícího období.

Na myších lze dokázat, že IF má na autofagii stimulační vliv. Studie izokalorického příjmu potravy podle schématu 2:12 (krmení:půst) u myší ukazuje cyklickou expresi proteinů Beclin-1 a LC3 v játrech, tukové tkáni a kosterních svalech, oproti kontrolní skupině (ad libitum), což nasvědčuje pravidelnému

navyšování míry autofagie v těchto tkáních. Kromě toho byly pozorovány benefiční účinky, jako například navýšení protizánětlivých markerů a specializace adipocytů v hnědou tukovou tkáň (Martinez-Lopez et al., 2017).

Kontrolované klinické studie IF, kdy se fáze půstu a fáze konzumace vystřídají během jednoho dne (6:18, 4:20 aj.) u lidí zatím nebyly provedeny. Existují však komunity, které praktikují IF z náboženských nebo kulturních důvodů, například muslimové praktikující Ramadán. Takové tradice jsou příležitostí pro pozorování vlivu krátkého přerušovaného půstu na zdraví účastníků, avšak kontrola nad kalorickým příjmem a složením jídelníčku je velmi malá. Půst během Ramadánu trvá po dobu od úsvitu do západu slunce, vytváří tak okno 13 až 20 hodin, podle toho, kde se člověk nachází, a praktikuje se cca 30 dní. Z výzkumů vyplývá, že během Ramadánu byly u účastníků naměřeny výrazně zmenšené hladiny prozánětlivých cytokinů (-78% IL-1 β , -57% TNF- α , -71% IL-6), snížené počty leukocytů, granulocytů, lymfocytů a monocytů a samozřejmě úbytek tělesného tuku (Faris et al., 2012) oproti období před zahájením.

Existuje mnoho dalších typů IF stupňujících období půstu na více hodin (4:20) až dnů. Například ADF (alternative day fasting) střídá dny jídla a dny půstu, zatímco týdenní model 5:2 střídá 5 dní normálního režimu *ad libitum* a 2 dny hladovění. Takto prodloužená období půstu potom mají vyvolávat intenzivní stimulaci autofagie a přinést silnější pozitivní účinky kalorické restrikce. Klinická studie na lidech ukázala, že ADF lze bezpečně praktikovat až 6 měsíců bez vážných vedlejších účinků a přitom lze získat typické výhody KR: úbytek viscerálního tuku, pokles celkové hladiny cholesterolu, snížení systolického krevního tlaku a hladiny volného trijodthyroninu (Stekovic et al., 2019), jehož nízká hladina je spojována s dlouhověkostí (Roziing et al., 2010). Dále ADF u myši s cukrovkou 2. typu vedlo ke zlepšení glukózové tolerance díky navýšení počtu β -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu (potlačení jejich apoptózy), navýšení sekrece inzulínu a zlepšení sekrece v reakci na glukózu (Liu et al., 2017).

Schéματα s delším obdobím hladovění často nemohou být izokalorická. Jejich krátké období pro konzumaci jídla nestačí na vykompenzování hladovějícího období, a tak tato schémata vytvářejí kalorickou restrikci, čímž simulují klasické podmínky KR. Některé studie uvádí, že dodržování ADF je pro účastníky jednodušší než klasická KR, protože nemusí kontrolovat svůj příjem a počítat své konzumované kalorie. Avšak jeho největší nedostatek spočívá ve zvýšeném riziku přejídání se v době určené pro jídlo, zejména u jedinců náchylných k poruchám příjmu potravy. Toto riziko hrozí u všech IF schémat. Pozitivní výsledky tak lze zaručit pouze při absenci přejídání v období jídla a dodržování pestrosti stravy (Golbidi et al., 2017). Dlouhodobé praktikování přerušovaného půstu, zvláště při dodržování ketogenní diety má často za cíl přivést člověka do stavu ketózy. Přesto, že je

tato metoda efektivní na ztrátu hmotnosti, může z dlouhodobého hlediska způsobovat inzulinovou rezistenci a ztukovatění jater (Ellenbroek et al., 2014).

2.4. Dlouhodobý půst

Nejkontroverznější z metod kalorické restrikce je bezpochyby dlouhodobý půst. Je to jednorázové období několika dnů až týdnů úplné absence stravy. Není pochyb, že čím déle si člověk odpírá jídlo, tím intenzivněji stimuluje autofagii, avšak následky dlouhodobé podvýživy, které mohou z takového počínání vyplynout, mohou být nebezpečné. Mezi ty nejakutnější stavy patří ketoacidóza, způsobující symptomy jako nevolnost, únava a zvracení. Do tohoto stavu se lze dostat kombinací dlouhodobého půstu, která sama o sobě způsobuje metabolický stav ketózy, a předchozí ketogenní stravy, která taktéž způsobuje ketózu a tím urychluje vstup do ketoacidózy (Blanco et al., 2019).

Přes všechna rizika, nejdelší světový rekord v dodržování úplné absence potravy a nekalorických nápojů je neuvěřitelných 382 dní. Morbidně obézní pacient (207 kg) ve věku 27 let měl být nejdříve podroben kratšímu půstu jako terapie za účelem ztráty váhy, avšak s postupným navyknutím a ztrátou pocitu hladu projevil přání pod lékařským dohledem pokračovat dál. Pacientovi byly denně podávány multivitaminové doplňky, vitamin C a kvasnicový extrakt, a také doplňky draslíku a sodíku. Podle zprávy z případu měl lehkou hypoglykémii, ale cítil se dobře. Když pacient dosáhl zdravé hmotnosti 81 kg, rozhodl se terapii ukončit a pomalu se začal opět stravovat. (Stewart & Fleming, 1973). Je nutné vzít v úvahu, že je to jediný zdokumentovaný případ, navíc z roku 1973. Dlouhodobý stav pacienta po terapii nebyl zaznamenán či zveřejněn.

Co se týká kratšího nepřerušovaného půstu, není jich příliš, avšak z jedné studie na myších vyplývají zajímavé závěry. Myši, které cyklicky podstupovaly 48 hodin absence potravy, byly lépe chráněny proti vedlejším účinkům chemoterapeutik (cyklofosfamin, doxorubicin), tj. poškození DNA leukocytů a dlouhodobému narušení hematopoézy (Cheng et al., 2014).

Provádění klinických studií delších půstů na zvířatech a lidech je nejspíše z etických a bezpečnostních důvodů neproveditelné. Nemáme proto mnoho zdrojů relevantních informací.

3. Regulace autofagie při kalorické restrikci

Autofagie je inkorporována do mnoha metabolických drah a způsobů její regulace lze nalézt nespočet. Tento výčet je pouze malým náhledem, jehož větší rozvedení není v mezích této práce uchopitelné.

Autofagie se spouští na základě různých stresových signálů, z nichž jeden je v důsledku nedostatku živin. Tento mechanismus iniciace neselektivní autofagie je také nejlépe prostudován. Ostatní

stresové faktory zahrnují oxidativní stres, poškození DNA (Filomeni et al., 2015) nebo také infekce intracelulárními patogeny (Y. Choi et al., 2018), a některé další (citace). Všechny tyto stresové faktory vedou ke komplexu ULK1, který je hlavní křižovatkou mezi spouštěcími signály autofagie a samotnou iniciací tvorby autofagozomu (viz Molekulární mechanismy autofagie). Existují i jiné způsoby, jak autofagii stimulovat nezávisle na ULK1 (viz dále). Obsáhnout všechny známé regulační mechanismy v této práci není možné, proto jsem uvedla pouze ty nejzákladnější.

Živina je pro naše účely velmi obecný pojem. Může se jednat o sacharidy, lipidy nebo proteiny. Každá z nich má na autofagii určitý vliv a většina mechanismů ještě není prozkoumána. Ze studií vyplývá, že buňka nemusí nutně hladovět (tj. úplná absence příjmu potravy), ale stačí zmenšit příjem živin, aby byla vyvolána zvýšená míra autofagie nad bazální úroveň (Musiwaro et al., 2013). Je možné, že zvětšená míra autofagie koresponduje s větší restrikcí kalorií, avšak je nutné zachovat pravidelný příjem esenciálních živin tak, aby nedošlo k nežádoucí podvýživě.

Sacharidy a lipidy jsou hlavními zdroji energie v savčích buňkách. Jejich akutní nedostatek způsobuje mimo jiné pokles ATP, který je univerzální energetickou komoditou a jeho úroveň je pod neustálou kontrolou. O vlivu samotných lipidů a mastných kyselin je známo, že nadbytečná koncentrace lipidů má negativní vliv na fúzi lysozomu a autofagozomu v posledním kroku autofagie (Koga et al., 2010).

3.1. AMPK

Nízká hladina ATP kromě mnoha jiných aktivuje enzymy zodpovědné za spouštění autofagie.

Nejznámější a nejlépe prostudovaný je AMPK. Je to indikátor nedostatku energie v buňce, který je aktivován na základě zvýšeného poměru AMP vůči ATP. Aktivní AMPK má v autofagii dvě funkce: aktivuje dráhu, která vede k inhibici mTORC1 (viz dále) a také přímo fosforyluje ULK1 komplex a tím aktivuje kaskádu vedoucí k iniciaci autofagie (Kim et al., 2011).

Aktivovaný AMPK také produkuje zvýšené množství NAD^+ , který má funkci kofaktoru u proteinu sirtuin 1. Stimulace AMPK tak nepřímo podporuje činnost sirtuinu 1, jehož účinky mají na autofagii také značný vliv. sirtuin 1 je NAD^+ -dependentní deacetyláza, aktivovaná zvýšenou koncentrací NAD^+ důsledkem aktivace AMPK, nebo také farmakologicky, například pomocí resveratrolu (Baur et al., 2006; Ding et al., 2017). Z toho vyplývá, že při KR je jeho transkripce zvýšena (Crujeiras et al., 2008). Jeho činnost v autofagii spočívá v deacetylaci Atg5 a Atg7, což tyto proteiny aktivuje a umožňuje zdárný průběh autofagie. Lze tedy předpokládat, že KR navozuje autofagii mimo jiné pomocí aktivace sirtuinu 1 (Cantó et al., 2009; Ding et al., 2017). Byl to první protein, u kterého byla prokázána souvislost s život prodlužujícími účinky kalorické restrikce (Morselli et al., 2010).

