

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Petra Potomová

Nekonvenční přístupy v léčbě glioblastomu
Unconventional protocols in treatment of glioblastoma

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Iva Kubíková, Ph. D.

Praha, 2021

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své školitelce, Mgr. Ivě Kubíkové, Ph.D., za trpělivost a ochotu navzdory mým nekonečným dotazům. Díky si zaslouží i mí rodiče a přátelé, kteří mě během psaní této práce viděli jen zběžně.

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, 24.04.2021

Podpis.....

Abstrakt:

Glioblastoma multiforme je jeden z nádorů, které dosud vzdorují současně využívaným metodám léčby (radioterapie a chemoterapie). Vzhledem k neúspěchu jeho úplného potlačení došlo k vývoji terapií, které nesplňují konvenční představy o protinádorové léčbě. Právě ale tyto metody by mohly vést k zabránění další proliferace buněk a růstu nádoru. Terapie, jako je anti-angiogeneze, ketogenní dieta, fototermální terapie a ferroptóza, mohou být zacíleny proti nádoru a významně naklonit nádorovou léčbu v prospěch pacientů a doktorů. Přestože kvůli vedlejším efektům, přídavné toxicitě či vzniku rezistence je nutné je dále optimalizovat, hrají rozhodující roli v budoucnosti onkologie.

Klíčová slova: glioblastoma multiforme; onkologická léčba; anti-angiogeneze; ketogenní dieta; fototermální terapie; ferroptóza

Abstract:

Glioblastoma multiforme is one of the tumours defying the treatment that is currently in use (radiotherapy and chemotherapy). Due to the failure in its complete repression, new methods were developed, methods that do not fulfil the traditional expectation about oncological treatment. But it's these methods that could lead to inhibition of further proliferation and growth of the tumour. Therapies, like anti-angiogenesis, ketogenic diet, photothermal therapy or ferroptosis, can be targeted against the tumour and significantly tip the oncological treatment in favour of patients and doctors. Despite the need to optimize them due to side effects, added toxicity or development of resistance, they play a vital role in the future of oncology.

Keywords: glioblastoma multiforme, oncological treatment; anti-angiogenic therapy, ketogenic diet, photothermal therapy, ferroptosis

Seznam zkratek

ADA	„American Diabetes Association“, Americká diabetická asociace
ATP	„adenosine triphosphate“, adenosintrifosfát
BBB	„blood-brain-barrier“, hematoencefalická bariéra
BDH1	„D- β -hydroxybutyrate dehydrogenase“, D- β -hydroxybutyrát dehydrogenáza
BHB	„ β -hydroxybutyrate“, β -hydroxybutyrát, ketolátka
CD4+ T buňky	pomocné T-lymfocyty s diferenciací skupinou 4
CT	„computed tomography“, výpočetní tomografie
DMT1	„divalent metal-ion transporter 1“, transportér železa
DNA	„deoxyribonucleic acid“, deoxyribonukleová kyselina
EGF	„epidermal growth factor“, epidermální růstový faktor
EGFR	„epidermal growth factor receptor“, receptor EGF
EGFRvIII	mutantní EGFR (varianta III)
FDA	„Food and Drug Administration“, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FGF	„fibroblast growth factor“, fibroblastový růstový faktor
FSP1	„ferroptosis suppressor protein 1“, ferroptózu supresující protein 1
GPX4	„glutathione peroxidase 4“, glutathionperoxidáza 4
GSC	„glioblastoma stem-like cells“, kmenové buňky glioblastomu
HDL	„high-density lipoprotein“, vysokodenzitní lipoprotein
HER2	„human epidermal growth factor“, receptor humánního epidermálního růstového faktoru
HIF-1	„hypoxia-inducible factor 1“, hypoxií indukovaný faktor 1
HK2	„hexokinase 2“, hexokináza 2
IRE	„iron responsive elements“, elementy reagující na železo
IREB2	„iron-regulatory protein“, protein reagující metabolismus železa
Keap1	„Kelch-like ECH-associated protein 1“
LIP	„labile iron pool“, hladina nevázaného železa v buňce
MFA	„magnetic fluid hyperthermia“, vyvolání hypertermie pomocí magnetického pole
MRI	„magnetic resonance imaging“, magnetická rezonance
NCOA4	„nuclear receptor coactivator 4“, ferritinový kargo-receptor
NEET	2Fe-2S proteiny regulující koncentrace železa a volných radikálů v buňce
NIR	„near infra-red“, záření blízké infračervenému záření (pro experimentální účely se používá rozmezí mezi 650-900 nm)
NK- κ B	„nuclear factor κ B“, jaderný faktor κ B

Nrf2	„nuclear factor (erythroid-derived)-like 2“, jaderný faktor 2
OXCT1	„3-oxoacid coenzyme A transferase 1“, 3-oxoacid koenzym A-transferáza
PEG	„polyethylene glycol“, polyethylenglykol
PKM2	„pyruvate kinase M2“, pyruvátkináza, isoforma M2
PlGF	„placental growth factor“, placentární růstový faktor
p53	tumor supresorový protein p53
PTT	„photothermal therapy“, fototermální terapie
RF	„radiofrequency ablation“, využití rádiových vln k indukci hypertermie
ROS	„reactive oxygen species“, volné kyslíkové radikály
STEAP3	„six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3“, reductázy iontů železa
TKI	„tyrosine kinase inhibitor“, tyrosinkinázové inhibitory
TfR1	„transferrin receptor“, transferrinový receptor
UV	„ultraviolet light“, ultrafialové záření (365 nm)
VEGF	„vascular endothelial growth factor“, vaskulární endotelový růstový faktor
VEGFR	„vascular endothelial growth factor receptor“, receptor VEGF, dále dělen do tří typů (1-3)
WHO	„World Health Organization“, Světová zdravotnická organizace

Obsah

Úvod	1
Metody	3
1. Anti-angiogeneze	4
1.1. angiogeneze a její blokace v onkologii	4
1.2. vaskularizace nádoru	5
1.3. anti-angiogenní terapeutika	6
1.4. problémy	7
2. Ketogenní dieta	9
2.1. ketogenní dieta a její využití	9
2.2. buněčný metabolismus nádorových buněk	9
2.3. mechanismus ketogenní diety	11
2.4. účinnost – výhody i nevýhody	12
2.5. problémy, kterým čelí další výzkumy	14
3. Fototermální terapie	15
3.1. mechanismus	15
3.2. zlaté nanočástice – charakteristika i využití	15
3.3. modifikace nanočástic	17
3.4. doručení na místo určení	19
3.5. excitace, spuštění terapie	20
4. Ferroptóza	22
4.1. ferroptóza – definice, mechanismus a patologie	22
4.2. metabolismus železa zdravé i nádorové tkáně	23
4.3. spuštění ferroptózy pro klinické účely – nanočástice	24
4.4. doručení do buňky a spuštění ferroptózy	25
4.5. otázky pro další studium	26
Závěr	27
Seznam použité literatury	28

Úvod

Glioblastoma multiforme (také označovaný jako glioblastom) patří mezi jedny z nejčastějších maligních nádorů centrální nervové soustavy. Přestože je jeho incidence poměrně nízká (2-5 lidí ze 100 000) [1], tvoří více než 60 % všech primárních nádorů mozku u dospělých pacientů [2]. Nejčastěji je pozorován u osob starších 60 let, ale může se vyskytovat v jakémkoli věku (u dětí je však méně častý). Statistiky také poukazují na častější výskyt u mužů než u žen (v poměru 1,6:1) [1] a vyšší počty případů mají, oproti rozvojovým oblastem, země vyspělé [2].

Jedná se o gliom – primární mozkový nádor. Gliomy jsou řazeny do tříd (I-IV) podle zhoubnosti, kdy třída I má pouze malý proliferační potenciál. Třídy II-IV potom obsahují invazivní, maligní nádory. Glioblastom je považován za nejagresivnější nádor mozku (proto je také řazen do IV. třídy) a původem je z neurálních či gliových buněk, které prošly maligní transformací [1].

Dle způsobu vzniku můžeme rozlišovat glioblastom primární a sekundární. Primární vzniká *de novo* a je častější u starších pacientů, zatímco sekundární, častější u pacientů mladších, se tvoří z nádorů nižších tříd [1]. I přesto, že byly objeveny mutace, které jsou schopny vznik glioblastomu zapříčinit, v praxi je genetická predispozice pozorována pouze u 5-10 % pacientů [2]. Byly vypracovány i studie zabývající se enviromentálními riziky (kouření, záření obrazovek mobilních telefonů), ale žádný faktor nebyl prokazatelně přispívající ke vzniku glioblastomu [1].

Nádor může zapříčinit několik projevů. Může působit přímo na mozkovou tkáň a způsobovat nekrózu. Dle pozice a velikosti nádoru pak dochází k defektům ve specifické funkci mozku. Například pacient s glioblastomem v temporálním laloku může trpět problémy se sluchem [2]. Rostoucí nádorová masa a okolní otok (edém v lékařské terminologii) vedou ke zvýšení intrakraniálního tlaku, který způsobuje sekundární projevy nádoru. Hlavním sekundárním projevem je bolest hlavy, kterou trpí až polovina pacientů [2]. Dalším vedlejším efektem může být spuštění sekundárních epileptických záchvatů – tento symptom je projevuje v závislosti na lokalizaci nádoru u 30-50 % případů [3]. Příčina smrti u pacientů u GBM většinou bývá způsobena sekundárními symptomy – otokem a vysokým intrakraniálním tlakem [1].

Standartní léčebný proces se skládá z dvou částí – vyoperování nádoru a následné další léčby. Chirurgický zákrok je prvním krokem, který pomůže při kontrole záchvatů, dochází také k zastavení nekrózy okolní tkáně a pokroku neurologického deficitu [2]. Zákrok je běžně užívaný, ale není bez komplikací. Při výskytu nádoru v oblasti mozkového kmene či bazálních ganglií vyoperování není možné, právě kvůli problematickému umístění [2]. Je nutné poznamenat, že všechny zásahy do mozku jsou provázeny mnohými riziky a i při relativně přístupném nádoru může dojít k významnému poškození mozku. Další léčbou je většinou chemoterapie prostřednictvím cytostatika temozolomidu a radioterapie. I u těchto metod může, jako u chirurgického vyjmutí, dojít k poškození zdravé tkáně. Další problematikou je vznik nekróz (u radioterapie) nebo vznik rezistence (u obou) [2].

Bohužel má glioblastom poměrně špatnou prognózu. Jedná se o nádor s jednou z nejvyšších mortalit a opakovaný výskyt je prakticky nevyhnutelný. Bez chirurgického zákroku je doba průměrného dožití pacientů 14 týdnů [1], zatímco při využití chirurgického zákroku a další léčby je medián přežití až 15 měsíců [4]. Pouze polovina pacientů se dožije roku po diagnóze a 5 let po diagnóze se počet přeživších sníží pod 10 % [1]. Závisí však na věku pacienta, velikosti a pozici nádoru, předchozích poraněních nervové soustavy a mnoha dalších faktorech. Hlavně věk hraje u pacientů velkou roli – zatímco se 18 měsíců po diagnóze dožije přibližně 66 % pacientů pod 40 let, stejné doby se u osob starších 60 let dožije méně než 10 % [1].

Glioblastom je nádor agresivní a heterogenní. Jeho rychlá infiltrace do okolní tkáně činí vyjmutí veškeré nádorové tkáně téměř nemožné, což způsobuje velmi vysoké riziko rekurence [1]. Právě problém opakovaných výskytů je jednou z hlavních příčin vysoké mortality. Invazivní povaha je způsobena subpopulací specifických nádorových buněk s expresí genů ovlivňující přežití buňky a schopnost migrace [5]. Exprese je nejspíše spuštěna podmínkami jádra nádoru – buňky zde jsou vystaveny extrémním stresovým faktorům jako je snížené pH, akumulace metabolitů nebo hypoxie. Podle míry invazí lze rozlišit i mnoho buněčných linií glioblastomu – mezi vysoce invazivní patří například T1402 a T1456, zatímco mezi méně invazivní SOX8 nebo NDRG2 [5]. Nádorové linie s vysoce invazivními pohyblivými buňkami jsou více agresivní než nádory méně invazivní [5]. I když jsou migrující buňky schopné se pohybovat mozkovou tkání, většina rekurentních nádorů se vyskytuje kolem 2-3 cm od místa původního výskytu [1], [2]. V minulosti docházelo dokonce k hemisferektomii (odstranění celé hemisféry), dopady na kvalitu života pacienta byly ale obrovské a rekurence nebyla plně zastavena [6], [7]. Na rozdíl od většiny nádorů schopných metastáz u glioblastomu není běžné, aby invazivní buňky pronikaly do krevního řečiště a cestovaly cévami dále do těla [5]. Sekundárně vzniklé nádory tedy v absolutní většině zůstávají v mozku, i když byly pozorovány některé extrakraniální. Incidence takových případů je ale přibližně pouze 0,2 % [8].

Dle WHO v roce 2020 zemřelo celosvětově kvůli nádorům centrální nervové soustavy přes 300 000 lidí, v žádném případě tedy nedosahují na první místo „nejsmrtelnějšího nádoru“, kterým je rakovina prsu s více než 2 miliony úmrtí [9]. I přesto si nádory mozku zasluhují zvýšenou pozornost vědců. Po úvodních statistikách je jasné, že na značné části výše zmíněných úmrtí se podílí glioblastom. V současné době je však léčba tohoto nádoru nedostačující – nádory se opakovaně vytváří po chirurgickém vyjmutí, chemo i radioterapiích. Je třeba zaměřit se na nové metody, které by byly méně invazivní a působily i na migrující buňky vyskytující se mimo solidní masu nádoru. S pomocí těchto nových, nekonvenčních způsobů terapie by mohlo dojít k prodloužení a zlepšení kvality života pacientů. V této práci se zaměřím na několik nadějných možností, přičemž několik z nich je už využíváno ve fázi pilotních studií.