3.2. mTORC1

mTORC1 je považován za nejdůležitější inhibiční faktor autofagie. Ve stavu dostatku živin je aktivní: navazuje a fosforyluje ATG13 a ULK1, které tímto drží v inaktivním stavu, který znemožňuje indukci autofagie (Bento et al., 2016; Dikic & Elazar, 2018; Kim et al., 2011).

Efekty mTORC1, mezi které patří stimulace syntézy pyrimidinu a proteosyntézy, se obecně nazývají jako „pro-survival“, neboť stimulují dělení buněk, jejich růst a syntetické dráhy. Autofagie se nachází na opačném spektru dění, neboť ji doprovází spíše rozkladné a katabolické procesy a úsporný chod buňky, proto je činností mTORC1 inhibována. Pozitivní efekty kalorické restrikce na organismus se přisuzují často zrovna ovlivnění aktivity mTORC1. Podávání rapamycinu, který inhibuje činnost mTORC1, je také známý a často využívaný způsob prodloužení života modelových organismů (Fok et al., 2014).

Proteiny ULK1 a ATG13 jsou v inaktivním stavu navázány na mTORC1 a fosforylovány. Inaktivací mTORC1 se oba proteiny uvolní a defosforylují, ULK1 se autofosforyluje, a nakonec opět fosforyluje (na jiných místech) a naváže ATG13, FIP200 a ATG101 za vzniku aktivního ULK1 komplexu. Činností aktivního AMPK je však možné ULK1 aktivovat nezávisle na tom, zda je inaktivován mTORC1 (Kim et al., 2011).

3.3. Vliv aminokyselin

Je přirozené, že deprivace aminokyselin silně stimuluje autofagii (Mortimore & Schworer, 1977), neboť se autofagií jejich koncentrace zvýší. Existují aminokyseliny, které mají na autofagii zvláště inhibiční účinky, a to jsou leucin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan, histidin, ale nejvíce však asparagin a glutamin, pokud se měří jejich vliv individuálně. Jejich kombinace mají inhibiční účinky ještě větší, zejména leucin s asparaginem (Seglen et al., 1980). Každá z aminokyselin má svou vlastní senzorkou a signalizační dráhu a až na výjimky se schází na aktivaci mTORC1. Metabolismus leucinu (a také β -oxidace mastných kyselin a dekarboxylace pyruvátu) a jiných BCAA má za produkt acetyl-koenzym A, který ovlivňuje proteiny zapojené do autofagie tím, že způsobuje jejich acylaci a tím autofagii inhibuje (Mariño et al., 2014).

3.4. Další způsoby regulace

Dalším způsobem regulace autofagie pomocí nutričních podmínek je například acylace SNAP-29 (viz Molekulární mechanismus autofagie). Hladovějící stav sníženého ATP v buňce způsobuje zmenšený výskyt acylovaného SNAP. Ten má tak horší schopnost navazování trans-SNARE než jeho neacylovaná forma, a proto se zmenšením jeho výskytu tvoří efektivnější spojení autofagozomu s lysozomem, což podporuje autofagii na další úrovni (B. Guo et al., 2014).

4. Benefity autofagie pro organismus

Některá onemocnění jsou spojována se snížením bazální úrovně autofagie. Toto snižování koresponduje s věkem jedince a tento trend nacházíme u mnoha organismů včetně savců (Del Roso et al., 2003). Díky vysoké úrovni zdravotnictví je průměrná délka dožití mnohem vyšší než kdy dříve, a možná proto se lidé dožívají věku, kdy jsou těmito onemocněními více ohroženi. Lze tedy říct, že se stářím autofagie klesá a díky tomu mají nemoci spojené s nedostatkem autofagie u starších jedinců větší šanci na propuknutí. Mezi nemoci související se snížením autofagie s věkem patří zejména rakovina a neurodegenerativní choroby (Martinez-Lopez et al., 2015; Rubinsztein et al., 2012). Díky současnému přebytku potravy v rozvinutých zemích se také již nemáme šanci dostat do stavu kalorické restriktce, takže jsou aktivační mechanismy autofagie konstantně potlačovány. Navození autofagie kalorickou restrikcí nebo jejími mimetiky by tak mohlo přispět k prevenci nebo léčbě určitých civilizačních onemocnění.

4.1. Diabetes mellitus

Jednou z forem cukrovky trpí na světě téměř půl miliardy obyvatel a toto číslo stále roste. Nejvyšší výskyt nalezneme v nejrozvinutějších státech, je spojován se sedavým způsobem života, nadváhou a nezdravou stravou, proto je ukázkovým příkladem civilizační choroby. Cukrovka se projevuje hyperglykemií v důsledku nedostatku inzulínu. U DM 1. typu je jeho příčinou progresivní apoptóza pankreatických β -buněk vlivem poruchy tolerance vlastním imunitním systémem. Pacienti s DMI mají takzvaný absolutní nedostatek inzulínu a jedinou léčbou je v tuto chvíli nahrazování inzulínu injekčně. Na druhou stranu, pacienti s DMII trpí pouze relativním nedostatkem, neboť jejich β -buňky jsou nepoškozené a vyrábějí inzulínu dostatek, avšak jejich ostatní tělní buňky vůči inzulínu rezistentní, a tak nedochází k mobilizaci glukózy z krve. Vývoj DMII je postupný a preventabilní. Existují varovné signály, takzvané prediabetické stavy inzulínové rezistence, které nasvědčují o riziku propuknutí diabetu. Zhoršování inzulínové rezistence společně s dalšími faktory může vést až k vyvolání DMI, neboť jsou β -buňky vyčerpány velkou poptávkou po inzulínu a začnou podléhat apoptóze.

Autofagie má v β -buňkách zvláštní roli a regulaci. Za celý život buňka nasyntetizuje a složí velké množství proteinů, a tak je občasné nesprávné složení nevyhnutelné. Nesprávně složené proteiny tvoří agregáty uvnitř ER a v cytosolu a jsou následně cíleně odstraňovány v procesu autofagie (i jako součást ER). Ve stavu nízké intracelulární hladiny glukózy je aktivován zvláštní typ autofagie zvaný krynofagie, což je selektivní degradace starých sekretorních granulek obsahujících inzulín. Ve stavu zvýšené hladiny glukózy je tento mechanismus pozastaven (Orci et al., 1984), avšak krynofagie se neprojevuje neselektivní autofagií, která je spojována s ochranou buněk proti různým stresovým faktorům.

Studie lidských diabetických β -buněk (DMII) in vitro ukázaly oproti kontrolním zdravým buňkám neobvykle vysokou akumulaci autofagozomů. Tyto buňky neměly zvýšené exprese Beclin-1 nebo ULK-1 a měly sníženou expresi LAMP-2, což poukazuje na nezvýšenou tvorbu autofagozomů a jejich nedostatečné odbourávání lysozomy vedoucí k akumulaci. Diabetické buňky byly také náchylnější k apoptóze. Vystavení zdravých kontrolních buněk vysoké koncentraci mastných kyselin (simulujících dietu s vysokým obsahem tuku) vedlo k podobné situaci, ve které se nacházely diabetické buňky: akumulace autofagozomů a zvýšení apoptózy. (Masini et al., 2009) Nabízí se tedy hledat patologické mechanismy vzniku diabetu právě v nerovnovážném fungování autofagie v β -buňkách.

Podle studie kryšihó modelu DMII se KR (30 dní 60% KR) jevila jako protektivní vůči apoptóze β -buněk a přinesla také výrazné zmenšení jak hyperglykemie, tak hyperinsulinemie a tedy zlepšila inzulinovou rezistenci. Taktéž byla pozorována zvýšená exprese sirtuinu-1 a tedy předpokládáme, že v těchto buňkách byla stimulována činnost autofagie (Deng et al., 2010). A jak uvádí i další výzkumy, KR ve formě ADF nebo kontinuální KR přináší zlepšení inzulinové rezistence (Corezola do Amaral et al., 2020; Gabel et al., 2019). Že za protektivní účinky vůči apoptóze β -buněk může právě autofagie, nasvědčují některé další studie, například na základě pozorování zvýšené exprese markerů autofagie na myším modelu DMII in vivo (Liu et al., 2017). Kalorická restrikce by tak mohla díky aktivaci autofagie působit jako prevence a podpůrná léčba DMII, avšak do budoucna je nutné tuto hypotézu lépe prozkoumat.

4.2. Neurodegenerativní choroby

Určité neurodegenerativní choroby vykazují hromadění proteinových inkluzí v cytoplazmě neuronů, které se svým množstvím nabírají na toxicitě. Mezi taková onemocnění patří například Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba a Huntingtonova choroba a jsou to takzvané proteinopatie (Rubinsztein et al., 2012).

Příčina hromadění proteinových agregátů a inkluzí může být v nedostatku jejich likvidace procesem autofagie, například důsledkem stárnutí organismu. Nedostatečná autofagie v neuronech vede také k akumulaci poškozených mitochondrií s abnormálním membránovým potenciálem. Takové mitochondrie uvolňují do cytoplazmy molekuly aktivující kaspázovou dráhu (například proteiny rodiny Bcl-2) a tím vedou buňku k apoptóze (Rubinsztein et al., 2012), způsobují tak odumírání poškozených neuronů. Tuto situaci lze předvést na myších, kterým byl specificky v neuronech odstraněn Atg5 (odstranění tohoto genu v celém organismu vede k úhynu mláďat krátce po vrhu), čímž byla autofagie v těchto buňkách znemožněna. U těchto myší byly pozorovány typické znaky neurodegenerace centrálního nervového systému (například ataxie a porucha motorické koordinace a rovnováhy, svalový třes). Histologie prokázala snížení počtu a degenerativní změny nejvíce

u Purkyňových neuronů mozečku a snížení počtu pyramidálních buněk. Kromě toho byl v neuronech z různých oblastí mozku nalezen velký počet agregátů špatně sbalených proteinů, zatímco u kontrolních myší nebyly nalezeny žádné. Jednalo se zejména o neurony thalamu, spinálních ganglií, Varolova mostu, prodloužené míchy a středního mozku (Hara et al., 2006).