Metody

Pro začátek je nutné poznamenat, že existuje více metod, které jsou probírány ve vědeckých studiích a které by potenciálně mohly v budoucnu zlepšit efektivitu léčby glioblastomu. V této práci se budu věnovat metodám, které už jsou využívány v klinických studiích a mají dostatečné množství vědeckých publikací pro ucelený pohled na problematiku zkoumané metody.

1. Anti-angiogeneze

1.1. angiogeneze a její blokáce v onkologii

Na počátku formace využívá nádor k zásobení svých buněk kyslíkem a živinami již přítomné krevní cesty, ale vzhledem k abnormálně rychlé proliferaci masa nádoru rychle roste a původní zásobení se stává nedostačujícím. Nastává změna („angiogenic switch“), kdy hypoxie nastartuje zvýšenou expresi pro-angiogenních faktorů [10], [11]. Prostřednictvím vazby těchto exprimovaných molekul na příslušné receptory dochází k proliferaci endotelu stěn cév a tvorbě nových kapilár. Nádor si tak začíná neorganizovaně vytvářet nové aberantní cévy rapidní angiogenezí. Při využití anti-angiogenní léčby dochází k blokáci pro-angiogenních faktorů či receptorů a tedy i celé dráhy, což vede k zamezení další tvorby poškozených cév [12].

Angiogeneze je umožněna plejádou různých molekulárních drah pomocí rozličných pro-angiogenních faktorů. V klinice je pro blokáci nejvyužívanější vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) se svým receptorem (VEGFR2), ale existuje více molekul a receptorů, které je možné využít – například fibroblastový (FGF) a epiteliální (EGF) růstové faktory, chemokiny nebo angiopoetiny [10], [12].

Glioblastom je obecně považován za velmi vaskularizovaný nádor s vysokou expresí pro-angiogenních faktorů (velmi prominentní je právě VEGF), což jej činí ideálním pro léčbu anti-angiogenezí [10], [11]. Na rozdíl od ostatních (v práci popsaných) metod už se dokonce několik let využívá v praktické léčbě. V roce 2009 FDA povolilo využití anti-angiogenní látky bevacizumab pro pacienty s rekurentním glioblastomem [11]–[13], ale své uplatnění nachází i při léčbě rakoviny tlustého střeva [14] či ledvin [15]. Dalo by se říci, že se po chemo a radioterapii jedná o nejpoužívanější pooperační léčbu glioblastomu, její potenciál však stále není plně využitý – primárně dochází k nasazení bevacizumabu rekurentním pacientům či při selhání standardní terapie [12]. Nově diagnostikovaným pacientům není doporučován – v kombinaci se standardní léčbou nedocházelo k prodloužení doby přežití a navíc látka způsobuje vážné vedlejší účinky [12], [13], [16]. U rekurentních pacientů se však v kombinaci s chemoterapií zdá být výhodná – dobu přežití oproti chemoterapii samotné prodlužuje a je dobře tolerována [12], [17]. Pro plné pochopení rozdílů v odpovědi nově diagnostikovaného nádoru od rekurentního bude potřeba provést na toto téma více studií, avšak někteří vědci se domnívají, že u nově diagnostikovaných nádorů dochází k rychlé tvorbě rezistence proti bevacizumabu a obnovení ztracené vaskulatury [12].

Ačkoli dochází k primárnímu využití anti-VEGF, je důležité věnovat pozornost blokáci i dalších metabolických drah. Některé z testovaných anti-angiogenních látek, které by mohly k těmto účelům sloužit, jsou například aflibercept, cediranib, nebo sorafanib [11].

1.2. vaskularizace nádoru

Pro homeostázu mozku je velmi důležitá hematoencefalická bariéra (BBB), která se nachází mezi centrální nervovou soustavou a krevním oběhem. Jedná se o specializované rozhraní regulující transport molekul oběma směry – do i z mozkových buněk. Je tvořeno vrstvou endoteliálních buněk propojených pomocí těsných spojů, dalším komponentem je podpůrná vrstva pericytů, které se uplatňují při regulaci některých funkcí buněk endotelu či při struktuře cév [12], [18], [19]. A v neposlední řadě se na BBB podílí i astrocyty – ty, mimo svou strukturální úlohu, také částečně regulují těsné spoje i samotné endoteliální buňky [12].

Bariéra reguluje nejen toky iontů, ale i dalších molekul (toxinů, peptidů) a působí tím značné problémy s dopravou léčiv k nádoru [4], [12], [19]. Látky nejsou schopny v dostatečné míře přejít přes BBB pasivně (difuzí) a musí využívat aktivní transport (transportéry nebo transcytózu) [12]. Dodání léčiv do mozku je tedy přítomností BBB velmi omezeno [12] a pro dostatečné množství terapeutik v místě nádoru je tedy nutné razantní zvýšení jejich dávek, což se samozřejmě negativně projevuje v podobně vedlejších účinků, celkového snížení efektivity léčby, až vzniku rezistence [4], [20].

Existují dva hlavní pohledy efektu glioblastomu na BBB – některé články zastávají názor, že BBB zůstává nedotčená [4], jiné tvrdí, že dochází k její disrupci [12]. Pokud by BBB opravdu zůstávala nenarušená, regulaci této bariéry by bylo nutné obejít, ať už jejím narušením, využitím k transportu uzpůsobených nanočástic nebo pomocí transportních vehiklů [4], [19]. Články s opačným názorem pozorují, že v prvotní fázi svého vývoje glioblastom bariéru téměř nenarušoval, ale postupem času kvůli nárůstu své hmoty k poškození došlo [12]. Mechanismus disrupce je stále do značné míry neznámý, jako pravděpodobná možnost se však jeví poškození při migraci invazních buněk. Tyto nádorové buňky putují podél cév a při cestování odtlačí výběžky astrocytů, čímž může dojít k narušení integrity bazální membrány cévy a degradaci proteinů podílejících se na těsných spojkách [12]. Je také nutné poznamenat, že narušení BBB je nebezpečné kvůli zvýšené akumulaci cytotoxických a neurotoxických makromolekul a spojuje se se vznikem neurodegenerativních poruch [18].

Tyto dvě možnosti se zdají neslučitelné, při shrnutí některých studií je však možné navrhnout jejich kompromis. Jak navrhuje jeden ze zdrojů – heterogenita nádoru může být pozorována i v rámci jeho efektu na svou okolní BBB. U některých regionů je možné pozorovat BBB nedotčenou a tedy i problematickou k doručení léčiv, což nekompromisně vyústí v celkový neúspěch terapie [21]. Stejný článek také navrhuje, že při využití zobrazovacích technik a zaměření větší pozornosti na penetraci léčiv do oblastí nepoškozenou BBB by mělo dojít k celkovému zlepšení efektivity léčby [21].

Nádorové cévy jsou morfologicky a funkčně velmi odlišné od těch, které můžeme najít ve zdravé tkáni [12]. Vzhledem k defektním spojením buněk v endotelu stěn cév a rozvolnění bazální membrány dochází k extrémní permeabilitě cév (v některých člancích se proto označují jako „leaky“ – protékající) [4], [12]. Vysoká permeabilita sice umožňuje zvýšenou propustnost léčiv do místa nádoru, ale také se

podílí na zvýšení tlaku mezibuněčné tekutiny. Tento tlak bývá u solidních nádorů zvýšený [22], [23] a slouží jako další bariéra, kvůli které k ideální akumulaci léčiv nedochází, naopak přispívá k rozšíření metastazujících buněk [12], [22] a vede k tvorbě otoku [24]. Stává se proto důležitým indikátorem, podle kterého je třeba zvolit nejefektivnější léčebný postup [23].

Změny lze ale pozorovat i na celé struktuře krevních cest – sítě jsou v nádorové tkáni pokrivené a dilatované [12], [24]. Ve výsledku dochází kvůli výše zmíněným defektům k odchylkám a anomáliím v krevním toku, což se projeví na nerovnoměrném přísunu živin a kyslíku do různých regionů nádoru [12]. Glioblastom má hojně vaskularizované periferie, zatímco jádro je, kvůli nedostatku cévního zásobení, nekrotické [10]. Toto tvrzení je však velmi zjednodušené – ve skutečnosti dochází k vytvoření mnohem větší regionální heterogenity nádoru. Například v závislosti na dostupnosti kyslíku je možné rozlišit oblasti hypoxie, acidózy či nekrózy [24]. Regiony se od sebe vzájemně liší ale i molekulární expresí, kompozicí buněk a fyziologickým chováním [10].

Z hlediska terapie při dysfunkci cév a rozdílech v krevním zásobení dochází ke znemožnění homogenní a efektivní dopravy léčiv do všech částí nádoru [11], [12].

1.3. anti-angiogenní terapeutika

Anti-angiogenní terapie je založena na blokaci pro-angiogenních faktorů či jejich receptorů, přesný mechanismus jejich účinku však není zatím znám. Existují dvě teorie jejich funkce – první navrhuje, že dochází k redukci a destrukci nádorem vytvořených cév, druhá se spíše přiklání k tomu, že dochází k normalizaci jejich struktury a funkce [11]. Remodelací původně pokrivené a dysfunkční cévní sítě, ať už redukcí či normalizací jednotlivých cév, by bylo možné přiblížit její podobu normálnímu stavu a tím navrátit i její původní vlastnosti. Došlo by k usnadnění transportu a akumulace léčiv a následnému zlepšení efektu radio a chemoterapie [12].

Dalším možným způsobem působení této léčby je narušení prostředí okolo nádorových kmenových buněk a zamezení jejich komunikace s endotelem, což značně omezí jejich regenerační schopnosti [11]. Blíže budou kmenové buňky a jejich funkce přiblíženy v části [2.2 buněčný metabolismus nádorových buněk](#).

Kvůli častým otokům, které jsou způsobeny disrupcí BBB a nepoměry toků látek přes permeabilní stěny cév [11], dochází u mnoha pacientů k předepsání kortikosteroidů, které edém potlačují. S dávkami kortikosteroidů je však spojená značná toxicita a dlouhodobé zdravotní problémy – osteoporóza, přibírání na váze, insomnie, infekce a některé psychiatrické účinky [11]. Při využití anti-angiogenních léčiv by mělo dojít k blokaci pro-angiogenních faktorů ústící v navrácení integrity BBB a redukci abnormálních cév. Výtok tekutin do mezibuněčných prostor by tedy měl být omezen – docházelo by ke zmírnění otoku, což by znamenalo snížení až úplné vysazení kortikosteroidů [11], [12]. Tato teorie se u některých studií opravdu projevila [16], jiné však změny nepozorovaly [25].

Jako anti-angiogenní terapeutika se využívají protilátky nebo malé molekuly inhibující tyrosinkinázovou aktivitu (TKI) [11]. Zatímco protilátky jsou dražší, je u nich nutné intravenózní podání a jejich prostup je limitovaný permeabilitou BBB, výhodné jsou především delší dobou svého působení. Jedná se o velmi selektivní agenty, což limituje pravděpodobnost zkřížené reaktivity a případné vedlejší efekty. Oproti tomu TKI mají širší pole působnosti, čímž se ale také zvyšuje riziko nežádoucích účinků, přičemž je nutné je, kvůli kratšímu poločasu rozpadu, podávat častěji. Nemusí ale být vpravovány injekčně, jsou stabilní i v orální formě [11].

V klinickém prostředí se nejčastěji využívá již zmíněný bevacizumab. Jedná se o rekombinantní monoklonální protilátku proti VEGF-A, který je v glioblastomu, jak už bylo poznamenáno, často extrémně exprimován [12], [16]. Při použití byla pozorována normalizace vaskulatury a speciálně u nádorů s vysokou expresí VEGF docházelo k významnému zvýšení senzitivity k cytotoxickým agentům a změnám v migraci [12]. Články popisují využití nejen v kombinaci s temozolomidem, ale i spolu s dalšími látkami – irinotecanem [11], lomustinem [25]. Příslušné studie však zaznamenávají pouze prodloužení doby bez progresu nádoru nikoli celkové doby dožití, a navíc u těchto kombinačních terapií dochází ke zvýšené toxicitě.

Další využívanou protilátkou je aflibercept. Opět váže VEGF-A, dokonce s větší afinitou než bevacizumab. Zároveň však blokuje VEGF-B a placentální růstový faktor (PlGF). Je u ní však menší procento odezvy – zatímco u bevacizumabu je 3-48 %, aflibercept má odezvu jen 30 % [11]. I u této látky však byly pozorovány dobré výsledky v kombinaci s radioterapií. Bohužel ani tato látka nedokázala zabránit rekurentnímu vzniku nádorů [11].

Z TKI je nejstudovanější cediranib. Jde o blokátor všech tří VEGFR, přičemž slabě působí i na některé další angiogenní faktory [26]. Je využíván v orální podobě jednou denně a jeho odezva je poměrně vysoká (56 %). Při využití se snížila velikost a permeabilita cév a došlo i k redukci otoku [11], prokázaly se ale i vedlejší efekty podobné bevacizumabu – průjmy, únava a snížené počty trombocytů, neutrofilních granulocytů a leukocytů [26]. Další TKI jsou například sorafanib, sunutinib, vandetanib nebo cabozantinib [11].

1.4. problémy

První z nevýhod anti-angiogenních léčiv je spojena s magnetickou rezonancí (MRI). V průběhu terapie se využívá zobrazení odezvy nádoru na příslušnou léčbu – nejčastěji právě pomocí MRI. Při terapii dojde k (alespoň částečnému) navrácení původní permeability cév a rekonstrukci integrity BBB, což vede ke zhoršení kontrastu při snímání. Vzhledem ke snížení kvality získaných snímků je zapotřebí najít a využít jiné zobrazovací techniky pro zkoumání odpovědi nádoru [11].

Největším problémem metody je však značná sledovaná toxicita. Vedlejší účinky se projevují únavou, nevolností, vyrážkami, svěděním, průjmy, špatným hojením poranění, ale i krvácením, trombózou, sníženými počty lymfocytů, neutrofilních granulocytů a trombocytů v krvi, perforací střev a

srdečním selháním [11]–[13], [16], [27]. Vzhledem k možným rizikům je proto nutné zhodnotit, zda výhody spojené s léčbou převyšují efekty vedlejších účinků. A pro plné využití anti-angiogenní léčby je třeba zaměřit se nejen na toxicitu látek samotných, ale i jejich kombinaci s využitými chemoterapeutiky, což je kvůli nepřítomnosti standartní chemoterapie značně ztíženo [12].

Léčba glioblastomu se potýká s významnou rezistencí nádoru proti všem typům terapie a ani anti-angiogenní léčba není výjimkou. Rezistence je často způsobena přechodem nádorových buněk na alternativní angiogenní dráhu, která není léky blokována (například přes hypoxii odolnou dráhu indukovanou HIF-1) [24]. Přechod také může umožnit vznik vzdálených agresivních sekundárních lézí [12]. Přesto, že byly pozorovány změny při výběru angiogenní dráhy, prozatím nebyly prokázány mutace v genech pro VEGF ani pro jeho receptor [11].

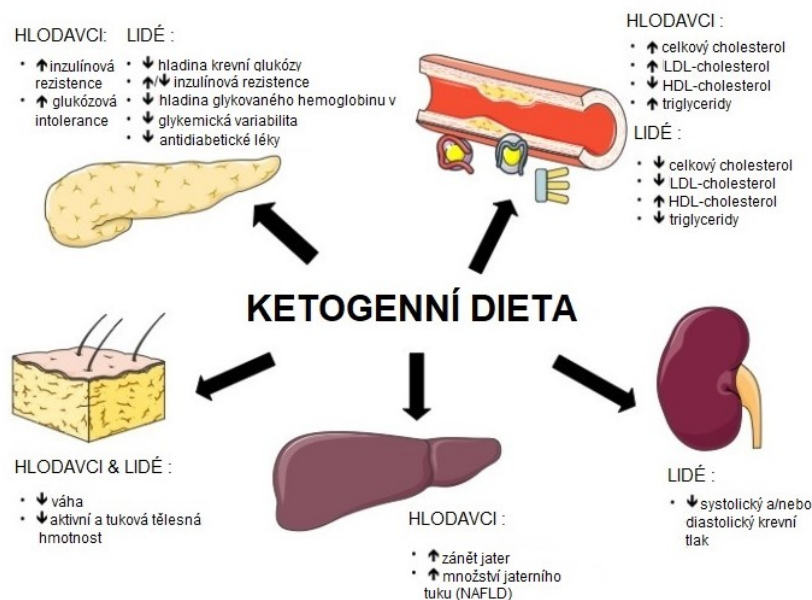
Některé ze studií naznačují přídatnou funkci makrofágů v nádorové angiogenezi. Kvůli nestandardním podmínkám mikroprostředí by makrofágy měly být povolávány do nádoru a přispívat zde k angiogenezi a růstu nádoru [11], [28]. Speciálně se jedná o makrofágy M2 typu, kteří působí imunosupresivně na své okolí pomocí vylučovaných proti-zánětlivých cytokinů. Ty M2 podporuje angiogenezi, zatímco druhý typ (M1) na své okolí působí pro-zánětlivě a angiogenezi zabraňuje. Navíc se přivolání makrofágové (kvůli své migraci tkání) podílí na degradaci extracelulární matrix, čímž nádoru usnadní proliferaci a migraci invazivních buněk [28]. Supresí VEGF receptoru na povrchu makrofágů pomocí anti-angiogeneze by tedy mohlo dojít k omezení dalšího růstu tumoru [11].

2. Ketogenní dieta

2.1. ketogenní dieta a její využití

Ketogenní dieta (dále označována jako ketodieta) je jedna z mnoha typů diet, které se soustředí na omezení příjmu sacharidů. Je typická nejen redukcí sacharidů v přijímané potravě, ale i proteinů, potřebný kalorický příjem jedince pak musí být vyrovnán právě zvýšeným příjmem tuků. Označuje se tedy jako „high-fat, low-carbohydrate, low(případně adequate)-protein“. Jako klasický typ považujeme ketodietu skládající se z tuků:sacharidů s proteiny v poměru 4:1 [29]. Nejde však o jedinou možnost, a proto je nutné při porovnávání výsledků studií vzít v potaz i využitý typ diet – například můžeme rozlišovat restriktivní ketogenní dietu, která mimo omezení příjmu sacharidů také omezuje příjem kalorií [30].

V současné době se ketodieta využívá k léčbě epilepsie [31], neurodegenerativních onemocnění (například Alzheimerova choroba [32] nebo Parkinsonova choroba [33]), diabetu [31], některých typů rakovin [29], [31] a mnoha dalších [30], [31]. Výzkumy se většinou provádí na myších modelech, proto je nutné podotknout, že hlodavci mají přirozeně velmi odlišnou stravu od lidí. Proto lze očekávat odlišnou metabolickou reakci, než by byla sledována v projektech s lidskými pacienty. Nejedná se sice o ideální modely pro pokusy, efekt ketodiety však odráží mnohem komplexněji než lze pozorovat u tkáňových kultur. Ty se sice také využívají, většinou ale slouží spíše pro odhalení specifických signálních či metabolických drah na molekulární úrovni. Některé rozdíly mezi účinky ketodiety u hlodavců a lidí jsou vyznačeny na *Obr. 1* [34], projevy a vedlejší účinky budou ale v textu dále probírány ve větší podrobnosti později (viz *2.4 účinnost – výhody i nevýhody*).



Obr. 1 - Efekty ketogenní diety v hlodavcích a v lidech [34, přeloženo]

2.2. buněčný metabolismus nádorových buněk

Ve zdravých buňkách je možno pozorovat několik různých metabolických drah podle dostupnosti energetických zdrojů získaných z přijímané potravy. U nádorových tkání však dochází

k primárnímu využívání glukózy, a to bez ohledu na přísun kyslíku. Tento specifický metabolismus nádorů se označuje jako Warburgův efekt a postupem času se stal jedním z centrálních dogmat onkologie. Právě tento princip má možnost hrát klíčovou roli v terapii [35], [36]. Testováním různých typů nádorů u lidských pacientů bylo zjištěno, že v nádorových buňkách většinou dochází nejen k potlačení exprese genů využívaných na metabolismus ketonů (například geny pro OXCT1, BDH1), ale dochází i k poškození a dysfunkci mitochondrie. Naopak dochází ke zvýšení produkce enzymů, které se vyskytují v cytoplazmatické části glykolytického metabolismu (například HK2, PKM2) [37]. To by vysvětlovalo příčinu Warburgova efektu, jelikož poškození mitochondrie a snížení hladiny ketolytických enzymů bude vést ke snížené schopnosti ketolátky dále zpracovávat. I přesto, že se jedná o rys charakteristický pro téměř všechny nádorové buňky, můžeme najít případy, kdy bude nádor na přísunu glukózy méně závislý [38], [39].

Warburgův fenotyp (také glykolytický fenotyp) se vyskytuje u podstatné části nádorů napříč celým tělem. Jedná se o fenotyp výrazně závislý na glykolýze – ať už aerobní či anaerobní. Kvůli obrovské heterogenitě nádorových buněk je ale nutné věnovat se i „ne-Warburgovskému“ oxidativnímu fenotypu (někdy také označován jako ketolytický). Zatímco glykolytický fenotyp využívá pouze glykolýzu, ketolytický produkuje ATP oxidativní fosforylací [37], [40], [41]. Tyto dva fenotypy nejsou jediné dvě možnosti metabolismu nádorových buněk, jedná se spíše o dva extrémy na metabolické škále.

Heterogenita fenotypů je způsobena tím, že každý nádor má odlišný profil exprese ketolytických a glykolytických enzymů, podle kterých dochází k preferenci jednoho či druhého energetického zdroje. Studie věnující se odlišnostem mezi jednotlivými profily dokazují, že účinnost ketodiety bude výrazně ovlivněna mírou exprese enzymů metabolismu ketolátek. Pokud bude pouze nízká exprese ketolytických enzymů, ketodieta by měla být účinnější než u nádorů s vyšší expresí. Základní otázkou, kterou je nutné si položit před nasazením ketodiety, je, do jaké míry bude daný nádor omezením přísunu glukózy ovlivněn. Předběžným rozlišením ketolytických a glykolytických markerů buněk by bylo možné rozpoznat případy, kdy by nasazení ketodiety bylo účinnější v potlačení tumoru, a kdy by účinnost byla minimální. U pacientů s vyšší expresí ketolytických enzymů totiž nebude docházet k tak extrémní inhibici proliferace a k apoptóze [37], [40], [42].

Vysokou fenotypovou heterogenitu je možné sledovat i v rámci jediného nádoru. U glioblastomu je proliferace zprostředkována buňkami připomínající kmenové buňky zdravé tkáně – glioblastoma stem cells (GSC). Tyto buňky jsou (mimo jiné) charakteristické svou zvýšenou regenerací, přítomností markerů typických pro kmenové buňky a možností diferenciací do různých buněčných linií. Jsou jednou z možných příčin rezistence vůči léčivům a opakovanému výskytu nádorů. Zneškodněním těchto buněk by došlo k značnému zamezení excesivního růstu. GSC jsou velmi variabilní a mohou se vyskytovat jak v hypoxických, tak v perivaskulárních, kyslíkem zásobených, částech [40]. Kmenové buňky mohou dát za stejných podmínek vznik různým metabolickým fenotypům, což znemožňuje jedinou, všeobecně účinnou terapii. Při zkoumání Warburgova efektu na GSC bylo několik buněčných kultur umístěno do

médií s nízkým přísunem cukru. Došlo k inhibici proliferace a zvýšení apoptózy [43]. Některé studie zmiňovaly možné využití „metabolic priming“, které by vedlo ke zvýšení citlivosti těchto buněk k léčbě. Tento „priming“ by zahrnoval poskytnutí metabolických modulátorů, které by inhibovaly některé metabolické dráhy [40].

Jak už bylo poznamenáno v oddílu *1.2 vaskularizace nádoru*, cévní prokrvení tumoru nemusí být vždy dostačující, a je pravděpodobné, že alespoň část buněk nebude mít dostatečný přístup ke kyslíku. Vzniklé hypoxické podmínky se pak negativně projeví na energetickém výtěžku glykolýzy. Kyslík hraje důležitou roli finálního akceptoru na elektron-transportním řetězci, kde se (za vzniku gradientu využívaného na syntézu ATP) oxidují redukované koenzymy. Při porovnání drah glykolýzy v závislosti na kyslíku se ukázalo, že ačkoli anaerobní glykolýza probíhá rychleji než aerobní, dochází pouze k částečnému zisku energetického výtěžku, než který by buňka získala za přítomnosti kyslíku. Ztráty probíhají i v důsledku omezení funkce citrátového cyklu a snížení, již zmíněné, oxidativní fosforylace [36], [41]. I při nepřítomnosti kyslíku je nutno redukované koenzymy oxidovat, k čemuž dochází tak, že hlavní produkt glykolýzy (pyruvát) je měněn na laktát. V nádorových buňkách byla pozorována 2-20x větší koncentrace laktátu než v buňkách zdravé tkáně [41]. Zvyšování koncentrace laktátu vede k vylučování laktátu s H^+ do extracelulárního prostoru. Přenášením dochází ke snižování pH prostředí na extracelulární straně membrány, jak se ukazuje mírně acidické mikroprostředí (v rozhraní pH 6,5 – 6,9) [44] kolem sebe vytváří většina pevných nádorů. Jedná se o tak charakteristický jev, že je ho využíváno k specifickému zacílení dopravy protinádorových léčiv do oblastí s nižším pH. Problémy s aciditou však výrazně převyšují usnadnění zaměření léčby. Dochází zde ke vzniku bariéry, která protonuje a zachytí léčiva založená na látkách slabých bází. Dále podporuje genetické změny v buňce, což vede ke zvýšení rezistence vůči léčivům, zlepšení schopnosti vytvářet metastáze. Ve výsledku tedy dochází k navýšení invazivního potenciálu nádoru [44]. Omezení glukózy by mohlo hrát i velkou roli v usměrnění mikroprostředí nádoru a snížení invazivní schopnosti.