Huntingtonova choroba postihuje selektivně neurony striata. V jejich cytoplazmě a jádře se hromadí mutantní huntingtin, který buňka není schopna enzymaticky odbourat, ačkoliv je ubiquitinován, a ve velké koncentraci tvoří oligomery až agregáty, které jsou pro neurony toxické. Autofagie je jeden z efektivních způsobů, jak se buňka mutovaného huntingtinu může zbavit, avšak i přes to, že v těchto neuronech jsou viditelné autofagozomy i maturované autolysozomy, mutantního huntingtinu v buňce neubývá. Předpokládá se, že mutantní protein narušuje specifické rozeznávání nákladu do autofagozomu a tím narušuje degradaci sebe samého, lipidových micel i narušených mitochondrií, které jsou také typickými znaky pro Huntingtonovu chorobu. Samotná mutace huntingtinu může způsobit ztrátu acetylačního signálu, který by jej za normálních okolností označil pro degradaci. Navíc bylo zjištěno, že mutantní huntingtin inhibuje Rhes, který je exprimován specificky ve striatu a je potřebný pro autofagii, a tím značně omezuje míru autofagie v těchto neuronech (Menzies et al., 2017).

Alzheimerova choroba (dále AD) se vyznačuje ukládáním plaků amyloidu- β v extracelulární mozkové tkáni a také degenerací τ -proteinu a jeho ukládání v neurofibrilárních smotcích (dále jako NFT) v cytoplazmě pyramidálních neuronů (Perl, 2010). Tyto změny vedou k postupné atrofii šedé kůry mozkové (zejména spánkového laloku), hippocampu a amygdaly, postupnému odumírání těchto částí a nevyhnutelně ke změnám v chování pacienta charakteristickým pro demenci. V pozdních stádiích onemocnění dochází k odumírání neuronů prodloužené míchy, což nakonec vede ke smrti pacienta.

Hlavním rizikovým faktorem je věk nad 65 %, kdy riziko s věkem dále stoupá. Existují alely (APOE- ϵ 4 alela genu pro apolipoprotein E), které zvyšují riziko propuknutí choroby už před věkem 65 let, přesto 95 % existujících případů není způsobeno dědičnou náchylností. V současné době je léčba spíše podpůrná, za účelem zpomalení progresu symptomů a podpory kognitivních funkcí pacienta, avšak postup onemocnění nezastaví. Zvýšené riziko propuknutí bylo nalezeno u osob s Downovým syndromem, a u pacientů s historií těžkých úrazů hlavy nebo kardiovaskulárních onemocnění (Perl, 2010). Signifikantně vyšší prevalence AD byla nalezena také u osob s DMII (Janson et al., 2004) a osob s vyšším BMI (Gustafson et al., 2003). Přítomnost NFT je charakteristická pro AD, avšak tento mikroskopický znak se nachází i u Parkinsonovy choroby a velmi často se tyto dvě onemocnění vyskytují současně.

Kalorická restrikce je studována pro své „stárnutí zpomalující“ účinky, a proto má své místo i ve výzkumu prevence proti AD. Na myších modelech AD byl předveden účinek KR jak za pomoci IF, tak i na 40% časově neomezené KR. Podle behaviorálních testů bylo po 10 měsíčním trvání KR u obou skupin pozorováno zlepšení kognitivních schopností oproti kontrolní skupině (Halagappa et al., 2007). U myši podstupujících KR byl nalezen úbytek amyloidních plaků i koncentrace defektních τ -proteinů v neuronech hippocampu. U IF skupiny se nenašly signifikantní změny (Halagappa et al., 2007). V současnosti se tento pozitivní účinek KR přisuzuje stimulaci α -sekretázy, která na rozdíl od sekretáz β a γ štěpí amyloidový prekurzorový protein takovým způsobem, který nevede k usazování amyloidu do plaků (Wang et al., 2005). Avšak to nevysvětluje úbytek plaků a NFT.

Proteiny náchylné k agregaci a oligomerizaci, jako huntingtin, α -synuklein, β -amyloidy a τ -proteiny, jsou za normálních okolností odbourávány autofagií. Přesto, že při pozorování buněk in vitro nejsou viditelné proteinové agregáty v autofagozomech, při stimulaci autofagie jejich počet klesá. Autofagií jsou totiž odstraňovány rozpustné proteiny nebo oligomery, čímž se snižuje jejich celková koncentrace v plazmě, a to dovoluje shlukovaným proteinům se rozpouštět. Podávání různých autofagii-stimulujících látek (rapamycin a jeho analogy) u drozofil a myši vedlo ke zmenšení proteinových shluků a NTF a zmírnění progresu neurodegenerativních onemocnění (Menzies et al., 2017; Sarkar et al., 2007).

V minulosti se předpokládalo, že KR nenavozuje v neuronech zvýšenou autofagii, jelikož je mozek považován za metabolicky privilegovaný. Poslední zjištění však naznačují, že v mozku skutečně k autofagii indukované KR dochází, a to v Purkyňových buňkách mozečku a kortikálních neuronech. Již po 24 hodinách absence potravy bylo v těchto buňkách nalezeno výrazně větší množství autofagozomů než v kontrolních myších, dokonce měly průměrně větší velikost. Po 48 hodinách byl nárůst počtu ještě větší (Alirezai et al., 2010). Stimulace autofagie kalorickou restrikcí pomáhá rozkladu toxických proteinových shluků (Alirezai et al., 2010). Tímto mechanismem by KR mohla působit jako prevence, nebo dokonce jako terapie výše vyjmenovaných neurodegenerativních chorob (Rubinsztein et al., 2012). Konkrétní výzkumy na lidech však zatím neexistují.

4.3. Onkologická onemocnění

Podle americké NCI má každý člověk pravděpodobnost 39%, že bude někdy ve svém životě diagnostikován s nějakým typem rakoviny. Takové číslo je skutečně alarmující a podle statistik stále roste, výzkum rakoviny je tak jedním z nejsledovanějších odvětví medicíny. Léčba chemoterapeutiky a ozařováním, přesto že je nejúčinnější a často až zázračná, přináší spoustu silných vedlejších účinků a její účinnost v individuálních případech je velmi nepředvídatelná, nemluvě o tom, že na některé typy rakovin jsou současné metody z drtivé většiny neúspěšné.

Úspěšná preventivní metoda by mohla pomoci k tomu, aby k nemoci a její následné drastické léčbě nemuselo dojít. Autofagie chrání buňku před akumulací poškozených organel a tím i před oxidativním stresem a poškozením DNA (Mathew et al., 2007), čímž předchází rakvinotvorným mutacím, proto výzkum prevence rakoviny poslední desetiletí obrátil pozornost na její protektivní účinky a přináší tak zajímavé poznatky. Role autofagie v onkogenezi je komplexní a závisí na fázi rozvoje a typu rakovinného bujení. Její důležitost pro ochranu buňky před onkogenezí je evidentní u případů absence esenciálních autofagických genů, neboť defekty autofagie často vedou k onkogenezi. Například u 40-75 % případů lidské rakoviny vaječníků a prsou se vyskytuje delece genu BECN1 kódující protein Beclin-1, součást nezbytného PI3KC3 komplexu (Liang et al., 1999).

Na druhou stranu, pokud rakovina vypukla bez poškození autofagie, může mít roli zcela opačnou. Stejně jako u zdravé buňky, pomáhá chránit před konstantními stresovými faktory jako je nedostatek živin, hypoxie nebo činnost imunitních buněk, dodává recyklované živiny a odstraňuje nebezpečné poškozené organely, čímž jí pomáhá v přežití a růstu. Důkazem je třeba zvýšený nález autofagie v buňkách v hypoxickém prostředí tumorů (Papandreou et al., 2008). Inhibice autofagie dokáže navodit buněčnou smrt takových nádorových buněk, avšak je zde velké riziko vzniku nekrózy a vyvolání silného zánětu v místě tumoru (Degenhardt et al., 2006). V určitých případech je autofagie podezřívána z navozování rezistence nádoru vůči chemoterapeutikům (Sui et al., 2013).

Vhodnou změnou životního stylu a prostředí se podle výzkumů dá předejít až 35% všech případů rakoviny. Typická doporučení jsou abstinence od kouření, pravidelná fyzická aktivita, udržování normálního BMI a pestrá zdravá strava. (Danaei et al., 2005). Mohla by se kalorická restrikce díky autofagii k těmto opatřením přidat? Bohužel přímých důkazů je zatím málo, avšak již existující výzkumy naznačují, že KR má na rozvoj rakoviny určitý vliv. Alespoň co se týče BMI, dlouhodobá KR v kombinaci s pravidelnou fyzickou aktivitou se ukazuje jako velmi účinný způsob dosažení správného BMI, pokud má pacient nadváhu (Racette et al., 2006).

Určité zvýšené markery se považují za rizikové v souvislosti s rizikem vzniku rakoviny. Například IGF-I (Insulin-like growth factor I) je jedním z nich a uvádí se nejčastěji (Renehan et al., 2004). Jeho signalizace mimo jiné působí inhibičně na autofagii (neboť nepřímo aktivuje mTOR), a tak při chronickém působení zabraňuje jejím benefičním účinkům (Bitto et al., 2010). Krátkodobý půst a KR u lidí způsobuje silné snížení IGF-I, čímž je možné tento rizikový faktor zmenšit (Smith et al., 1995). Podle velké studie, jejíž účastníky byly zdravé ženy s nadváhou, bylo po 6 měsících IKR nebo CKR zaznamenáno mimo jiné výrazné zlepšení mnoha rizikových markerů různých civilizačních onemocnění, včetně rakoviny prsu, cukrovky, kardiovaskulárních chorob a demence. U obou skupin také došlo ke snížení BMI (Harvie et al., 2011).

Se znalostí typu daného rakovinného bujení můžeme zaměřit autofagii a využít ji i ve prospěch léčby. Například užívání 5-methyladeninu (inhibitor autofagie) podporuje účinek chemoterapie cytarabinem proti leukémii (Palmeira-dos-Santos et al., 2014). Zatím však žádný lék zaměřující autofagii v onkologické léčbě není licencován. Kalorická restrikce se také těší velkému zájmu výzkumníků. Při léčbě chemoterapií se přerušovaný půst nebo jiné formy KR jeví jako podpůrné a signifikantně zlepšovaly výsledky léčby navozených rakovin u myší a dokonce v některých případech navozovaly odolnost vůči chemoterapii a radioterapii v nerakovinných buňkách (Raffaghello et al., 2008). Pozitivní efekt KR na myších byl pozorován v případech hepatocelulárního karcinomu (Lo Re et al., 2018), rakoviny slinivky (D'Aronzo et al., 2015), anaplastického astrocytomy a glioblastomu (GBM) (Safdie et al., 2012) a rakoviny prsu (TNBC) (Saleh et al., 2013). Pomocí mimetika KR (hydroxycitrát) lze přes aktivaci autofagie dosáhnout snížení počtu regulačních T-lymfocytů, které chrání rakovinné buňky před cytotoxickými T-lymfocyty, a tak podpořit přirozenou imunitní obranu proti rakovinným buňkám (Pietrocola et al., 2016). Je bezpečné předpokládat, že samotnou KR lze navodit podobné výsledky.