2.3. mechanismus ketogenní diety

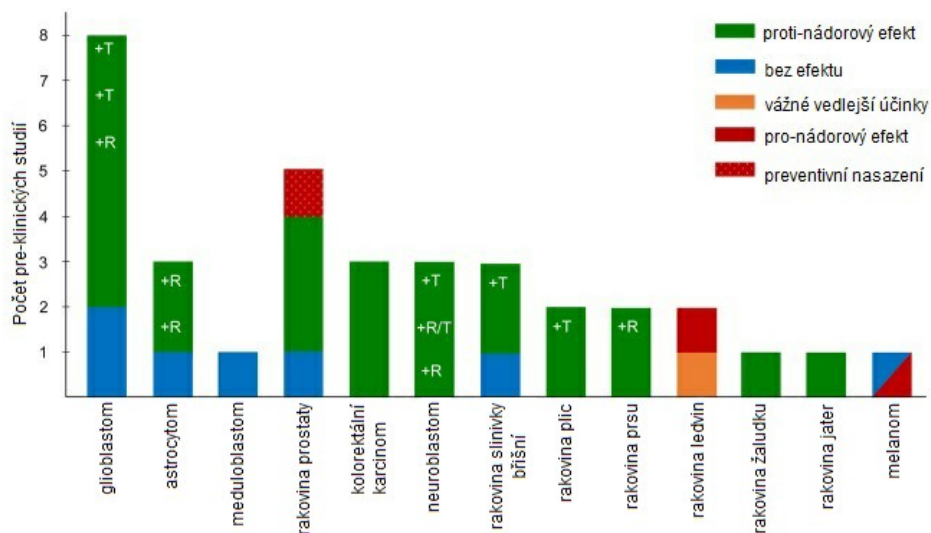
Hlavním mechanismem ketodiety je omezení energetických zdrojů nádorových buněk. Do těla je dodáváno mnohem menší procento sacharidů – nedostatek energie na růst a proliferaci bude negativně působit na nádorovou tkáň. Snížení příjmu glukózy však neohrozí zdravé tkáně, jelikož ty využijí alternativní dráhu pro získání energie a zpracují ketolátky pomocí oxidativní fosforylace. Ketolátky při této dietě tvoří velkou část potravy a pokud není buňka schopná je dále štěpit, mohou se koncentrovat až do toxických hodnot. Toto však není jediná kaskáda jevů, které ketodieta spouští, existují i další procesy – změny v transkripci, funkci mitochondrie a koncentraci kyslíkových radikálů (ROS). Časté je, že nádorové buňky trpí dysfunkcí mitochondrie, ale při ketodietě dochází k podpoře její funkce. ROS, v buňkách nádoru vyskytující se často ve zvýšených koncentracích [45], se podílí na mnoha buněčných kaskádách – mimo jiné poškozují genetickou informaci a některé buněčné komponenty. Vysoký oxidativní stres se tedy negativně projevuje na stavu buňky – vede k snížení proliferace, a dokonce

k indukci apoptózy [43]. Otázka, jak ketodieta působí na tyto radikály, se zdá poměrně rozporuplná, jelikož jsou hladiny ROS ovlivněné mnoha faktory. Na jednu stranu nádorové buňky odstavením elektron-transportního řetězce omezí vznik radikálů, při koncentraci laktátu ale dochází k nárůstu, a příbytku ROS napomáhá i časté poškození mitochondrie. Podle některých článků ketolátky snižují hladiny ROS [46] a předchází dalším mutacím, jiné však tvrdí opak. Nastartování (alespoň částečné) oxidativní fosforylace prý naopak způsobuje nárůsty hodnot ROS [47]. Změny v buněčné transkripci se projeví především na změně exprese enzymů a proteinů [45], [46].

Dochází k redukci exprese hypoxií-indukovaných faktorů (karboanhydráza 9, HIF-1) a snížení aktivace NK-κB. Většina těchto drah bývá indukována přes ROS. Mimo to ketodieta výrazně snižuje expresi VEGFR2, matrix metalloproteinázy-2 a vimetinu [45]. Jelikož se jedná o komponenty zapojené do angiogeneze, utlumení jejich produkce vede k omezení tvorby nových krevních cest tumoru a k potlačení další proliferace [48].

2.4. účinnost – výhody i nevýhody

Jak už bylo naznačeno, ketodieta nebude na všechny nádory reagovat se stejnou účinností. Obecně byla u nádorů mozku, hlavy, krku a plic prokázána vysoká závislost na přísunu glukózy [41] a glioblastom má z nich dokonce jedny z nejlepších výsledků (viz *Graf 1*) [49]. Jedná se dokonce o jeden z mála typů, u kterých byl pozitivní vliv ketodiety potvrzen dostatečným množstvím studií. Je ale nutno připomenout, že glioblastom je velmi heterogenní a účinnost ketodiety se bude u pacientů lišit (i pokud opomineme faktor věku a pohlaví) kvůli odlišným expresím metabolických enzymů [37].



Graf 1 - preklinické důkazy indikující efekt ketogenní diety na růst a progresi nádoru [49, přeloženo]

Ketodieta je neinvazivní, poměrně jednoduchá metoda, která má potenciál výrazně oslabit nádor. Při vyčtení pozitiv je ale nutné poznamenat, že dieta sama o sobě není považována za dostačující pro kompletní vyléčení. Využívá se jako přídatná léčba paralelně probíhající po dobu radioterapie [50], chemoterapie [36], a do budoucna by další studie mohly potvrdit i její efekt v kombinaci s antiangienními léčivy [51]. Využití ketodiety nemusí probíhat po celou dobu terapií, může být využit

pouze krátkodobý půst před chemoterapií – díky odlišné rezistenci tkání proti stresu, které hladovění způsobí, dochází ke zvýšení náchylnosti nádoru vůči chemoterapeutickým cytostatikům. Mimo oslabení nádorové tkáně působí ketodieta na zdravé buňky – její neuroprotektivní účinky zajišťují částečnou ochranou buněk nervového systému před vedlejšími účinky radioterapie a chemoterapie [31], [36].

Byl také prokázán pozitivní efekt ketodiety na imunitní systém, který by také mohl sloužit jako aditivní výhoda při kombinaci metod léčby. Jedná se o komplexní interakce, zdá se, že dochází k snížení exprese imunitních inhibitorů a zvýšení počtů CD4+ T buněk. Zlepšuje v mikroprostředí tumoru imunitní nádorovou odpověď díky tomu, že převrátí její stav z imuno-suprimované do aktivní cytotoxické [52].

Pacienti při léčbě rakovin většinou prochází nepříjemnými negativními vedlejšími účinky. Mezi generické patří nevolnost, zvracení, problémy se zažívacím traktem [53]. Bohužel vedlejší účinky specifické pro ketodietu ještě nebyly plně vyzkoumány – i přesto, že mnoho studií našlo drobné podobnosti, jen málo z nich má průkazné výsledky.

Jedním z největších problémů ketodiety by mohla být diabetická ketoacidóza u pacientů s diabetem typu 1. Jedná se o nebezpečný stav, který často končí hospitalizací až smrtí pacienta [54]. Dochází ke zvýšení hladiny ketolátek v krvi ve snaze nahradit glukózu, která je v nedostatku [55]. Snižování krevního pH má negativní působení na stěny cév, které mohou být poškozovány – v extrémních případech dochází ke krvácení do mozku nebo třeba k trombóze [54]. I když by se tento vedlejší účinek mohl zdát poměrně specifický pro úzkou skupinu lidí, podle ADA v roce 2018 trpělo v USA diabetem typu 1 téměř 1,6 milionu lidí [56]. Je třeba tuto možnou komplikaci, obzvláště vzhledem k závažným následkům, brát v potaz.

I pacienti bez diabetu mohou mít problémy spojené se sníženým pH, jelikož k zvýšením acidity může docházet i v moči, čímž je podporován vznik ledvinových kamenů [57].

Dalším z dosud zkoumaných potenciálních účinků je způsobení kardiovaskulárních rizik. Ketodieta má na stěny cév poměrně rozporuplné účinky. Při nízkých hladinách ketolátek dochází k pozitivnímu efektu – dochází k snížení systolického i diastolického tlaku, nárůstu HDL (především u žen) a obraně endotelu před buněčnou senescencí. Zvýšené hladiny ale mají naopak účinky negativní a mohou endotel vážně poškozovat [55], [58], [59]. Jedna ze studií, která provedla zkoumání na pacientech po 10 letech, však tvrdí, že stoupání hladiny cholesterolu je pouze krátkodobý trend, který brzy vymizí, a proto z dlouhodobého hlediska ketodieta problémy nepůsobí [60]. K nezávadnosti se přiklání i několik dalších studií [61], některé články dokonce tvrdí, že ketodieta dopomáhá k normalizaci cév [30]. Můžeme ale najít články, které mají na bezpečnost ketodiety v rámci kardiovaskulárních onemocnění opačný názor [62]. Bude třeba ještě podrobněji prozkoumat roli dietární restrikce, a to obzvláště v dlouhodobém kontextu.

Další nejednoznačné působení má ketodieta na zánětlivé faktory. Některé studie tvrdí, že zánětlivost působením zvyšuje, jiné, že snižuje. Nejspíš se opět bude jednat o efekt závislý na koncentraci ketonů [55]. Bylo také prokázáno, že jedna z ketolátek (BHB) působí jako inhibitor histondeacetylázy. Při ketodietě by tedy mohlo docházet k epigenetickým změnám – specificky hyperacetylaci [55]. Tento jev však taky není zcela prozkoumán.

Starší články poukazují také na přispění ketodiety k propuknutí akutní pankreatitidy [63], [64] a stále nebylo plně vyřešeno, zda zvýšení ketolátek nezpůsobuje vyšší nápor na ledviny a játra.

Většina studií, které zkoumají efekt ketodiety na nervový systém, se zaměřuje na projevy působení při léčbě epilepsie. Tyto poznatky mohou částečně korelovat i s účinky při terapii rakoviny, je ale třeba výsledky brát s rezervou. Mezi mechanismy ochrany nervů patří protizánětlivé účinky, potlačení oxidativního stresu, zabránění neurální apoptózy a regulace aminokyselin (například redukce glutamátu) [31].

Jeden z článků také upozorňuje na oslabení kosterních svalů myši při delším užívání ketodiety [65], i tento problém však bude potřeba prostudovat i u lidských pacientů.

2.5. problémy, kterým čelí další výzkumy

I když se ketodieta stala před několika lety poměrně populární metodou pro terapii mnoha rozličných indispozic, je třeba podrobněji zpracovat její vedlejší účinky a postupně dietu optimalizovat. Trvání účinků je prozatím nejasné, i když bylo vypracováno několik studií s lidskými pacienty, glioblastom je zákeřný a doba dožití pacientů není příliš dlouhá. Rekurenci po vysazení diety nelze plně vyloučit [30].

Další problémy, kterým ketodieta přes nasazením do praktického využití čelí, jsou spíše v rukou pacientů. Dietu bude třeba striktně dodržovat, jinak by nemusela mít dostatečný efekt. Otázku složitosti výpočtů nutriční příjmů je také třeba brát v potaz – pacienti jistě budou muset být poučeni dietologem. Při nedostatku příjmu živin hrozí malnutrice, která negativně ovlivní kvalitu života pacienta [30]. Ukazuje se, že vzhledem k výše vypsáným důvodům bude ideální podpora ze strany přátel nebo rodiny [66].

3. Fototermální terapie

3.1. mechanismus

S postupným nástupem nových technologií onkologie zaznamenala nové metody zaměřené na léčby nádorů. Jednou z nich je i fototermální terapie (dále uváděno jako PTT). Při PTT dochází k využití emitovaných fotonů k zahřátí buňky či tkáně. Hypertermie, několikaminutové zahřátí tkáně alespoň na 41-47 °C, vede k narušení okolních membrán či buněčného cytoskeletu a k denaturaci proteinů [67].

Ačkoli je možno využít pouze laser k „vypálení“ části tkáně, tento způsob by byl velmi neselektivní a proto je PTT spojená s využitím částic, které zlepšují efektivitu této metody. Při využití fotonů dochází i k excitaci buněčných chromoforů (látek zodpovědných za absorpci světla), u přirozených látek však dochází k velmi nízké absorpci. Obarvení některých molekul by mohlo napomáhat zvýšení absorpce, docházelo by ale k procesu vysvícení („photobleaching“), kdy by barva postupně vybledla. V této kapitole se budu věnovat využití nanočástic, jelikož se prozatím jedná o nejpoužívanější a nejefektivnější agenty, které pohlcují fotony [67]. Jejich zvýšená absorpce je podmíněna jevem označovaným jako „surface plasmon resonance“, kdy při excitaci dochází ke kolektivní oscilaci volných elektronů kovových částic. Tato hromadná oscilace na povrchu částice se označuje jako plasmon. Při překročení určité hladiny excitační energie jsou nanočástice schopné pohlcenou energii velmi intenzivně vyzářit zpět (což napomáhá i při využití nanočástic v mikroskopii) [68]. Tvorba těchto oscilací je podmíněná specifickou frekvencí, která se liší u jednotlivých nanočástic [67].

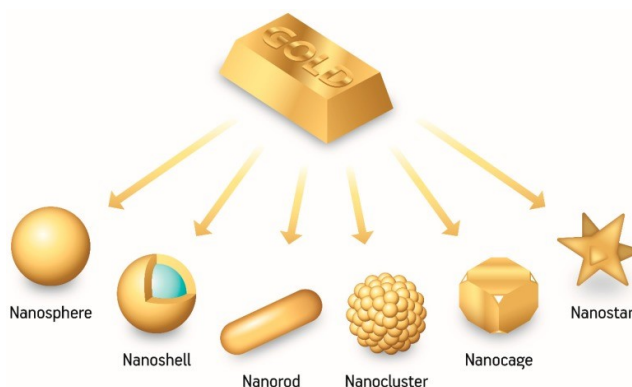
Při aktivaci PTT nanočástice absorbují emitované fotony a dochází k excitaci jejich volných elektronů. Následně se však elektrony vrátí na původní hladinu a tento přechod na nižší energetickou hladinu je spojen s produkcí tepla do okolí. Způsobená hypertermie vede k vážnému poškození až ke smrti nádorové buňky [67].

Lze rozlišovat dva hlavní typy buněčné smrti – apoptózu a nekrózu. Pro klinické účely spojené s PTT je mnohem výhodnější spustit apoptózu, jelikož je mnohem bezpečnější – na rozdíl od nekrózy nedochází k ohrožení okolní zdravé tkáně. Při neoptimálních podmínkách (například při příliš vysoké teplotě nad 50 °C) [69] dochází ke spuštění nekrózy, která vede k zánětlivým reakcím [69], [70] a možnému zvýšení pravděpodobnosti nových metastáz [69]. Dle některých studií jsou nádorové buňky k poškození světlem náchylnější než zdravé buňky kvůli horšímu krevnímu zásobení [67], přesto k poškození zdravé tkáně může dojít, a proto je snaha optimalizovat všechny složky této metody pro efektivnější léčbu.

3.2. zlaté nanočástice – charakteristika i využití

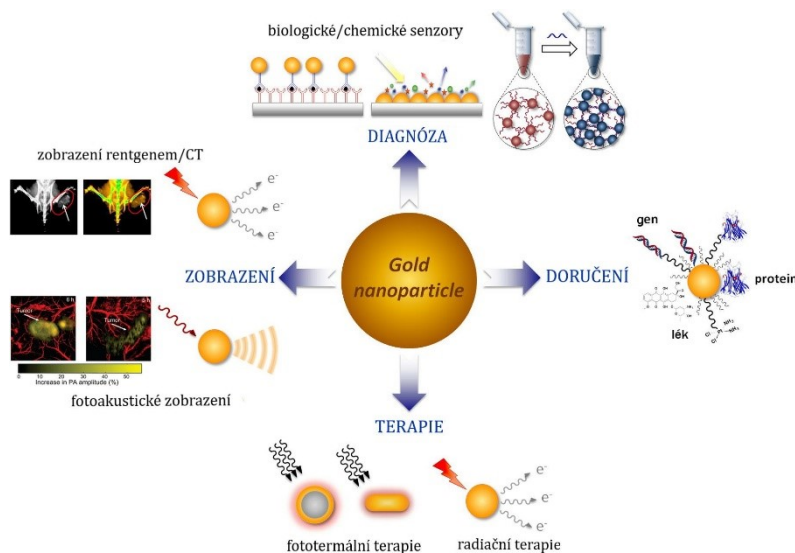
„Gold nanoparticles“ jsou mikroskopické částice ze zlata mezi 2-160 nm, které se v posledních několika letech staly důležitou součástí vědeckých výzkumů nejen v oblasti nádorové terapie. Využití nalézají i částice z jiných materiálů (například i v metodě popsané v následující kapitole *4 Feroptóza*),

zlato se ale stalo jedním z nejpoužívanějších díky své chemické inertnosti. Mezi společné charakteristiky patří relativně velký poměr plochy k objemu částice, vysoká reaktivita a silné interakce s biologickou hmotou [71]. Avšak rozličné typy částic jsou specifické vlastní kombinací vlastností – ať už velikostí, tvarem, nábojem nebo modifikací povrchu částice, různou permeabilitou skrz tkáň, dobou optimální akumulace, ideální vlnovou délkou spouštějící excitaci... Při plánování pokusů je proto velmi důležité brát v potaz typ používané částice. Mezi nejvíce využívané typy patří gold nanoshells a gold nanorods. Existuje ale mnohem více druhů (viz *Obr.*) [72].



Obr. 2 – Reprezentativní schéma nejčastějších sestav a morfologií zlatých nanočástic [72]

Využití zlatých nanočástic je rozmanité (viz *Obr.*) [73] a v mnoha případech se dá využít několik možností najednou. Mohou být využity v diagnostice či pro zlepšení kontrastu snímků některých zobrazovacích metod díky tomu, že mají odlišnou absorpci záření než okolní tkáň [74], [75]. Velmi důležitým využitím je také doprava – na povrch částic jdou navázat různé látky, od poměrně malých protilátek po celé geny. Toho je využíváno při doručování léčiv k nádoru [4], [75], [76].



Obr. 3 - Biomedicínské aplikace zlatých nanočástic [73, přeloženo]

Mimo svou smrtící funkci hypertermie může vést k uvolnění antigenů nádorových buněk, které budou aktivovat součásti imunitního systému [77], [78]. Může tedy vést k uvolnění imunosuprese působené mikroprostředím nádoru [77]. Při použití nanočástic také může dojít ke zvýšení citlivosti

k radioterapii – po absorpci ionizačního záření v buňce dochází k nárůstu ROS, což přispěje k poškození nádorových buněk [4].

Další výhodnou vlastností zlatých částic je také nízká toxicita v těle [79], ale i tak je třeba, aby při terapii docházelo k co nejmenší akumulaci částic mimo cílovou tkáň nádoru. Články zaznamenaly, že nejvíce jsou nežádoucí akumulací zasaženy játra a slezina [80], [81], při orálním podání také docházelo k vysoké akumulaci v ledvinách [71].

I přesto, že se zlaté částice považují za velmi bezpečné (s mírnými až žádnými následky) [72], [74], [79], [82], jejich toxicita byla zatím probádána především z hlediska krátkodobého kontextu (nejdelší doba studia cytotoxicity, kterou jsem při procházení článků pro tuto práci našla, byla 400 dní). Vzhledem ke snaze dopřát pacientům co nejdelší a nejkvalitnější život po terapii bude třeba hrozbu dlouhodobé toxicity blíže prozkoumat. Je patrné, že cytotoxicita závisí na velikosti, tvaru a náboji částice. Vyšší toxicitu by bylo možné pozorovat u koloidních částic (přes indukci oxidativního stresu), nebo u částic s jistými modifikacemi (například využití pentapeptidu na pokrytí povrchu). U druhého příkladu byla pozorována dokonce slabá anémie a atrofie sleziny [71].

3.3. modifikace nanočástic

Pro optimální podmínky léčby je třeba modifikovat částice z mnoha hledisek, mezi hlavní z nich patří doprava, akumulace, toxicita částic a jejich účinnost konverze energie fotonů.

První a jednou z nejdůležitějších vlastností, které je třeba se věnovat, je velikost. Rozměry částic se projevují v několika faktorech – distribuci po těle, akumulaci v tkáni, endocytóze do nádorových buněk i toxicitě. Ukazuje se, že menší částice se rychle distribuují do celého těla, zatímco větší částice se drží v krevním oběhu [4], [83]. Delší zdržení v cévách může být výhodné pro zvýšení terapeutického účinku některých léčiv [4]. Ale velké rozměry znemožňují snadnou filtraci a vyloučení částic z těla, při dlouhodobé akumulaci tedy mohou potenciálně vést k toxicitě [76]. Na rozdíl od větších jsou malé částice (pod 5-6 nm) rychle odfiltrovány a vyloučeny z těla, proto nehrozí zvýšená akumulace v orgánech [4]. Považují se tak za bezpečnější než stejné typy částic větších rozměrů [83]. V tomto bodě půjde nejspíš o trade-off – zatímco jsou menší částice lépe dopraveny na místo, větší částice se v nádoru lépe akumulují. Porovnání toxicity v závislosti na velikosti je složité, jelikož studie nepracují s částicemi stejného tvaru a stejnými modifikacemi povrchu. Jedna ze studií, která využívala neopláštěné nanočástice mezi 8-37 nm, pozorovala významnou toxicitu u myši [82]. Další poukázala na problém s 50nm spheres kvůli zvýšeným hladinám ROS [83]. Dále velikost ovlivňuje internalizaci částic – ta probíhá v 90 % případů aktivně přes endocytickou dráhu a zbytek je do buňky dopraven pasivní difúzí či pomocí adheze [84]. Vzhledem ke způsobu uptake významně závisí na velikosti a vlastnostech povrchu částic. Větší částice vyžadují větší sílu potřebnou pro internalizaci, proto je s nárůstem velikosti v pokusech pozorováno snižování hodnoty uptake. Při rozměrech nad 150 nm jsou částice většinou z procesu endocytózy vyloučeny [84]. Zmenšování částic však nemusí nutně vést ke zlepšení

internalizace – v jedné studii se při porovnání 10, 25 a 50nm částic ukázalo, že nejméně výhodnější bylo využití nejméně výhodnější částic 50nm [83].

Tvar částic se podílí na akumulaci, distribuci v tkáních a na efektivitě absorpce energie. Je snaha modifikovat částice tak, aby co nejméně výhodněji konvertovaly přijímané fotony na teplo, jelikož při vysoké účinnosti konverze dochází ke snížení potřebné energie světelného paprsku, a tedy i ke snížení případného poškození zdravé tkáně [67]. Ke zlepšení účinnosti částic je potřeba vylepšit jejich absorpci, která primárně závisí na velikosti povrchu využívané nanočástice. Vyšší absorpce lze dosáhnout modifikací dvou kritérií – velikosti a tvaru částice. Zvětšování částic, jak už bylo popsáno, je problematické kvůli zvýšenému riziku toxicity, proto by výhodnější mohla být úprava tvaru. Přidáním výběžků se zvětšuje povrch částice a dochází tak ke zvýšení absorpce [85]. Při syntéze nanočástic je možno vyladit maximum absorpce – u spheres k tomu dochází změnou poměru vnějšího pláště ku tloušťce jádra, u rods pak závisí na poměru délky částice k tloušťce [86].

Pro lepší lokalizaci, distribuci a biokompatibilitu dochází k úpravě povrchu částic za využití peptidů, ligandů či dalších chemických skupin [83]. Jednou z nejběžnějších úprav je přidání polyethylenglykolových řetězců (PEG) [69], [74], [80], [87] ale v některých studiích dochází i k využití jiných látek (například rifampicinu [88]). Tyto modifikace zabraňují nežádoucím interakcím a filtraci částic. Obzvláště částice s PEG se osvědčily díky omezení nespecifických interakcí (a to i s imunitním systémem), delší dobou cirkulace, zlepšené permeabilitě a snížené cytotoxicitě [83]. Ke stabilizaci tvaru se využívá přidání citronanu sodného nebo cetrimoniumbromidu (i když se v některých případech prokázala mírná toxicita této látky) [83]. Velkou roli hraje i náboj povrchu (respektive náboj navázaných látek). Částice s pozitivním nábojem mohou interagovat s negativně nabitými membránami a způsobovat jejich poškození až smrt buňky. Vzhledem k častému využití krevních cest je ohrožen hlavně endotel cév a dochází ke zvýšené akumulaci v ledvinách. Částice s negativním nábojem se naproti tomu více akumulují v játrech a slezině [83]. Přidání specifických protilátek by také mělo umožnit přesnější akumulaci [19]. Tato metoda pomáhá k částečnému nárůstu akumulace částic u rakoviny prsu (při využití anti-HER2) [80], glioblastoma je však poměrně heterogenní, což znesnadňuje nalezení jediného markeru, který by bylo možné využít na všechny nádorové buňky. Jedním z nadějných je receptor EGF (EGFR), který se u glioblastomu vyskytuje v cca 60 % případů [89], k nadměrné expresi však dochází spíše u glioblastomu primárního než sekundárního typu [90]. U EGFR v glioblastomu dochází často k mutační delecí exonu 2-7 a formaci glycinového zbytku na spoji exonů 1 a 8 – vzniká mutantní varianta se zkratkou EGFRvIII [91]. Jedná se o nejčastější variantu vyskytující se u lidských nádorů. V případě glioblastomu byla exprese prokázána u 30 % diagnostikovaných případů [91] a značí sníženou pravděpodobnost dlouhodobého přežití [92]. Mutantní EGFRvIII je častá i v GSC [92]. Jinak obecně pro zaměření mozku může dojít k využití nervově-specifických peptidů či ligandů [19]. Při využití protilátek je ale třeba počítat s tím, že většina z nich je nestabilní a může způsobovat vyvolání imunitní odpovědi [19].

Jelikož při agregaci částic dochází k lepší absorpci energie [85], [93], je možno využít těchto interakcí ke zvýšení akumulace částic. Z tohoto důvodu lze použít nanočástice reagující na snížené pH, které v acidickém prostředí nádoru reverzibilně agregují díky změnám v elektrostatických interakcích. Agregace způsobí vyšší fototermální účinnost v okolí nádoru, ale nedochází k ní ve zdravé tkáni, takže částice nevyvolají zvýšenou toxicitu v orgánech [85].

Bohužel, problematika nanočástic je velmi složitá a prozatím není jasné, které částice budou nejideálnější pro klinické využití. Ve studiích se prozatím nejlépe jeví zlaté spheres – jsou pro PTT vhodnější než nanorods díky rychlejší internalizaci a lepší biokompatibilitě [83]. Pro budoucí využití v praktické medicíně však bude nutné detailněji prozkoumat, jaký typ nanočástic bude pro danou terapii ideální. A nepůjde pouze o typ, ale i o vyhovující povrchové modifikace, které zajistí permeabilitu tkání a hromadění v nádoru.

3.4. doručení na místo určení

Před samotnou excitací je nutné částice dostat k požadovanému místu nádoru. V člancích se nejvíce využívá injekční podání. To může být děleno na intravenózní, intraarteriální, intraperitoneální (vpich do pobřišnice), subkutánní (vpich do podkoží) či přímo intratumorální [83], [94], [95]. Využití injekce je sice nejpopulárnější metodou, v současné době vědci pracují na novějších, sofistikovanějších metodách, které budou z hlediska dopravy výhodnější. Například podání terapeutik skrz epitel čichových buněk přímo do mozku by mohlo obejít problém s prostupností hematoencefalitické bariéry [96] a existují i počáteční výzkumy pro podání částic ve formě aerosolu [97]. V některých studiích se také používá orální podání, nejedná se však o podání, které by se často vyskytovalo u studií s lidskými pacienty.

Způsob podání se odráží i na výsledcích terapie – může ovlivnit akumulaci částic a distribuci do zbytku těla. Potenciálně výhodné pro PTT by mohlo být intratumorální podání díky možnosti efektivně dodat vysokou koncentraci do místa nádoru. Například při vstříknutí částic intravenózně dochází k pasivnímu prostoupení tělem [69], což se velmi pravděpodobně odrazí na lokalizaci a akumulaci částic. Jeden z článků také potvrzuje bezpečnost aplikace přímo intratumorálně – problémům s natékáním mozku a zvýšením intrakraniálního tlaku se dá zabránit pomalou aplikací [95].

Částice při průchodu k tumoru musí zdolat několik překážek – nejkomplikovanější z nich je BBB, která velmi striktně reguluje transportované molekuly a působí problémy s průchodem částic [4], [12], [19]. Mimo využití modifikací, které usnadní průchod nanočástic tělem, by bylo možné transport usnadnit pomocí vektorů, například mezenchymálních kmenových buněk [98] nebo makrofágů [19], [86], [99]. Obzvláště schopným prostředkem se zdají být makrofágové díky tomu, že u nich k přechodu BBB dochází přirozeně, a navíc jsou přitahovány k místům zánětů či nádorů. Také nespustí přídatnou imunitní odpověď ani nepůsobí toxicky na své okolí. Navíc díky schopnosti fagocytovat snadno pojmu nanočástice (i zde však závisí na velikosti, tvaru i povrchu) [19], [86]. Dalším používaným vehiklem

jsou exosomy, jejich výhody spočívají v efektivní fúzi s cílovou buňkou, přímém doručení do cytoplazmy. Také jsou, stejně jako makrofágové, považovány za bezpečné transportéry [19].