Na lidech byla provedena pouze malá pilotní studie s pacienty s různými typy a stádii rakoviny (rakovina prsu, prostaty, vaječníků, dělohy). Půst před (48-140 h) dávkou chemoterapie a po ní (5-56 h) přinesl znatelné zlepšení vedlejších účinků. Efekt chemoterapie nebyl potlačen, ba v některých případech i posílen. Pacienti hlásili zmírnění únavy, nevolnosti a trávících obtíží, a to i z dlouhodobého hlediska při pokračování tohoto programu (Raffaghello et al., 2010). Vzhledem k dvousečné roli autofagie v onkogenezi a tumorigenezi nelze při léčbě aplikovat půst univerzálně a je nutné přistupovat s opatrností a hlubokou znalostí problematiky. Se současnými znalostmi je klinická praxe ještě velmi daleko od předepisování jakékoliv formy kalorické restrikce jako léčbu onkologických onemocnění a je potřeba provést více výzkumů. Praktikování KR jako prevence s sebou nese mnohem méně rizik, a tak má možná lepší šanci na to být doporučena dříve.

4.4. Kardiovaskulární choroby

Mezi důvody úmrtí jsou kardiovaskulární příhody jednoznačně na první příčce. Mezi rizikové faktory pro vznik kardiovaskulárních onemocnění (dále KO) patří diabetes, zvýšená hladina cholesterolu, obezita a zvýšený krevní tlak, který je zároveň nejčastějším rizikovým faktorem pro předčasné úmrtí vůbec ^[2]. Tyto faktory jsou samozřejmě spjaty s rostoucím věkem, avšak zkvalitněním životního stylu lze jejich nástup oddálit a ukazuje se, že praktikování KR by mohl být další způsob, jak k tomu přispět.

Autofagie v kardiomyocytech má důležitou udržovací funkci. U myší, kterým byl specificky v srdci deletován gen Atg5, se již ve velmi nízkém věku vyvinula KO jako dilatační kardiomyopatie adocházelo u nich k předčasným úmrtím. V kardiomyocytech byly nalezeny shluky špatně složených

proteinů, poškozené mitochondrie a chaotické uspořádání sarkomer, což jsou typické znaky stárnutí těchto buněk (Sciarretta et al., 2018). Lze se tedy domnívat, že kvůli klesání činnosti autofagie, které doprovází stárnutí organismu, dochází v kardiomyocytech k degenerativním změnám nevyhnutelně vedoucím ke vzniku KO. Naopak, u myší, jejichž exprese ATG5 byla zvýšena, byly v srdečním svalu nalezeny menší změny typické pro stárnutí (např. fibróza), než u stejně starých WT myší (Pyo et al., 2013).

Nabízí se tedy hypotéza, že stimulace autofagie by mohla mít kardioprotektivní účinky. Metformin, mimetikum KR stimulující autofagii díky aktivaci AMPK, dokáže chránit kardiomyocyty před srdečním selháním v důsledku ischemie (in vitro psí buňky) (Sasaki Hideyuki et al., 2009) a také před apoptózou v důsledku diabetické kardiomyopatie (in vivo myši) (He et al., 2013). Samotná KR, podle pokusu na myších podstupujících 24-hodinový půst, díky prokazatelně zvýšené autofagii, působí preventivně proti odumírání buněk v důsledku ischemie a tak zmenšuje oblast infarktu (Kanamori et al., 2011). Podle další podobné studie, myši podstupující ADF měly o 50% menší ložiska infarktu než AL skupina (Godar et al., 2015).

Přerušovaná KR, mimo jiné, se podle studie jevila jako efektivní metoda hubnutí u obézních pacientů (konstantní 0,1 kg/týden,) a způsobila snížení celkového cholesterolu o 21 % a hladinu LDL o 25 %, čímž přispěla k ochraně před KO u těchto pacientů. Dietní režim, který střídal dny *ad libitum* s dny 75% KR pacienti neměli problém dodržovat po celou dobu trvání, tj. 8 týdnů. Průměrná ztráta hmotnosti byla 5,6 kg a nebyly zaznamenány žádné vedlejší účinky (Varady et al., 2009). Podle malé studie na lidech se dlouhodobá KR také ukazuje jako efektivní prevence aterosklerózy (Fontana et al., 2004). Spojitost s autofagií nebyla v těchto případech sledována, přesto se lze bezpečně domnívat, že v těchto případech odehrála svou roli.

4.5. Stárnutí

Stejně jako s kardiovaskulárními a neurodegenerativními chorobami, se stárnutím těla jsou spojovány typické buněčné znaky: poškození DNA, akumulace defektních organel a proteinů a oxidativní zátěže. Výskyt těchto ukazatelů přímo souvisí se zpomalováním autofagie (Del Roso et al., 2003) a ukazuje tak na sestupnou tendenci činnosti autofagie v průběhu stárnutí. Příčina tohoto trendu zatím není známá, nicméně je vysoce pravděpodobné, že zahrnuje mnoho faktorů. Víme například o průběžných změnách v transkripční regulaci, kdy oxidativní poškození DNA nahromaděné časem snižuje NAD⁺, které pozitivně reguluje dráhu sirtuinu, v důsledku čehož se snižuje transkripce genů ATG (Sciarretta et al., 2018). Stimulace autofagie (pomocí KR nebo jejích mimetik) ve starším věku by tak mohla kompenzovat její nedostatečnou činnost na úroveň, která je dostatečná pro údržbu buněk v dobrém stavu a dokáže tyto změny do určité míry oddálit (Donati et al., 2001). Vezmeme-li v úvahu pozitivní

účinky KR na ostatní již uvedená civilizační onemocnění, která se stárnutím hluboce souvisí, můžeme říct, že už jen to stačí na zkvalitnění života a jeho prodloužení. Pozitivní vliv KR na obecnou délku života je již považován za zlatý standard výzkumů stárnutí, a tak existuje mnoho důkazů, které tuto hypotézu potvrzují a v poslední době začínají být spojovány právě s autofagií (Chung & Chung, 2019).

Příkladem ovlivnění příznaků stárnutí důsledkem autofagie je například výsledek již zmíněného pozorování transgenních myši se zvýšenou transkripcí genu Atg5. Bylo při něm zjištěno, tyto myši měly oproti kontrolním (WT) dvakrát zvýšenou činnost autofagie, a to zejména v plicích, játrech, srdci a svalech a mírně také v mozkových neuronech. Jejich průměrné dožití dosahovalo v mediánu o 17,2 % vyššího věku, než kontrolní skupina a jejich fenotyp je projevoval jako „mladší“, tzn. prokazoval lepší inzulinovou citlivost, nižší hmotnost spojenou s vysokým věkem a vyšší odolnost vůči oxidativnímu stresu (Pyo et al., 2013).

Při dlouhodobém pozorování (6 let \pm 3 roky) KR (míra neuvedená) u lidských dobrovolníků byla oproti kontrolním účastníkům také nalezena zvýšená transkripce proteinů účastnících se autofagie, nasvědčující o její zvýšené činnosti (měřeno ve svalových buňkách). Zaznamenané pozitivní efekty KR v daném časovém měřítku zahrnovaly snížení zánětlivých faktorů (Yang et al., 2016). Vzhledem k délce lidského života je velmi nepraktické sledovat délku dožití, a tak důkazy o „dlouhověkosti“ účastníků nemáme. Nicméně, pokud se poohlédneme v lidských komunitách, kteří dlouhověkost vykazují, můžeme nalézt příčinu mimo jiné v jejich jídelníčku. Příkladem takové komunity byli obyvatelé japonského ostrova Okinawa v roce 1950, před ovlivněním celého Japonska západní stravou a zlepšení ekonomické situace. V porovnání s ostatními japonskými ostrovy měl jejich jídelníček dostatek vitamínů a esenciálních živin, větší podíl nenasycených mastných kyselin oproti nasyceným, méně cukrů a jednoduchých sacharidů a živočišných bílkovin, avšak obzvlášť neobvyklá byla i jejich nízká průměrná kalorická dávka, která činila jen cca 80 % doporučené denní dávky (Kagawa, 1978). Okinawa má dodnes nejvyšší výskyt lidí s věkem nad 100 let a nejnižší výskyt rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění v Japonsku, avšak s přijetím západní stravy se její pozice nejzdravějšího místa na světě pomalu stává minulostí.

Nejblíže ke dlouhodobému pozorování KR na lidech je výzkum na primátech *Macacca mulatta*, který byl uveden v kapitole „Kontinuální kalorická restrikce“. Podstupování 30% KR od mladého dospělého věku výrazně zmenšilo úmrtnost z onemocnění spojenými se stářím (26 %) oproti kontrolní skupině s AL přístupem k potravě (63%). Skupina KR se také dožívala určitého věku (20, 25, 30 let) ve vyšším počtu než kontrolní skupina (Colman et al., 2014). Vzhledem k velmi podobné fyziologii primátů a člověka je vysoce pravděpodobné, že na lidi bude mít KR podobný účinek, avšak k jednoznačnému vyvození závěru je nutné provést randomizované klinické studie.

4.6. Virová onemocnění, COVID-19

O virofagii jsem se již zmiňovala v kapitole Funkce autofagie. Je to selektivní forma autofagie, která je součástí vrozené imunity. Ačkoliv se za hlavní stimul xenofagie a virofagie považuje přítomnost cizorodé částice uvnitř buňky, je také možné, že jsou ovlivnitelné pomocí KR nebo jejích mimetik. *M. tuberculosis*, intracelulární patogen, má vyvinutý mechanismus, který po pohlčení hostitelskou buňkou inhibuje autofagii ve fázi splynutí fagozomu s autofagozomem, čímž se chrání před zničením. Při stimulaci autofagie u myši pomocí KR nebo rapamycinu se fúze autofagických vezikulů urychluje a pozoruje se lepší odbourávání fagozomů (Cui et al., 2019), neboli zlepšená efektivita xenofagie. Při studiu autofagie na octomilkách se zjistilo, že při infekci virem VSV dokáže napadená buňka specificky potlačit inhibici autofagie vlivem mTORC1 (který je aktivní při dostatku potravy) a tím umožnit spuštění autofagie, která by byla aktivována při hladovějícím stavu nezávisle na hladině živin (Cherry, 2009). Lze se tedy domnívat, že KR by mohla urychlit reakci hostitele na virus, jelikož k inaktivaci mTORC1 bude stačit méně prostředků, a zlepšit tak obranyschopnost buňky pomocí autofagie. Každý virus může způsobovat jinou reakci hostitele a některé viry dokážou autofagii specificky potlačovat (Y. Choi et al., 2018), avšak mechanismus autofagie je napříč eukaryoty silně konzervován, takže lze očekávat reakce podobné.

Imunitní odpověď je největším faktorem symptomatického průběhu virových onemocnění a pokud není v rovnováze, vede to k těžkému průběhu až k fatálním následkům. To platí zejména v případě nákazy novým koronavirem SARS-CoV-2, který v poslední době zužuje obyvatele celého světa nejen zdravotními, ale i ekonomickými a sociálními dopady. Nepřiměřená aktivace vrozené imunity může vést k nadprodukci cytokinu IL-6 až k cytokinové bouři, která vyvolává silnou zánětlivou reakci zejména v plicích a může vést až k syndromu akutní dechové tísně, která je příčinou 70% úmrtí pacientů s onemocněním COVID-19 (Hojyo et al., 2020).

Autofagie plní v imunitě zvláštní roli tím, že se účastní prezentace antigenů na MHC molekulách II. třídy (Crotzer & Blum, 2009), selektivně degraduje patogenní struktury včetně těch syntetizovaných hostitelem, podílí se na diferenciaci imunitních buněk a stimuluje produkci protilátek a některých cytokinů (Y. Choi et al., 2018). Na lidských *in vitro* APC buňkách se ukázalo, že už po 6 hodinách deprivace aminokyselin se výrazně zvětšil počet a různorodost těchto antigenů prezentovaných na MHC molekulách II. třídy, a to nejen exogenních antigenů, ale i intracelulárních. Tento efekt pomáhá CD4+ T-lymfocytům v rozeznávání infikovaných buněk a spuštění reakci vedoucí k jejich zneškodnění a vytvoření vhodných protilátek (Dengjel et al., 2005). Díky tomu se autofagie považuje za potenciální cíl imunologické protirakovinové léčby (Cui et al., 2019). Lepší prezentace antigenů by také mohla pomoci adaptivní imunitě získat kontrolu dřív, než dojde k přílišné aktivaci vrozených prozánětlivých reakcí, jako je cytokinová bouře. Navíc, jak již bylo zmíněno v kapitole IF, přerušovaný půst

prokazatelně zmenšuje hladiny prozánětlivých cytokinů (Faris et al., 2012), čímž přispívá ke zklidnění cytokinové reakce na virovou infekci.

Díky navození podmínek podobných hladovění (viz kapitolu FMD) dochází ke zlepšení imunologických projevů stárnutí, jako je zmenšující se poměr lymfoidních a myeloidních imunitních buněk a zvětšené riziko výskytu a anémie a myeloproliferativních onemocnění. Efekt imunologického stárnutí by mohl vysvětlit, proč některá onemocnění způsobují nepříznivý průběh u starších jedinců oproti mladším. Stravování FMD u myší po dobu 4 měsíce vedlo ke zvýšení počtu červených krvinek a zvýšení poměru lymfoidních a myeloidních buněk, což se jeví jako regenerace imunitního systému (Brandhorst et al., 2015; Buono et al., 2020) a vyrovnávání sil mezi vrozenou a adaptivní imunitou. Stejných výsledků bylo dosaženo u 48hodinového půstu (Cheng et al., 2014).

Inhibice autofagie napomáhá virovým částicím se replikovat a určité viry toho využívají a samy tuto inhibici vytvářejí. Týká se to i SARS-CoV-2, který působí inaktivačně na AMPK, mTORC1 a dokonce stimuluje AKT kinázu degradující Beclin-1. Podávání stabilizátoru Beclinu-1, mimetika KR spermidinu a inhibitoru AKT kinázy potlačilo propagaci viru o 88 až 99 % (Gassen et al., 2020). Zda stejného efektu docílíme díky KR, zatím není známo, avšak je to pravděpodobné. Vezmeme-li v úvahu prokázané účinky autofagie na snížení virové replikace uvnitř hostitelských buněk (Hannan et al., 2020; Y. Choi et al., 2018) a uvedené efekty KR a autofagie na imunitní systém, jistá forma KR, například IF, by mohla působit jako prevence proti těžkému průběhu virových infekcí, včetně infekce COVID-19.

5. Možné nepříznivé účinky autofagie na organismus

Autofagie probíhá na bazální úrovni v podstatě neustále a její defekty nesou pro organismus různé nepříznivé následky: náchylnost k civilizačním chorobám spojeným se stářím a určitým typům rakoviny, snížená obranyschopnost vůči intracelulárním infekcím až fatální důsledky nedlouho po narození (Y. Choi et al., 2018; Kuma et al., 2004; Liang et al., 1999; Sciarretta et al., 2018).

Za normálních podmínek je autofagie dobře regulována a nezpůsobuje žádné nepříznivé účinky, avšak, jak jsem již v kapitole „Benefity autofagie pro organismus“ uvedla, její stimulace pomocí KR je v mnoha případech efektivní prevencí proti různým chorobám. Tato informace zdá se být základem pro propagaci různých výživových programů a doporučení, avšak studií na lidech je zatím velmi málo a dlouhodobé následky nejsou často známy, je proto radno se zamyslet, zda dobrovolné podstupování KR s sebou nepřináší tak silnou nebo dlouhodobou stimulaci autofagie, která by mohla být pro organismus dobrovolníka nepříznivá a nepřinášela s sebou dlouhodobé následky.

Největší popularitu získává KR právě při léčbě rakoviny. Zde také narážíme na největší zádrhel. Některé typy rakovin totiž využívají autofagii jako mechanismus přežití v nepříznivém a stresovém prostředí: pod útokem imunity, chemoterapie a radioterapie a v nedostatku výživy a kyslíku (viz kapitolu Onkologická onemocnění). Další stimulace autofagie pomocí KR tak naopak přihoršuje situaci, napomáhá nádoru odolávat stresovým podmínkám a propůjčuje mu rezistenci vůči léčbě (Papandreou et al., 2008; Sui et al., 2013). Podstupování KR jídelníčku nebo půstů bez dohledu odborníka by tak mohlo být velmi nezodpovědné a vést k velkým komplikacím v léčbě.

Příliš dlouhá intenzivní stimulace autofagie, například kvůli dlouhodobému nedostatku živin, vede k velkému odbourávání nejen poškozených částí buňky, ale i nezbytných a zdravých částí. Za určitou hranicí množství autofagocytovaných částí cytosolu již buňka není schopna přežití a dráha autofagie začne aktivovat apoptózu, vedoucí ke smrti buňky, potažmo k atrofii určitých tkání (Maiuri et al., 2007), například jater (Selman et al., 2003). Zda dochází k regeneraci po ukončení KR, je zatím otázka.

Závěr

V této práci byly prozkoumány základy benefičních účinků autofagie na projevy stárnutí a nejčastější civilizační choroby. Díky KR může být v různých tkáních našeho těla navozena autofagie a mohou se tak projevit benefity, které autofagie díky jejímu hormetickému efektu přináší. Nabízí se tedy možnost využívání KR jako potenciálně léčebného a preventivního prostředku, který by mohl být doporučován lékaři na základě předpokladu, že KR pomáhá lidem předcházet civilizačním onemocněním a prodlužovat délku kvalitního života. Podle prozkoumané literatury je tato hypotéza vysoce pravděpodobná, avšak chybí spousta randomizovaných klinických studií, které by ji potvrdily právě u lidí. Tato práce tedy přináší návrh na provedení důvěryhodné studie, která by přinesla na světlo poznatky o skutečných benefitech různých forem KR a o činnosti probíhající autofagie v různých tkáních lidského těla.

Seznam Použité literatury

- Alirezaei, M., Kemball, C. C., Flynn, C. T., Wood, M. R., Whitton, J. L., & Kiosses, W. B. (2010). Short-term fasting induces profound neuronal autophagy. *Autophagy*, 6(6), 702–710. <https://doi.org/10.4161/auto.6.6.12376>
- Aris, J. P., Alvers, A. L., Ferraiuolo, R. A., Fishwick, L. K., Hanvivatpong, A., Hu, D., Kirlew, C., Leonard, M. T., Losin, K. J., Marraffini, M., Seo, A. Y., Swanberg, V., Westcott, J. L., Wood, M. S., Leeuwenburgh, C., & Dunn, W. A. (2013). Autophagy and leucine promote chronological longevity and respiration proficiency during calorie restriction in yeast. *Experimental Gerontology*, 48(10), 1107–1119. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.01.006>
- Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., Griffiths, G., & Ktistakis, N. T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*, 182(4), 685–701. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803137>
- Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P. J., Poosala, S., Becker, K. G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., ... Sinclair, D. A. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444(7117), 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature05354>
- Behrends, C., & Fulda, S. (2012). Receptor Proteins in Selective Autophagy. *International Journal of Cell Biology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/673290>
- Bento, C. F., Renna, M., Ghislat, G., Puri, C., Ashkenazi, A., Vicinanza, M., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2016). Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 685–713. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014556>
- Bitto, A., Lerner, C., Torres, C., Roell, M., Malaguti, M., Perez, V., Lorenzini, A., Hrelia, S., Ikeno, Y., Matzko, M. E., McCarter, R., & Sell, C. (2010). Long-Term IGF-I Exposure Decreases Autophagy and Cell Viability. *PLoS ONE*, 5(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012592>
- Blanco, J. C., Khatri, A., Kifayat, A., Cho, R., & Aronow, W. S. (2019). Starvation Ketoacidosis due to the Ketogenic Diet and Prolonged Fasting – A Possibly Dangerous Diet Trend. *The American Journal of Case Reports*, 20, 1728–1731. <https://doi.org/10.12659/AJCR.917226>
- Boya, P., González-Polo, R.-A., Casares, N., Perfettini, J.-L., Dessen, P., Larochette, N., Métivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P., & Kroemer, G. (2005). Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 25(3), 1025–1040. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.3.1025-1040.2005>