Při transportu nádorem na nanočástice působí velký tlak okolní tkáně, který znesnadňuje pohyb krevním řečištěm dané oblasti [77], [81]. Účinnost průniku částic tkáněmi je ovlivněna jejich velikostí, tvarem a nábojem na povrchu [79], [83]. Tyto vlastnosti výrazně ovlivňují množství částic, které se budou v tumoru akumulovat. Zároveň je v nádoru usnadněná akumulace vzhledem k zvýšené permeabilitě a retenčnímu efektu [100]. Při léčbě je však nutno vypočítat optimální počet částic pro rovnoměrnou distribuci tepla – v ideálním případě také dojde k homogennímu rozprostření částic po celém objemu nádoru [93].

Pro ideální podmínky je potřebná nejen dostatečná akumulace částic, ale i jejich homogenní rozprostření. Bylo prokázáno, že se nanočástice kvůli lepšímu krevnímu zásobení častěji hromadí na periferiích, zatímco do centra nádoru se dostávají pomalu. Byla provedena studie s makrofágy, ale ani jejich využití nepřineslo signifikantní zlepšení distribuce [80]. A stále zůstává otevřená problematika dopravy nanočástic k invazivním buňkám, které způsobují sekundární léze.

3.5. excitace, spuštění terapie

K excitaci elektronů se přednostně využívá laserové záření, a to hlavně NIR, světlo blížící se hodnotám infračerveného záření (v člancích využívané rozmezí je 650-900 nm) [69], [75], [80]. Lze ale také excitovat pomocí UV záření (365 nm) [81]. Alternativy využití laserového záření jsou RF (využití rádiových vln) [100]–[102] a MFA (využití magnetického pole) [103]. Oba tyto způsoby se vyznačují lepší penetrací do tkáně [80], [100], ale zatím se ve studiích nejvíce objevuje využití NIR.

Výhodou NIR laserů je, že buněčné chromofory v tomto rozmezí vlnové délky nemají příliš velkou absorpci a jsou tedy poškozovány méně než v případech využití světla viditelného spektra [80]. Další z benefitů využití NIR také spočívá v dobré penetraci tkání, jelikož se vyskytuje mezi oblastmi vlnových délek s vysokou absorpcí pro vodu a pro hemoglobin [104].

Z UV světla se pro lékařské účinky využívá především část UVA, které by sice za podmínek léčby nemělo být problematické [81], ale pro bezpečnou terapii je nutné se potenciálním rizikům více věnovat.

Využití obou záření je limitováno prostupností světla skrz tkáň. Permeabilita závisí především na síle laseru. Při použití velmi silného a nepřerušovaného záření dochází k přehřívání a poškození tkáně, proto se více osvědčilo využití pulsních laserů, které vysílají do tkáně přerušované paprsky. Pauza mezi jednotlivými paprsky laserového záření zabrání přehřívání a poškození tkání i při vysoké intenzitě [93]. Při použití NIR byla v laboratorních podmínkách maximální prostupná hloubka tkání 3-5 cm [100]. Dosažení hlouběji položených nádorů by potenciálně šlo při zvýšení energie laseru nebo delší dobou vystavení tkáně paprsku [103], v obou případech by však velmi pravděpodobně došlo k vážnému

poškození zdravé tkáně. Omezení hloubky penetrance se dá obejít voperováním optických sond [80], ale v tom případě se potýkáme s dalšími zásahy do mozku, které mohou negativně ovlivnit post-terapeutický život pacienta.

Výhodou laserů je poměrně přesné zaměření a mělo by tedy (i při vyšší akumulaci v játrech či slezině) docházet převážně k aktivaci specificky lokalizovaných částic [67], [103]. Při využití této metody však bude třeba zajistit ideální dobu, sílu a pozici laserového ozáření.

Studie zabývající se metodou RF využívají vlny o frekvenci 13,56 MHz [100]–[102]. Na rozdíl od NIR dosahuje RF hlubší penetrance díky minimální absorpci energie tkáněmi, problematika zaměření však stále zůstává. Nanočástice opět fungují jako specifické agenty, které zajistí lokalizované spuštění PTT v nádoru i při nižší energii – předchází se tím využití příliš vysoké energie, která by poškodila i okolní zdravou tkáň [80]. Jinak je považována za bezpečnou, a proto je skvělým kandidátem pro využití v terapiích [100]. Míra absorpce částic při využití RF je hodně závislá na modifikacích povrchu. Při zkoumání internalizace částic s navázanými protilátkami byly sledovány až do endo-lysozomů, které mají přirozeně nízké vnitřní pH. Toto acidické prostředí způsobilo agregaci částic, což snížilo efektivitu léčby, jelikož PTT využila především částic neagregovaných. Agregací došlo k poškození povrchových protilátek, což výrazně poškodilo i schopnost absorpce energie. Tento problém je možné vyřešit modulací endo-lysozomálního pH – při zabránění intracelulární agregace částic docházelo k lepší absorpci částice. Vzhledem k tomu, že neagregované částice absorbovaly lépe energii, docházelo i k vylepšení toxických účinků na nádorovou buňku [100].

Při MFA je nutné využít magnetické částice. Jelikož zlato přirozeně magnetické není, jsou vytvářeny hybridní částice, které by touto metodou využít šlo [80]. Prozatím se (z hlediska využití zlatých částic) jedná o raritu, několik klinických studií s MFA však proběhlo. Při pokusu s částicemi z železa a využití MFA docházelo k dobré toleranci pacienty bez významných vedlejších účinků. Pacienti pouze popisovali „příjemný pocit tepla v hlavě“, nejhůře to snášel pacient s kardiovaskulární chorobou, u kterého došlo k dočasnému zvýšení tlaku a zrychlení pulsu [95]. Dobrá tolerance této metody byla sledována do cca 13,5 kA/m, k vylepšení efektivity magnetického pole by ale opět mohlo dojít pomocí zvýšení síly MFA [95].

Je třeba bližší zkoumání, které by porovnálo metody excitace a určilo, která z nich bude nejvýhodnější – z hlediska efektivity i minimálního poškození okolní tkáně.

4. Ferroptóza

4.1. ferroptóza – definice, mechanismus a patologie

Ferroptóza je regulovaná oxidativní buněčná smrt ne-apoptického typu, která je závislá na železu, respektive vnitrobuněčné koncentraci železných iontů [105]–[107]. V buňce dochází k Fentonovým reakcím mezi ionty železa a peroxidem vodíku. Výsledkem těchto reakcí jsou toxické radikály, proti kterým se buňka chrání pomocí antioxidantů – je nutno uvést alespoň glutathion a glutathion-peroxidázu (GPX4) [106]. Deplecí glutathionu či při inaktivaci dalších ochranných mechanismů dojde k nárůstu koncentrace ROS v buňce a volné radikály začnou poškozovat buněčné komponenty, v tomto případě je esenciální především reakce se syntetizovanými fosfolipidy. Dochází k jejich peroxidaci a akumulaci oxidované formy, což vede k poškození membrán, ztrátě selektivní permeability a lýzi buňky [108]–[110].

K indukci tohoto typu buněčné smrti většinou nedochází přímo inhibicí enzymu GPX4, potřebného pro odstranění oxidovaných fosfolipidů [111], ale přes ferroptózu-indukující agenty [109]. Podle toho lze rozlišit dva typy ferroptózy – „single cell“ inhibicí GPX4 a „multicellular“ inhibicí produkce glutathionu nebo zvýšením intracelulární koncentrace železa. Druhý typ, „multicellular“, se také označuje jako „propagační“ díky zpozorované propagaci ferroptózy do okolních buněk, která se šíří podobně jako vlna [109], [112]. Toto šíření je mezi typy regulované buněčné smrti extrémní raritou [109]. Při zkoumání způsobu, kterým se smrtelný signál šíří, se zatím prokázala role pórů plazmatické membrány a osmotických potenciálů. V jedné studii byly do buněk umístěny velké osmoprotektanty, které nemohly z buňky unikat tak snadno jako látky kontrol. Osmoprotektant s větším průměrem (konkrétně PEG 3350 Da) zabránil úplné lýzi buněk, signál ale nezastavil, pouze zpomalil. Podrobnější informace způsobu šíření ještě nejsou zcela známy [109].

Zdá se, že ferroptóza je závislá na autofágii, proto také vznikl termín ferotino-fágie („ferotino-phagy“ v angličtině), který označuje autofágický proces probíhající právě v této souvislosti. Jedním z důkazů je spuštění ferotino-fágie při přijetí signálu k ferroptóze. Druhý, diskutabilně průkaznější, je fakt, že při inhibici autofágie dochází i k potlačení ferroptózy [111], [113].

Některé ze symptomů probíhající ferroptózy ve tkáních jsou otékání buněk a redukce krist mitochondrie [105], [109]. Typickým znakem je především již zmíněná peroxidace lipidů membrán vedoucí k poškození a k lýzi buněk [110].

Podíl ferroptózy byl sledován u některých autoimunitních a neurodegenerativních onemocněních, anebo dokonce i při vzniku rakoviny. Ukazuje se i její role v neurotoxicitě a může způsobovat i nedokrvování některých orgánů, jako je například srdce, ledviny nebo játra. Bylo zaznamenáno i akutní selhání ledvin [105], [112], [113].

4.2. metabolismus železa zdravé i nádorové tkáně

Metabolismus železa v buňce je možné rozdělit do tří částí – influx z extracelulárního prostoru, intracelulární uskladnění zásob a eflux z buňky ven [105].

Příjem je možný pomocí transferinu a jeho receptoru (TfR1), pro funkci ferroptózy jsou potřeba geny pro obě tyto komponenty.

Uvnitř buňky se většinou železo uchovává navázané na zásobní protein ferritin, není tedy schopné metabolické aktivity [105], [114]. Naopak železné ionty, které jsou v buňce volně, jsou nestabilní a metabolicky aktivní, označujeme je pojmem LIP [105], [114]. Hladina LIP může být snižována pomocí chelátorů železa [114], ale jinak podléhá především regulaci prostřednictvím regulačních genů a proteinů. Jedním z klíčových regulátorů je IREB2 (iron-regulatory protein 2). Při dostatku železa v buňce je IREB2 degradován v proteasomu, ale nízké koncentrace umožní interakce mezi IREB a responzivními elementy (IRE), které degradaci zabrání. IREB2 působí při nedostatku železa inhibuje translaci zásobního ferritinu, podporující nárůst volných iontů. Pokud je IREB2 degradován, dochází ovlivněním TfR1 i ferritinu ke zvýšení vstupu železa do buňky [115]. IREB2 se také může podílet na spuštění ferroptózy, například přes erastin [105]. Erastin je malá molekula, která inhibuje aktivitu cystein-glutamátového antiporteru. Cystein je důležitou složkou v syntéze glutathionu, pokud aminokyselina není v buňce, dochází k rychlé depleci tohoto antioxidantu [111]. Cysteinová deprivace se nepodílí pouze na vyčerpání zásob glutathionu, ale i na snížení koncentrace ferritinu přes ferotino-fágový proces. Nedostatek cysteinu aktivuje přenos a degradaci ferritinu v lysozomu přes ferritinový kargo receptor NCOA4 [111], [113]. Při degradaci ferritinu dochází k uvolnění navázaného železa a ke zvyšování hladiny volného, nestabilního železa (LIP). Ionty železa prochází Fentonovou reakcí a následně dochází k akumulaci ROS poškozujících buňku, což je pro ferroptózu esenciální. Zvýšeného oxidativního stresu lze ale využít v klinické praxi – některé ze studií navrhují jeho využití pro zvýšení senzitivity nádorových buněk k chemoterapii [105], [111], [116]. Tato možnost kombinace byla studována například na rakovině prsu [105], ale i glioblastom se stal předmětem některých studií (například kombinace cisplatinu s inhibitory exprese GPX4) [117].

Eflux železa z buňky byl prozatím provozován pouze pomocí ferroportinu [105].

Železo je pro buňky potřebné pro růst a proliferaci buňky. Mezi některé jeho fyziologické funkce patří regulace buněčného cyklu, angiogeneze nebo DNA syntéza, opravy a epigenetické remodelace [114]. U maligních nádorových buněk dochází k abnormálnímu zvýšení intracelulární hladiny železa kvůli vysoké poptávce po tomto prvku [105], [114]. Zde se železo podílí i na formaci metastáz a působí v nádorovém mikroprostředí – například proti efektu NK buněk. Zvýšení zásob železa je zprostředkováno modulací metabolických drah. Prvním příkladem je zvýšení počtů molekul transferrinu, díky čemuž dochází ke zvýšenému influxu železa do buňky, jedním z nádorů, který tento princip využívá, je i glioblastom [118], [119]. Dalším předmětem modulací jsou STEAP3. V endozomu dochází

k přeměně Fe^{3+} na Fe^{2+} pomocí reduktáz několika rodin, Fe^{2+} je pomocí DMT1 transportováno do LIP. STEAP3 jsou v buňkách maligních gliomů extrémně exprimovány a interakcí s dalšími komponenty drah indukují expresi TfR-1, čímž dochází ke zvýšení influxu, a tedy i celkové intracelulární koncentrace. Naopak při zablokování těchto reduktáz potlačuje proliferaci a tvorbu metastáz [114]. Hladiny ferritinu v plazmě jsou u mnoha onkologických pacientů zvýšené. Bylo prokázáno i spojení vyšších hladin ferritinu s pokročilejším stádiem nádoru [114]. Další komponentou jsou NEET proteiny – klíčové regulátory, které v nádorových buňkách udržují vysoké hladiny železa i ROS. Svou funkcí zvyšují mitochondriální akumulaci železa, čímž podporují proliferaci i tvorbu metastáz [114]. Velkou roli při proliferaci hraje i snížení exprese ferroportinu. Při nadměrné expresi této pumpy naopak dochází k indukci autofágie a aktivaci p53 proteinu [105], [114].