- Brandhorst, S., Choi, I. Y., Wei, M., Cheng, C. W., Sedrakyan, S., Navarrete, G., Dubeau, L., Yap, L. P., Park, R., Vinciguerra, M., Di Biase, S., Mirzaei, H., Mirisola, M. G., Childress, P., Ji, L., Groshen, S., Penna, F., Odetti, P., Perin, L., ... Longo, V. D. (2015). A periodic diet that mimics fasting promotes multi-system regeneration, enhanced cognitive performance and healthspan. *Cell metabolism*, 22(1), 86–99. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.012>
- Buono, R., Tucci, J., Cutri, R., Guidi, N., Mangul, S., Pellegrini, M., Fruman, D. A., Mittelman, S. D., & Longo, V. (2020). Fasting Mimicking Diet promotes immunotherapy-associated changes and inhibits autophagy to promote cancer free survival in Acute Lymphoblastic Leukemia models. *The Journal of Immunology*, 204(1 Supplement), 240.10-240.10.
- Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P., & Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458(7241), 1056–1060. <https://doi.org/10.1038/nature07813>
- Colman, R. J., Beasley, T. M., Kemnitz, J. W., Johnson, S. C., Weindruch, R., & Anderson, R. M. (2014). Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nature Communications*, 5, 3557. <https://doi.org/10.1038/ncomms4557>
- Corezola do Amaral, M. E., Kravets, V., Dwulet, J. M., Farnsworth, N. L., Piscopio, R., Schleicher, W. E., Miranda, J. G., & Benninger, R. K. P. (2020). Caloric restriction recovers impaired β -cell- β -cell gap junction coupling, calcium oscillation coordination, and insulin secretion in prediabetic mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 319(4), E709–E720. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00132.2020>
- Crotzer, V. L., & Blum, J. S. (2009). Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(6), 3335–3341. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803458>
- Crujeiras, A. B., Parra, D., Goyenechea, E., & Martínez, J. A. (2008). Sirtuin gene expression in human mononuclear cells is modulated by caloric restriction. *European Journal of Clinical Investigation*, 38(9), 672–678. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2008.01998.x>
- Cui, B., Lin, H., Yu, J., Yu, J., & Hu, Z. (2019). Autophagy and the Immune Response. *Autophagy: Biology and Diseases*, 1206, 595–634. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_27
- Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A. D., Murray, C. J., & Ezzati, M. (2005). Causes of cancer in the world: Comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *The Lancet*, 366(9499), 1784–1793. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67725-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67725-2)
- D’Aronzo, M., Vinciguerra, M., Mazza, T., Panebianco, C., Saracino, C., Pereira, S. P., Graziano, P., & Paziienza, V. (2015). Fasting cycles potentiate the efficacy of gemcitabine treatment in in vitro

- and in vivo pancreatic cancer models. *Oncotarget*, *6*(21), 18545–18557.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.4186>
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., Nelson, D. A., Jin, S., & White, E. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer cell*, *10*(1), 51–64.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.06.001>
- Del Roso, A., Vittorini, S., Cavallini, G., Donati, A., Gori, Z., Masini, M., Pollera, M., & Bergamini, E. (2003). Ageing-related changes in the in vivo function of rat liver macroautophagy and proteolysis. *Experimental Gerontology*, *38*(5), 519–527. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(03\)00002-0](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(03)00002-0)
- Deng, X., Cheng, J., Zhang, Y., Li, N., & Chen, L. (2010). Effects of caloric restriction on SIRT1 expression and apoptosis of islet beta cells in type 2 diabetic rats. *Acta Diabetologica*, *47 Suppl 1*, 177–185. <https://doi.org/10.1007/s00592-009-0159-7>
- Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Müller, M., Kreymborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., Brock, R., Driessen, C., Rammensee, H.-G., & Stevanovic, S. (2005). Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(22), 7922–7927. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501190102>
- Derous, D., Mitchell, S. E., Wang, L., Green, C. L., Wang, Y., Chen, L., Han, J.-D. J., Promislow, D. E. L., Lusseau, D., Douglas, A., & Speakman, J. R. (2017). The effects of graded levels of calorie restriction: XI. Evaluation of the main hypotheses underpinning the life extension effects of CR using the hepatic transcriptome. *Aging (Albany NY)*, *9*(7), 1770–1804.
<https://doi.org/10.18632/aging.101269>
- Deter, R. L., Baudhuin, P., & de Duve, C. (1967). PARTICIPATION OF LYSOSOMES IN CELLULAR AUTOPHAGY INDUCED IN RAT LIVER BY GLUCAGON. *The Journal of Cell Biology*, *35*(2), C11–C16.
- Dikic, I., & Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(6), 349–364. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>
- Ding, S., Jiang, J., Zhang, G., Bu, Y., Zhang, G., & Zhao, X. (2017). Resveratrol and caloric restriction prevent hepatic steatosis by regulating SIRT1-autophagy pathway and alleviating endoplasmic reticulum stress in high-fat diet-fed rats. *PLoS ONE*, *12*(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183541>
- Donati, A., Cavallini, G., Paradiso, C., Vittorini, S., Pollera, M., Gori, Z., & Bergamini, E. (2001). Age-Related Changes in the Autophagic Proteolysis of Rat Isolated Liver Cells: Effects of Antiaging

- Dietary Restrictions. *The Journals of Gerontology: Series A*, 56(9), B375–B383.
<https://doi.org/10.1093/gerona/56.9.B375>
- Ellenbroek, J. H., van Dijck, L., Töns, H. A., Rabelink, T. J., Carlotti, F., Ballieux, B. E. P. B., & de Koning, E. J. P. (2014). Long-term ketogenic diet causes glucose intolerance and reduced β - and α -cell mass but no weight loss in mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 306(5), E552-558. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00453.2013>
- Fabbiano, S., Suárez-Zamorano, N., Rigo, D., Veyrat-Durebex, C., Stevanovic Dokic, A., Colin, D. J., & Trajkovski, M. (2016). Caloric Restriction Leads to Browning of White Adipose Tissue through Type 2 Immune Signaling. *Cell Metabolism*, 24(3), 434–446.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.07.023>
- Faris, “Mo’ez Al-Islam” E., Kacimi, S., Al-Kurd, R. A., Fararjeh, M. A., Bustanji, Y. K., Mohammad, M. K., & Salem, M. L. (2012). Intermittent fasting during Ramadan attenuates proinflammatory cytokines and immune cells in healthy subjects. *Nutrition Research*, 32(12), 947–955.
<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.06.021>
- Filomeni, G., De Zio, D., & Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. *Cell Death and Differentiation*, 22(3), 377–388.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2014.150>
- Fok, W. C., Chen, Y., Bokov, A., Zhang, Y., Salmon, A. B., Diaz, V., Javors, M., Wood, W. H., Zhang, Y., Becker, K. G., Pérez, V. I., & Richardson, A. (2014). Mice Fed Rapamycin Have an Increase in Lifespan Associated with Major Changes in the Liver Transcriptome. *PLoS ONE*, 9(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083988>
- Fontana, L., Meyer, T. E., Klein, S., & Holloszy, J. O. (2004). Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(17), 6659–6663. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308291101>
- Gabel, K., Kroeger, C. M., Trepanowski, J. F., Hoddy, K. K., Cienfuegos, S., Kalam, F., & Varady, K. A. (2019). Differential Effects of Alternate-Day Fasting Versus Daily Calorie Restriction on Insulin Resistance. *Obesity*, 27(9), 1443–1450. <https://doi.org/10.1002/oby.22564>
- Gassen, N. C., Papiés, J., Bajaj, T., Dethloff, F., Emanuel, J., Weckmann, K., Heinz, D. E., Heinemann, N., Lennarz, M., Richter, A., Niemeyer, D., Corman, V. M., Giavalisco, P., Drosten, C., & Müller, M. A. (2020). Analysis of SARS-CoV-2-controlled autophagy reveals spermidine, MK-2206, and niclosamide as putative antiviral therapeutics. *BioRxiv*, 2020.04.15.997254.
<https://doi.org/10.1101/2020.04.15.997254>
- Godar, R. J., Ma, X., Liu, H., Murphy, J. T., Weinheimer, C. J., Kovacs, A., Crosby, S. D., Saftig, P., & Diwan, A. (2015). Repetitive stimulation of autophagy-lysosome machinery by intermittent

- fasting preconditions the myocardium to ischemia-reperfusion injury. *Autophagy*, *11*(9), 1537–1560. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1063768>
- Golbidi, S., Daiber, A., Korac, B., Li, H., Essop, M. F., & Laher, I. (2017). Health Benefits of Fasting and Caloric Restriction. *Current Diabetes Reports*, *17*(12), 123. <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0951-7>
- Guo, B., Liang, Q., Li, L., Hu, Z., Wu, F., Zhang, P., Ma, Y., Zhao, B., Kovács, A. L., Zhang, Z., Feng, D., Chen, S., & Zhang, H. (2014). O-GlcNAc-modification of SNAP-29 regulates autophagosome maturation. *Nature Cell Biology*, *16*(12), 1215–1226. <https://doi.org/10.1038/ncb3066>
- Guo, J. Y., Chen, H.-Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A. M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J. J., Chen, G., Lemons, J. M. S., Karantza, V., Collier, H. A., DiPaola, R. S., Gelinas, C., Rabinowitz, J. D., & White, E. (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes & Development*, *25*(5), 460–470. <https://doi.org/10.1101/gad.2016311>
- Gustafson, D., Rothenberg, E., Blennow, K., Steen, B., & Skoog, I. (2003). An 18-Year Follow-up of Overweight and Risk of Alzheimer Disease. *Archives of Internal Medicine*, *163*(13), 1524. <https://doi.org/10.1001/archinte.163.13.1524>
- Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K., & Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation. *Cell*, *141*(4), 656–667. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.009>
- Halagappa, V. K. M., Guo, Z., Pearson, M., Matsuoka, Y., Cutler, R. G., LaFerla, F. M., & Mattson, M. P. (2007). Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, *26*(1), 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.12.019>
- Hannan, Md. A., Rahman, Md. A., Rahman, M. S., Sohag, A. A. M., Dash, R., Hossain, K. S., Farjana, M., & Uddin, M. J. (2020). Intermittent fasting, a possible priming tool for host defense against SARS-CoV-2 infection: Crosstalk among calorie restriction, autophagy and immune response. *Immunology Letters*, *226*, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.07.001>
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., & Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, *441*(7095), 885–889. <https://doi.org/10.1038/nature04724>
- Harvie, M. N., Pegington, M., Mattson, M. P., Frystyk, J., Dillon, B., Evans, G., Cuzick, J., Jebb, S. A., Martin, B., Cutler, R. G., Son, T. G., Maudsley, S., Carlson, O. D., Egan, J. M., Flyvbjerg, A., & Howell, A. (2011). The effects of intermittent or continuous energy restriction on weight loss

- and metabolic disease risk markers: A randomised trial in young overweight women. *International journal of obesity (2005)*, 35(5), 714–727. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.171>
- He, C., Zhu, H., Li, H., Zou, M.-H., & Xie, Z. (2013). Dissociation of Bcl-2–Beclin1 Complex by Activated AMPK Enhances Cardiac Autophagy and Protects Against Cardiomyocyte Apoptosis in Diabetes. *Diabetes*, 62(4), 1270–1281. <https://doi.org/10.2337/db12-0533>
- Hojyo, S., Uchida, M., Tanaka, K., Hasebe, R., Tanaka, Y., Murakami, M., & Hirano, T. (2020). How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. *Inflammation and Regeneration*, 40(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s41232-020-00146-3>
- Cheng, C.-W., Adams, G. B., Perin, L., Wei, M., Zhou, X., Lam, B. S., Da Sacco, S., Mirisola, M., Quinn, D. I., Dorff, T. B., Kopchick, J. J., & Longo, V. D. (2014). Prolonged Fasting Reduces IGF-1/PKA to Promote Hematopoietic-Stem-Cell-Based Regeneration and Reverse Immunosuppression. *Cell Stem Cell*, 14(6), 810–823. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.04.014>
- Cherry, S. (2009). VSV infection is sensed by Drosophila, attenuates nutrient signaling, and thereby activates antiviral autophagy. *Autophagy*, 5(7), 1062–1063. <https://doi.org/10.4161/auto.5.7.9730>
- Choi, I. Y., Piccio, L., Childress, P., Bollman, B., Ghosh, A., Brandhorst, S., Suarez, J., Michalsen, A., Cross, A. H., Morgan, T. E., Wei, M., Paul, F., Bock, M., & Longo, V. D. (2016). A Diet Mimicking Fasting Promotes Regeneration and Reduces Autoimmunity and Multiple Sclerosis Symptoms. *Cell Reports*, 15(10), 2136–2146. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.009>
- Choi, Y., Bowman, J. W., & Jung, J. U. (2018). Autophagy during viral infection—A double-edged sword. *Nature Reviews Microbiology*, 16(6), 341–354. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0003-6>
- Chung, K. W., & Chung, H. Y. (2019). The Effects of Calorie Restriction on Autophagy: Role on Aging Intervention. *Nutrients*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/nu11122923>
- Janson, J., Laedtke, T., Parisi, J. E., O'Brien, P., Petersen, R. C., & Butler, P. C. (2004). Increased Risk of Type 2 Diabetes in Alzheimer Disease. *Diabetes*, 53(2), 474–481. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2.474>
- Kagawa, Y. (1978). Impact of westernization on the nutrition of Japanese: Changes in physique, cancer, longevity and centenarians. *Preventive Medicine*, 7(2), 205–217. [https://doi.org/10.1016/0091-7435\(78\)90246-3](https://doi.org/10.1016/0091-7435(78)90246-3)
- Kanamori, H., Takemura, G., Goto, K., Maruyama, R., Ono, K., Nagao, K., Tsujimoto, A., Ogino, A., Takeyama, T., Kawaguchi, T., Watanabe, T., Kawasaki, M., Fujiwara, T., Fujiwara, H., Seishima, M., & Minatoguchi, S. (2011). Autophagy limits acute myocardial infarction induced by permanent coronary artery occlusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 300(6), H2261–H2271. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01056.2010>

- Khaminets, A., Behl, C., & Dikic, I. (2016). Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends in Cell Biology*, 26(1), 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.010>
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology*, 13(2), 132–141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>
- Koga, H., Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2010). Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *The FASEB Journal*, 24(8), 3052–3065. <https://doi.org/10.1096/fj.09-144519>
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T., & Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 432(7020), 1032–1036. <https://doi.org/10.1038/nature03029>
- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., & Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402(6762), 672–676. <https://doi.org/10.1038/45257>
- Liu, H., Javaheri, A., Godar, R. J., Murphy, J., Ma, X., Rohatgi, N., Mahadevan, J., Hyrc, K., Saftig, P., Marshall, C., McDaniel, M. L., Remedi, M. S., Razani, B., Urano, F., & Diwan, A. (2017). Intermittent fasting preserves beta-cell mass in obesity-induced diabetes via the autophagy-lysosome pathway. *Autophagy*, 13(11), 1952–1968. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1368596>
- Lo Re, O., Panebianco, C., Porto, S., Cervi, C., Rappa, F., Di Biase, S., Caraglia, M., Paziienza, V., & Vinciguerra, M. (2018). Fasting inhibits hepatic stellate cells activation and potentiates anti-cancer activity of Sorafenib in hepatocellular cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 233(2), 1202–1212. <https://doi.org/10.1002/jcp.25987>
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., & Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 741–752. <https://doi.org/10.1038/nrm2239>
- Mariño, G., Pietrocola, F., Eisenberg, T., Kong, Y., Malik, S. A., Andryushkova, A., Schroeder, S., Pendl, T., Harger, A., Niso-Santano, M., Zamzami, N., Scoazec, M., Durand, S., Enot, D. P., Fernández, Á. F., Martins, I., Kepp, O., Senovilla, L., Bauvy, C., ... Kroemer, G. (2014). Regulation of Autophagy by Cytosolic Acetyl-Coenzyme A. *Molecular Cell*, 53(5), 710–725. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.016>
- Martinez-Lopez, N., Athonvarangkul, D., & Singh, R. (2015). Autophagy and Aging. *Advances in experimental medicine and biology*, 847, 73–87. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2404-2_3
- Martinez-Lopez, N., Tarabra, E., Toledo, M., Garcia-Macia, M., Sahu, S., Coletto, L., Batista-Gonzalez, A., Barzilai, N., Pessin, J. E., Schwartz, G. J., Kersten, S., & Singh, R. (2017). System-wide

- Benefits of Intermeal Fasting by Autophagy. *Cell Metabolism*, 26(6), 856-871.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.020>
- Masini, M., Bugliani, M., Lupi, R., del Guerra, S., Boggi, U., Filippini, F., Marselli, L., Masiello, P., & Marchetti, P. (2009). Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 52(6), 1083–1086. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1347-2>
- Mattison, J. A., Colman, R. J., Beasley, T. M., Allison, D. B., Kemnitz, J. W., Roth, G. S., Ingram, D. K., Weindruch, R., de Cabo, R., & Anderson, R. M. (2017). Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nature Communications*, 8(1), 14063.
<https://doi.org/10.1038/ncomms14063>
- McEwan, D. G., Popovic, D., Gubas, A., Terawaki, S., Suzuki, H., Stadel, D., Coxon, F. P., Miranda de Stegmann, D., Bhogaraju, S., Maddi, K., Kirchof, A., Gatti, E., Helfrich, M. H., Wakatsuki, S., Behrends, C., Pierre, P., & Dikic, I. (2015). PLEKHM1 Regulates Autophagosome-Lysosome Fusion through HOPS Complex and LC3/GABARAP Proteins. *Molecular Cell*, 57(1), 39–54. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.006>
- Menzies, F. M., Fleming, A., Caricasole, A., Bento, C. F., Andrews, S. P., Ashkenazi, A., Füllgrabe, J., Jackson, A., Jimenez Sanchez, M., Karabiyik, C., Licitra, F., Lopez Ramirez, A., Pavel, M., Puri, C., Renna, M., Ricketts, T., Schlotawa, L., Vicinanza, M., Won, H., ... Rubinsztein, D. C. (2017). Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron*, 93(5), 1015–1034. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.022>
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Structure and Function*, 27(6), 421–429. <https://doi.org/10.1247/csf.27.421>
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2004). In Vivo Analysis of Autophagy in Response to Nutrient Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosome Marker. *Molecular Biology of the Cell*, 15(3), 1101–1111.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E03-09-0704>
- Morselli, E., Maiuri, M. C., Markaki, M., Megalou, E., Pasparaki, A., Palikaras, K., Criollo, A., Galluzzi, L., Malik, S. A., Vitale, I., Michaud, M., Madeo, F., Tavernarakis, N., & Kroemer, G. (2010). The life span-prolonging effect of Sirtuin-1 is mediated by autophagy. *Autophagy*, 6(1), 186–188.
<https://doi.org/10.4161/auto.6.1.10817>
- Mortimore, G. E., & Schworer, C. M. (1977). Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. *Nature*, 270(5633), 174–176. <https://doi.org/10.1038/270174a0>
- Musiwaro, P., Smith, M., Manifava, M., Walker, S. A., & Ktistakis, N. T. (2013). Characteristics and requirements of basal autophagy in HEK 293 cells. *Autophagy*, 9(9), 1407–1417.
<https://doi.org/10.4161/auto.25455>

- Normandin, E., Chmelo, E., Lyles, M. F., Marsh, A. P., & Nicklas, B. J. (2017). Effect of Resistance Training and Caloric Restriction on the Metabolic Syndrome. *Medicine and science in sports and exercise*, *49*(3), 413–419. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001122>
- Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Yanaihara, C., Yanaihara, N., Halban, P., Renold, A. E., & Perrelet, A. (1984). Insulin, not C-peptide (proinsulin), is present in crinophagic bodies of the pancreatic B-cell. *The Journal of Cell Biology*, *98*(1), 222–228. <https://doi.org/10.1083/jcb.98.1.222>
- Osborne, T. B., Mendel, L. B., & Ferry, E. L. (1917). The Effect of Retardation of Growth Upon the Breeding Period and Duration of Life of Rats. *Science*, *45*(1160), 294–295. <https://doi.org/10.1126/science.45.1160.294>
- Palmeira-dos-Santos, C., Pereira, G. J. S., Barbosa, C. M. V., Jurkiewicz, A., Smaili, S. S., & Bincoletto, C. (2014). Comparative study of autophagy inhibition by 3MA and CQ on Cytarabine-induced death of leukaemia cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *140*(6), 909–920. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1640-4>
- Papandreou, I., Lim, A. L., Laderoute, K., & Denko, N. C. (2008). Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell Death & Differentiation*, *15*(10), 1572–1581. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.84>
- Perl, D. P. (2010). Neuropathology of Alzheimer’s Disease. *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York*, *77*(1), 32–42. <https://doi.org/10.1002/msj.20157>
- Pfeifer, U., & Warmuth-Metz, M. (1983). Inhibition by insulin of cellular autophagy in proximal tubular cells of rat kidney. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *244*(2), E109–E114. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1983.244.2.E109>
- Pietrocola, F., Pol, J., Vacchelli, E., Rao, S., Enot, D. P., Baracco, E. E., Levesque, S., Castoldi, F., Jacquelot, N., Yamazaki, T., Senovilla, L., Marino, G., Aranda, F., Durand, S., Sica, V., Chery, A., Lachkar, S., Sigl, V., Bloy, N., ... Kroemer, G. (2016). Caloric Restriction Mimetics Enhance Anticancer Immunosurveillance. *Cancer Cell*, *30*(1), 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.016>
- Pyo, J.-O., Yoo, S.-M., Ahn, H.-H., Nah, J., Hong, S.-H., Kam, T.-I., Jung, S., & Jung, Y.-K. (2013). Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nature Communications*, *4*. <https://doi.org/10.1038/ncomms3300>
- Racette, S. B., Weiss, E. P., Villareal, D. T., Arif, H., Steger-May, K., Schechtman, K. B., Fontana, L., Klein, S., & Holloszy, J. O. (2006). One Year of Caloric Restriction in Humans: Feasibility and Effects on Body Composition and Abdominal Adipose Tissue. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, *61*(9), 943–950.