4.3. spuštění ferroptózy pro klinické účely – nanočástice

Minulá kapitola byla zaměřena především na prospěšnost zlatých nanočástic, využití ale nachází i částice z jiných materiálů. Pro indukci ferroptózy se využívají především nanočástice ze železa a na bázi křemíku. I jiné kovy (stříbro, zlato) by šly využít pro indukci reakce s peroxidem vodíku, prozatím se ale zdá, že částice z těchto materiálů působí spíše na povrchu [105]. Tyto kovy mohou být ale použity pro vytvoření vrstvy na povrchu nanočástice [120]. Železné nanočástice se mimo jiné využívají i na zobrazovací metody (MRI, CT) [120], k vyvolání hypertermie [121] či na dopravu terapeutik [105], [120], [122].

Podobně jako částice využitě pro termoterapii, i ty určené pro ferroptózu je nutno optimalizovat z hlediska mnoha kritérií – od velikosti, tvaru, chemického složení a modifikaci povrchu po ideální koncentraci využitých dávek a distribuci. Všechna tato kritéria mohou ovlivnit průběh ferroptózy – například nemodifikované nanočástice mohou způsobit pomalejší průběh ferroptózy. Studie, která si tohoto jevu všimla, spekuluje, že je rychlost ovlivněna pomalejší internalizací částice [122]. Pro dobrou akumulaci se zase využívá nanočástic obalených PEG nebo částic větších rozměrů. U těch je ale horší vstup do buňky [122]. I k nanočásticím učeným k ferroptóze lze přidat protilátky k efektivnější lokalizaci [121].

Je nutno zmínit chemické složení částic. Samotné železo poměrně snadno podléhá korozi a proto není ideální pro výrobu nanočástic. Místo toho se používají směsi Fe_3O_4 nebo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Druhá ze směsí je preferována, jelikož ionty železa je zde vyskytují v podobě Fe^{3+} . Ionty s tímto oxidačním číslem lze přirozeně v těle najít, a proto by nemělo docházet k vedlejším účinkům [120].

U železných nanočástic se dochází k modifikacím povrchu pomocí syntetických polymerů (PEG), proteinů, polyvinylalkoholu nebo pyrrolidonu či pomocí již zmíněných ušlechtilých kovů [120].

Při syntéze nanočástic je snaha vytvořit biokompatibilní částice s co nejmenší toxicitou. Problematika, jak tohoto docílit, je velmi komplikovaná. Některé částice oxidů železa způsobovaly záněty, vředy či neurobehaviorální změny. I když se povede syntetizovat zpočátku bezpečné částice, je

nutno počítat s tím, že v průběhu času v těle degradují a jejich zbytky začnou se svým okolím interagovat [120]. Částice na bázi křemíku se zdají jako poměrně bezpečná alternativa díky jejich biokompatibilitě a rychlému vyfiltrování ledvinami, ale ani jejich toxicita není z hlediska dlouhodobého efektu dostatečně prostudována [122].

4.4. doručení do buňky a spuštění feroptózy

Velká část textu *3.4 doručení na místo určení* se týká i částic využívaných pro feroptózu, především problematika BBB a permeability cév. Vaskularizace nádoru se však na efektivitě léčbě projevuje ještě jiným způsobem – efektivita terapie závisí na zásobení živinami a kyslíkem. Nádorové buňky trpící nedostatkem živin jsou k indukci feroptózy obecně citlivější, i když existují některé nádorové buňky, které jsou citlivé i při dobrém zásobení [122]. Pro další postup v léčbě pomocí této metody by bylo výhodné blíže prozkoumat, jak bude na feroptózu reagovat glioblastom při různé míře vaskularizace.

Pro lepší zacílení nanočástic se využívá magnetické pole – rotační i polarizované [110], [123]. Tato metoda dokáže částice nejen efektivněji lokalizovat [124], ale umožní i usnadnění jejich průniku do buňky, a dokonce bude možné jimi po buňce i pohybovat. Tento pohyb by se dal označit jako míchání („stirring“) částic s buněčnými komponenty. Mícháním dochází k vzrůstu teploty a ke zvýšené produkci ROS, ve výsledku dochází ke značnému úbytku proliferace buňky [105]. Polarizované magnetické pole bylo využito i jako spouštěč, díky kterému dojde k uvolnění látek nesených nanočásticemi [110]. I při využití magnetického pole bude třeba optimalizovat množství aplikovaných částic či sílu využitého pole, jelikož i to se odráží na efektivnosti akumulace částic v nádorových buňkách [124].

Nádorové buňky mají často snížené pH mikroprostředí kvůli hypoxii a zvýšené aerobní glykolýze (viz *2.2 buněčný metabolismus nádorových buněk*). To usnadňuje uvolnění železných iontů. Tohoto efektu lze využít při senzitivním vypuštění železa z nanočástic, které aktivuje právě specifické prostředí nádoru. Železné ionty se využívají ve dvou podobách – Fe^{2+} (železnaté, v angličtině označované jako „ferrous“) a Fe^{3+} (železité, označované jako „ferric“). Mezi nimi pozorujeme několik rozdílů – Fe^{2+} generují více ROS než Fe^{3+} , ale podle některých studií jsou Fe^{3+} účinnější v zabíjení nádorových buněk [106], [108].

Po vnesení nanočástic a indukci feroptózy dochází k redukci růstu až regresi nádoru [122], projeví se ale i doprovodné imunitní reakce vedené přes ROS. Nanočástice v buňce zvýšily oxidativní stres, což se projevilo na translaci calreticulínu. Pokud je calreticulín ve zvýšeném množství prezentován na vnější plazmatické membráně, jedná se o „eat-me“ signál, který spustí protinádorovou imunitu. Dochází k fagocytóze antigenů charakteristických pro nádorové buňky a k maturaci dendritických buněk, které aktivují cytotoxické T-lymfocyty [110]. I díky těmto imunitu-podporujícím účinkům je feroptóza považována za možnou přídatnou metodu při protinádorové léčbě [110].

4.5. otázky pro další studium

Využití ferroptózy v léčbě glioblastomu ještě není tak probádané jako ketodieta či anti-angiogenní léčba a stále je několik problematických bodů, na které je třeba se zaměřit.

Podobně jako i u ostatních metod, ne všechny buňky budou citlivé ke spuštění specifické metody – nádorové buňky se od sebe liší v míře závislosti na železu [119]. Necitlivost k této dráze by bylo možné modulovat přes inhibitory ferroptózy (liproxistatin-1 či ferrostatin-1) [107], [122] nebo inhibitory autofágie (zvýšená exprese Nrf2, inhibice Keap1) [125] či supresorové proteiny (FSP1) [109]. Podle jedné ze studií jsou GSC k indukci ferroptózy citlivější než ostatní nádorové buňky a okolní zdravá tkáň. Při zacílení léčby na ferritin by tedy mohlo dojít k většímu vlivu právě u těchto proliferujících buněk [119], což by mělo potenciál značně omezit další růst nádoru.

Rozporuplná se zdá být i autofágie. Jedná se o jev, který spíše podporuje buněčné přežití a pouze při extrémní autofágii dochází k negativnímu účinku na buňku [113]. Indukce autofágie v buňce v počátečních stádiích vede k větší rezistenci vůči chemoterapeutickým léčivům a pouze v pokročilé fázi může indukce působit benefičně pro zvýšení senzitivity. Zároveň je bez autofágie ferroptóza potlačena. Článek, který se tomuto tématu věnoval, nabídl kombinaci dvou léčiv – temozoloidu a chinakrinu. Zatímco chinakrin by potlačil typ autofágie působící proti temozolomidu, druhý agent by nebyl degradován a byl by pro buňku toxičtější [116].

Při několika studiích byla v okolí léčeného nádoru pozorována zvýšená koncentrace zánětlivých makrofágů [105], [122]. Jelikož v současné době není jasné proč, ani jak tato skutečnost ovlivní léčbu u pacientů, je nutné tento jev dále zkoumat.

Při pokusech se zatím využívají mnohem větší koncentrace, než by bylo vhodné používat na pacientech [122]. Musíme se tedy pozastavit nad otázkami ohledně zkreslování výsledků a možné skryté toxicity.

Poslední odstavec není ani tak problémem, jako otázkou, kterou je nutné zařadit do budoucího zkoumání. Podle některých článků u ženy byla sledována lepší odpověď na standartní terapii díky pohlavně-specifické odpovědi, která byla způsobená lehce odlišným železným metabolismem [118]. Jak se tento pohlavně-specifický rozdíl projeví při indukci ferroptózy – bude jedno z pohlaví k této buněčné smrti náchylnější?

Závěr

I přesto, že už při léčbě glioblastomu došlo k značným pokrokům, stále se jedná o velmi relevantní problematiku bez výrazného prodloužení života pacientů. Svou heterogenitou a schopností invaze do zbytku mozku tento nádor stále uniká standardizaci jednotné léčby, která by fungovala u absolutní většiny pacientů. Rezistence vůči chemoterapii, radioterapii i všem „alternativním“ metodám, které byly v textu přiblíženy, je obdivuhodná, avšak nové poznatky nám přináší lepší porozumění mechanismů, kterými glioblastom na své okolí působí. Díky nim je pak možné zacílit léčbu na slabiny, které glioblastom během svého růstu odhalí. Stále ještě je nutné podrobit metody terapie detailnějšímu zkoumání a optimalizovat je nejen pro prodloužení doby života, ale i udržení až zlepšení jeho kvality.

Současná terapie je nedostatečná a přináší sebou výrazné negativní vedlejší účinky na život pacientů. I když se nově zkoumané metody mohou zdát na první pohled poněkud bizarní, výsledky klinických studií hovoří v jejich prospěch – posun v angiogenezi prodlužuje dobu bez progresu, ketogenní dieta, PTT a ferroptóza se podílí na zastavení proliferace a dalšího růstu. Prozatím se zdá, že benefiční by mohlo být využití několika terapií v kombinaci a aditivně tedy působit proti tumoru – od zlepšení dopravy částic při remodelaci krevních sítí nádoru po indukci oxidativního stresu ferroptózou vedoucí k oslabení nádorové buňky.

Ačkoli jsou metody popsány v mnoha člancích, je nutné zaměřit se na několik témat, které budou pro pokračování těchto nekonvenčních terapií vitální. Je potřeba zaměřit se na homogenizaci vaskulatury, která bude výhodná pro dodání cytostatik, nanočástic i pro omezení heterogenity regionů. Dále je třeba se omezit toxické účinky všech léčebných metod. Při využití nanočástic se jedná o velmi složitou problematiku, která žádá více srovnávacích studií pro řádnou modifikaci nanočástic (jak z hlediska efektivity, tak jejich toxicity na organismus). Velkou výhodou by tak mohly být léčby na základě specifické exprese nádoru, tam však narážíme na časovou a finanční náročnost analýzy. Jednalo by se však o možnost s potenciálem revolučně změnit léčbu glioblastomu od podoby, kterou známe nyní.

Seznam použité literatury

sekundární citace jsou označeny *

- [1] S. V. Ellor, T. A. Pagano-Young, a N. G. Avgeropoulos, „Glioblastoma: Background, standard treatment paradigms, and supportive care considerations", *J. Law. Med. Ethics*, roč. 42, č. 2, s. 171–182, 01 2014, doi: 10.1111/jlme.12133.*
- [2] F. Hanif, K. Muzaffar, K. Perveen, S. M. Malhi, a S. U. Simjee, „Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment", *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP*, roč. 18, č. 1, s. 3–9, 2017, doi: 10.22034/APJCP.2017.18.1.3.*
- [3] G. MacKenzie, K. K. O'Toole, S. J. Moss, a J. Maguire, „Compromised GABAergic inhibition contributes to tumor-associated epilepsy", *Epilepsy Res.*, roč. 126, s. 185–196, říj. 2016, doi: 10.1016/j.eplepsyres.2016.07.010.
- [4] D. Coluccia *et al.*, „Enhancing glioblastoma treatment using cisplatin-gold-nanoparticle conjugates and targeted delivery with magnetic resonance-guided focused ultrasound", *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, roč. 14, č. 4, s. 1137–1148, čer. 2018, doi: 10.1016/j.nano.2018.01.021.
- [5] A. Fayzullin *et al.*, „Phenotypic and Expressional Heterogeneity in the Invasive Glioma Cells", *Transl. Oncol.*, roč. 12, č. 1, s. 122–133, led. 2019, doi: 10.1016/j.tranon.2018.09.014.
- [6] W. J. Gardner, „Removal of the right cerebral hemisphere for infiltrating glioma: report of a case", *J. Am. Med. Assoc.*, roč. 101, č. 11, s. 823–826, zář. 1933, doi: 10.1001/jama.1933.02740360003002.
- [7] E. Bell a L. J. Karnosh, „Cerebral Hemispherectomy: Report of a Case Ten Years after Operation", *J. Neurosurg.*, roč. 6, č. 4, s. 285–293, čvc. 1949, doi: 10.3171/jns.1949.6.4.0285.
- [8] D. Rahmawati, E. A. Marhaendraputro, S. N. Kurniawan, a A. Wirathmawati, „Extracranial metastasis of glioblastoma: a rare case", *Malang Neurol. J.*, roč. 5, č. 1, Art. č. 1, led. 2019, doi: 10.21776/ub.mnj.2019.005.01.10.
- [9] „Estimated number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages", *Cancer today*, 2020, https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&population_s=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_gro

up=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1 (cit.: 26.3.2021).