- Raffaghello, L., Lee, C., Safdie, F. M., Wei, M., Madia, F., Bianchi, G., & Longo, V. D. (2008). Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(24), 8215–8220. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708100105>
- Raffaghello, L., Safdie, F., Bianchi, G., Dorff, T., Fontana, L., & Longo, V. D. (2010). Fasting and differential chemotherapy protection in patients. *Cell Cycle*, *9*(22), 4474–4476. <https://doi.org/10.4161/cc.9.22.13954>
- Ravussin, E., Redman, L. M., Rochon, J., Das, S. K., Fontana, L., Kraus, W. E., Romashkan, S., Williamson, D. A., Meydani, S. N., Villareal, D. T., Smith, S. R., Stein, R. I., Scott, T. M., Stewart, T. M., Saltzman, E., Klein, S., Bhapkar, M., Martin, C. K., Gilhooly, C. H., ... Kritchevsky, S. (2015). A 2-Year Randomized Controlled Trial of Human Caloric Restriction: Feasibility and Effects on Predictors of Health Span and Longevity. *The Journals of Gerontology: Series A*, *70*(9), 1097–1104. <https://doi.org/10.1093/gerona/glv057>
- Renehan, A. G., Zwahlen, M., Minder, C., O'Dwyer, S. T., Shalet, S. M., & Egger, M. (2004). Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: Systematic review and meta-regression analysis. *Lancet (London, England)*, *363*(9418), 1346–1353. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16044-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16044-3)
- Rozing, M. P., Westendorp, R. G. J., de Craen, A. J. M., Frölich, M., Heijmans, B. T., Beekman, M., Wijnsman, C., Mooijaart, S. P., Blauw, G.-J., Slagboom, P. E., van Heemst, D., & on behalf of the Leiden Longevity Study (LLS) Group. (2010). Low Serum Free Triiodothyronine Levels Mark Familial Longevity: The Leiden Longevity Study. *The Journals of Gerontology: Series A*, *65A*(4), 365–368. <https://doi.org/10.1093/gerona/glp200>
- Rubinsztein, D. C., Codogno, P., & Levine, B. (2012). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, *11*(9), 709–730. <https://doi.org/10.1038/nrd3802>
- Safdie, F., Brandhorst, S., Wei, M., Wang, W., Lee, C., Hwang, S., Conti, P. S., Chen, T. C., & Longo, V. D. (2012). Fasting enhances the response of glioma to chemo- and radiotherapy. *PLoS One*, *7*(9), e44603. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044603>
- Saleh, A. D., Simone, B. A., Palazzo, J., Savage, J. E., Sano, Y., Dan, T., Jin, L., Champ, C. E., Zhao, S., Lim, M., Sotgia, F., Camphausen, K., Pestell, R. G., Mitchell, J. B., Lisanti, M. P., & Simone, N. L. (2013). Caloric restriction augments radiation efficacy in breast cancer. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *12*(12), 1955–1963. <https://doi.org/10.4161/cc.25016>
- Sarkar, S., Perlstein, E. O., Imarisio, S., Pineau, S., Cordenier, A., Maglathlin, R. L., Webster, J. A., Lewis, T. A., O'Kane, C. J., Schreiber, S. L., & Rubinsztein, D. C. (2007). Small molecules

- enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington's disease models. *Nature chemical biology*, 3(6), 331–338. <https://doi.org/10.1038/nchembio883>
- Sasaki Hideyuki, Asanuma Hiroshi, Fujita Masashi, Takahama Hiroyuki, Wakeno Masakatsu, Ito Shin, Ogai Akiko, Asakura Masanori, Kim Jiyoong, Minamino Tetsuo, Takashima Seiji, Sanada Shoji, Sugimachi Masaru, Komamura Kazuo, Mochizuki Naoki, & Kitakaze Masafumi. (2009). Metformin Prevents Progression of Heart Failure in Dogs. *Circulation*, 119(19), 2568–2577. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.798561>
- Sciarretta, S., Maejima, Y., Zablocki, D., & Sadoshima, J. (2018). The Role of Autophagy in the Heart. *Annual Review of Physiology*, 80(1), 1–26. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121427>
- Seglen, P. O., Gordon, P. B., & Poli, A. (1980). Amino acid inhibition of the autophagic/lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 630(1), 103–118. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(80\)90141-5](https://doi.org/10.1016/0304-4165(80)90141-5)
- Selman, C., Kendaiah, S., Gredilla, R., & Leeuwenburgh, C. (2003). Increased hepatic apoptosis during short-term caloric restriction is not associated with an enhancement in caspase levels. *Experimental Gerontology*, 38(8), 897–903. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(03\)00091-3](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(03)00091-3)
- Smith, W. J., Underwood, L. E., & Clemmons, D. R. (1995). Effects of caloric or protein restriction on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in children and adults. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 80(2), 443–449. <https://doi.org/10.1210/jcem.80.2.7531712>
- Stekovic, S., Hofer, S. J., Tripolt, N., Aon, M. A., Royer, P., Pein, L., Stadler, J. T., Pendl, T., Prietl, B., Url, J., Schroeder, S., Tadic, J., Eisenberg, T., Magnes, C., Stumpe, M., Zuegner, E., Bordag, N., Riedl, R., Schmidt, A., ... Madeo, F. (2019). Alternate Day Fasting Improves Physiological and Molecular Markers of Aging in Healthy, Non-obese Humans. *Cell Metabolism*, 30(3), 462–476.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.07.016>
- Stewart, W. K., & Fleming, L. W. (1973). Features of a successful therapeutic fast of 382 days' duration. *Postgraduate Medical Journal*, 49(569), 203–209.
- Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., Wang, X., He, C., & Pan, H. (2013). Autophagy and chemotherapy resistance: A promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death & Disease*, 4(10), e838–e838. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.350>
- Szalai, P., Hagen, L. K., Sætre, F., Luhr, M., Sponheim, M., Øverbye, A., Mills, I. G., Seglen, P. O., & Engedal, N. (2015). Autophagic bulk sequestration of cytosolic cargo is independent of LC3, but requires GABARAPs. *Experimental Cell Research*, 333(1), 21–38. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.02.003>

- Varady, K. A., Bhutani, S., Church, E. C., & Klempel, M. C. (2009). Short-term modified alternate-day fasting: A novel dietary strategy for weight loss and cardioprotection in obese adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *90*(5), 1138–1143.
<https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28380>
- Wang, J., Ho, L., Qin, W., Rocher, A. B., Seror, I., Humala, N., Maniar, K., Dolios, G., Wang, R., Hof, P. R., & Pasinetti, G. M. (2005). Caloric restriction attenuates β -amyloid neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, *19*(6), 1–18.
<https://doi.org/10.1096/fj.04-3182fje>
- Wei, M., Brandhorst, S., Shelehchi, M., Mirzaei, H., Cheng, C. W., Budniak, J., Groshen, S., Mack, W. J., Guen, E., Di Biase, S., Cohen, P., Morgan, T. E., Dorff, T., Hong, K., Michalsen, A., Laviano, A., & Longo, V. D. (2017). Fasting-mimicking diet and markers/risk factors for aging, diabetes, cancer, and cardiovascular disease. *Science Translational Medicine*, *9*(377).
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aai8700>
- Weindruch, R., & Walford, R. L. (1982). Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: Effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science*, *215*(4538), 1415–1418.
<https://doi.org/10.1126/science.7063854>
- Wohlgemuth, S. E., Julian, D., Akin, D. E., Fried, J., Toscano, K., Leeuwenburgh, C., & Dunn, Jr., William A. (2007). Autophagy in the Heart and Liver During Normal Aging and Calorie Restriction. *Rejuvenation Research*, *10*(3), 281–292. <https://doi.org/10.1089/rej.2006.0535>
- Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T. M., Kitamura, A., Sekito, T., Kondo-Kakuta, C., Ichikawa, R., Kinjo, M., & Ohsumi, Y. (2012). Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *The Journal of Cell Biology*, *198*(2), 219–233.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201202061>
- Yang, L., Licastro, D., Cava, E., Veronese, N., Spelta, F., Rizza, W., Bertozzi, B., Villareal, D. T., Hotamisligil, G. S., Holloszy, J. O., & Fontana, L. (2016). Long-Term Calorie Restriction Enhances Cellular Quality-Control Processes in Human Skeletal Muscle. *Cell Reports*, *14*(3), 422–428. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.042>
- Yu, L., Chen, Y., & Tooze, S. A. (2018). Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*, *14*(2), 207–215. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1378838>
- Zaffagnini, G., & Martens, S. (2016). Mechanisms of Selective Autophagy. *Journal of Molecular Biology*, *428*(9, Part A), 1714–1724. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.004>
- Zachari, M., & Ganley, I. G. (2017). The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays in Biochemistry*, *61*(6), 585–596. <https://doi.org/10.1042/EBC20170021>

Seznam internetových zdrojů

[1] <https://www.creative-diagnostics.com/autophagy.htm>, (10.04.2021)

[2] <https://ourworldindata.org/causes-of-death>, (20.04.2021)