- [10] M. Dominietto *et al.*, „Quantification of antiangiogenic treatment effects on tissue heterogeneity in glioma tumour xenograft model using a combination of DCE-MRI and 3D-ultramicroscopy", *Eur. Radiol.*, roč. 27, č. 7, s. 2894–2902, čvc. 2017, doi: 10.1007/s00330-016-4629-3.
- [11] E. R. Gerstner a T. T. Batchelor, „Antiangiogenic therapy for glioblastoma", *Cancer J. Sudbury Mass*, roč. 18, č. 1, s. 45–50, úno. 2012, doi: 10.1097/PPO.0b013e3182431c6f.
- [12] C. Brighi, S. Puttick, S. Rose, a A. K. Whittaker, „The potential for remodelling the tumour vasculature in glioblastoma", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, roč. 136–137, s. 49–61, lis. 2018, doi: 10.1016/j.addr.2018.10.001.*
- [13] M. R. Gilbert *et al.*, „A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma", *N. Engl. J. Med.*, roč. 370, č. 8, s. 699–708, úno. 2014, doi: 10.1056/NEJMoa1308573.
- [14] T. Gruenberger *et al.*, „Bevacizumab plus mFOLFOX-6 or FOLFOXIRI in patients with initially unresectable liver metastases from colorectal cancer: the OLIVIA multinational randomised phase II trial", *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, roč. 26, č. 4, s. 702–708, dub. 2015, doi: 10.1093/annonc/mdu580.
- [15] D. F. McDermott *et al.*, „Clinical activity and molecular correlates of response to atezolizumab alone or in combination with bevacizumab versus sunitinib in renal cell carcinoma", *Nat. Med.*, roč. 24, č. 6, s. 749–757, čer. 2018, doi: 10.1038/s41591-018-0053-3.
- [16] O. L. Chinot *et al.*, „Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma", *N. Engl. J. Med.*, roč. 370, č. 8, s. 709–722, úno. 2014, doi: 10.1056/NEJMoa1308345.
- [17] A. Desjardins *et al.*, „Bevacizumab and daily temozolomide for recurrent glioblastoma", *Cancer*, roč. 118, č. 5, s. 1302–1312, bře. 2012, doi: 10.1002/cncr.26381.
- [18] R. D. Bell *et al.*, „Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging", *Neuron*, roč. 68, č. 3, s. 409–427, lis. 2010, doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.043.
- [19] I. U. Ali a X. Chen, „Penetrating the Blood–Brain Barrier: Promise of Novel Nanoplatfoms and Delivery Vehicles", *ACS Nano*, roč. 9, č. 10, s. 9470–9474, říj. 2015, doi: 10.1021/acsnano.5b05341.*

- [20] N. Y. Hernández-Pedro, E. Rangel-López, G. Vargas Félix, B. Pineda, a J. Sotelo, „An Update in the Use of Antibodies to Treat Glioblastoma Multiforme", *Autoimmune Dis.*, roč. 2013, s. e716813, lis. 2013, doi: 10.1155/2013/716813.*
- [21] J. N. Sarkaria *et al.*, „Is the blood-brain barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data", *Neuro-Oncol.*, roč. 20, č. 2, s. 184–191, led. 2018, doi: 10.1093/neuonc/nox175.*
- [22] Y. Boucher, H. Salehi, B. Witwer, G. R. Harsh, a R. K. Jain, „Interstitial fluid pressure in intracranial tumours in patients and in rodents", *Br. J. Cancer*, roč. 75, č. 6, s. 829–836, 1997, doi: 10.1038/bjc.1997.148.
- [23] R. Elmgirbi *et al.*, „Toward a noninvasive estimate of interstitial fluid pressure by dynamic contrast-enhanced MRI in a rat model of cerebral tumor", *Magn. Reson. Med.*, roč. 80, č. 5, s. 2040–2052, lis. 2018, doi: 10.1002/mrm.27163.
- [24] S. Mahase *et al.*, „Hypoxia-Mediated Mechanisms Associated with Antiangiogenic Treatment Resistance in Glioblastomas", *Am. J. Pathol.*, roč. 187, č. 5, s. 940–953, kvě. 2017, doi: 10.1016/j.ajpath.2017.01.010.*
- [25] W. Wick *et al.*, „Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma", *N. Engl. J. Med.*, roč. 377, č. 20, s. 1954–1963, lis. 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1707358.
- [26] T. T. Batchelor *et al.*, „Phase III randomized trial comparing the efficacy of cediranib as monotherapy, and in combination with lomustine, versus lomustine alone in patients with recurrent glioblastoma", *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, roč. 31, č. 26, s. 3212–3218, zář. 2013, doi: 10.1200/JCO.2012.47.2464.
- [27] D. A. Reardon *et al.*, „Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial", *JAMA Oncol.*, roč. 6, č. 7, s. 1003–1010, čvc. 2020, doi: 10.1001/jamaoncol.2020.1024.
- [28] X. Cui *et al.*, „Hacking macrophage-associated immunosuppression for regulating glioblastoma angiogenesis", *Biomaterials*, roč. 161, s. 164–178, dub. 2018, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.01.053.
- [29] E. Dierge, Y. Larondelle, a O. Feron, „Cancer diets for cancer patients: Lessons from mouse studies and new insights from the study of fatty acid metabolism in tumors", *Biochimie*, roč. 178, s. 56–68, lis. 2020, doi: 10.1016/j.biochi.2020.08.020.*
- [30] E. C. Woolf a A. C. Scheck, „The ketogenic diet for the treatment of malignant glioma", *J. Lipid Res.*, roč. 56, č. 1, s. 5–10, led. 2015, doi: 10.1194/jlr.R046797.*
- [31] M. Murugan a D. Boison, „Ketogenic diet, neuroprotection, and antiepileptogenesis", *Epilepsy Res.*, roč. 167, s. 106444, lis. 2020, doi: 10.1016/j.epilepsyres.2020.106444.*

- [32] M. K. Taylor, D. K. Sullivan, J. D. Mahnken, J. M. Burns, a R. H. Swerdlow, „Feasibility and efficacy data from a ketogenic diet intervention in Alzheimer’s disease”, *Alzheimers Dement. Transl. Res. Clin. Interv.*, roč. 4, s. 28–36, led. 2018, doi: 10.1016/j.trci.2017.11.002.
- [33] H. Koyuncu, V. Fidan, H. Toktas, O. Binay, a H. Celik, „Effect of ketogenic diet versus regular diet on voice quality of patients with Parkinson’s disease”, *Acta Neurol. Belg.*, zář. 2020, doi: 10.1007/s13760-020-01486-0.
- [34] C. Kosinski a F. R. Jornayvaz, „Effects of Ketogenic Diets on Cardiovascular Risk Factors: Evidence from Animal and Human Studies”, *Nutrients*, roč. 9, č. 5, Art. č. 5, kvě. 2017, doi: 10.3390/nu9050517.*
- [35] M. Maeyama *et al.*, „Metabolic changes and anti-tumor effects of a ketogenic diet combined with anti-angiogenic therapy in a glioblastoma mouse model”, *Sci. Rep.*, roč. 11, č. 1, s. 1–11, led. 2021, doi: 10.1038/s41598-020-79465-x.*
- [36] E. C. Woolf, N. Syed, a A. C. Scheck, „Tumor Metabolism, the Ketogenic Diet and β -Hydroxybutyrate: Novel Approaches to Adjuvant Brain Tumor Therapy”, *Front. Mol. Neurosci.*, roč. 9, lis. 2016, doi: 10.3389/fnmol.2016.00122.*
- [37] H. T. Chang, L. Olson, a K. A. Schwartz, „Ketolytic and glycolytic enzymatic expression profiles in malignant gliomas: implication for ketogenic diet therapy”, *Nutr. Metab.*, roč. 10, č. 1, s. 47, 2013, doi: 10.1186/1743-7075-10-47.*
- [38] E. E. Vincent *et al.*, „Mitochondrial Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Regulates Metabolic Adaptation and Enables Glucose-Independent Tumor Growth”, *Mol. Cell*, roč. 60, č. 2, s. 195–207, říj. 2015, doi: 10.1016/j.molcel.2015.08.013.
- [39] A. J. Lakhter, J. Hamilton, R. L. Konger, N. Brustovetsky, H. E. Broxmeyer, a S. R. Naidu, „Glucose-independent Acetate Metabolism Promotes Melanoma Cell Survival and Tumor Growth”, *J. Biol. Chem.*, roč. 291, č. 42, s. 21869–21879, říj. 2016, doi: 10.1074/jbc.M115.712166.
- [40] T. Duraj *et al.*, „Beyond the Warburg Effect: Oxidative and Glycolytic Phenotypes Coexist within the Metabolic Heterogeneity of Glioblastoma”, *Cells*, roč. 10, č. 2, Art. č. 2, úno. 2021, doi: 10.3390/cells10020202.
- [41] F. Bozzetti a Z. Stanga, „Does nutrition for cancer patients feed the tumour? A clinical perspective”, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, roč. 153, s. 103061, zář. 2020, doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.103061.*

- [42] J. Zhang *et al.*, „Low ketolytic enzyme levels in tumors predict ketogenic diet responses in cancer cell lines in vitro and in vivo", *J. Lipid Res.*, roč. 59, č. 4, s. 625–634, dub. 2018, doi: 10.1194/jlr.M082040.
- [43] C.-C. Ji *et al.*, „A ketogenic diet attenuates proliferation and stemness of glioma stem-like cells by altering metabolism resulting in increased ROS production.", *Int. J. Oncol.*, roč. 56, č. 2, s. 606–617, nor 2020, doi: 10.3892/ijo.2019.4942.
- [44] J. W. Wojtkowiak, D. Verduzco, K. J. Schramm, a R. J. Gillies, „Drug Resistance and Cellular Adaptation to Tumor Acidic pH Microenvironment", *Mol. Pharm.*, roč. 8, č. 6, s. 2032–2038, pro. 2011, doi: 10.1021/mp200292c.*
- [45] E. C. Woolf *et al.*, „The Ketogenic Diet Alters the Hypoxic Response and Affects Expression of Proteins Associated with Angiogenesis, Invasive Potential and Vascular Permeability in a Mouse Glioma Model", *PLoS ONE*, roč. 10, č. 6, čer. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0130357.
- [46] P. Stafford, M. G. Abdelwahab, D. Y. Kim, M. C. Preul, J. M. Rho, a A. C. Scheck, „The ketogenic diet reverses gene expression patterns and reduces reactive oxygen species levels when used as an adjuvant therapy for glioma", *Nutr. Metab.*, roč. 7, č. 1, s. 74, zřř. 2010, doi: 10.1186/1743-7075-7-74.
- [47] R. Skinner, A. Trujillo, X. Ma, a E. A. Beierle, „Ketone bodies inhibit the viability of human neuroblastoma cells", *J. Pediatr. Surg.*, roč. 44, č. 1, s. 212–216, led. 2009, doi: 10.1016/j.jpedsurg.2008.10.042.
- [48] Q. Zhang *et al.*, „ACE2 inhibits breast cancer angiogenesis via suppressing the VEGFa/VEGFR2/ERK pathway", *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR*, roč. 38, č. 1, s. 173, dub. 2019, doi: 10.1186/s13046-019-1156-5.
- [49] D. D. Weber, S. Aminazdeh-Gohari, a B. Kofler, „Ketogenic diet in cancer therapy", *Aging*, roč. 10, č. 2, s. 164–165, řno. 2018, doi: 10.18632/aging.101382.*
- [50] M. G. Abdelwahab *et al.*, „The Ketogenic Diet Is an Effective Adjuvant to Radiation Therapy for the Treatment of Malignant Glioma", *PLOS ONE*, roč. 7, č. 5, s. e36197, kvř. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0036197.
- [51] J. Rieger *et al.*, „ERGO: a pilot study of ketogenic diet in recurrent glioblastoma", *Int. J. Oncol.*, roč. 44, č. 6, s. 1843–1852, řer. 2014, doi: 10.3892/ijo.2014.2382.
- [52] D. M. Lussier, E. C. Woolf, J. L. Johnson, K. S. Brooks, J. N. Blattman, a A. C. Scheck, „Enhanced immunity in a mouse model of malignant glioma is mediated by a therapeutic ketogenic diet", *BMC Cancer*, roč. 16, č. 1, s. 310, kvř. 2016, doi: 10.1186/s12885-016-2337-7.

- [53] E. J. T. M. van der Louw *et al.*, „Ketogenic diet treatment as adjuvant to standard treatment of glioblastoma multiforme: a feasibility and safety study", *Ther. Adv. Med. Oncol.*, roč. 11, s. 1758835919853958, led. 2019, doi: 10.1177/1758835919853958.
- [54] M. Bilici, B. Tavail, O. Dogru, M. Davutoglu, a M. Bosnak, „Diabetic Ketoacidosis is Associated with Prothrombotic Tendency in Children", *Pediatr. Hematol. Oncol.*, roč. 28, č. 5, s. 418–424, čvc. 2011, doi: 10.3109/08880018.2011.558568.
- [55] S. Nasser, V. Vialichka, M. Biesiekierska, A. Balcerczyk, a L. Pirola, „Effects of ketogenic diet and ketone bodies on the cardiovascular system: Concentration matters", *World J. Diabetes*, roč. 11, č. 12, s. 584–595, pro. 2020, doi: 10.4239/wjd.v11.i12.584.*
- [56] „National Diabetes Statistics Report 2020. Estimates of diabetes and its burden in the United States.", *Centers for Disease Control and Prevention*, s. 32, 2020, <https://www.cdc.gov/diabetes/pdfs/data/statistics/national-diabetes-statistics-report.pdf> (cit.: 25.3.2021).
- [57] E. H. Kossoff, P. L. Pyzik, S. L. Furth, H. D. Hladky, J. M. Freeman, a E. P. G. Vining, „Kidney Stones, Carbonic Anhydrase Inhibitors, and the Ketogenic Diet", *Epilepsia*, roč. 43, č. 10, s. 1168–1171, 2002, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2002.11302.x>.
- [58] M. J. Burkitt, „An overlooked danger of ketogenic diets: Making the case that ketone bodies induce vascular damage by the same mechanisms as glucose", *Nutrition*, roč. 75–76, s. 110763, čvc. 2020, doi: 10.1016/j.nut.2020.110763.
- [59] T. H. Best, D. N. Franz, D. L. Gilbert, D. P. Nelson, a M. R. Epstein, „Cardiac complications in pediatric patients on the ketogenic diet", *Neurology*, roč. 54, č. 12, s. 2328–2330, čer. 2000, doi: 10.1212/WNL.54.12.2328.
- [60] N. Heussinger *et al.*, „10 patients, 10 years – Long term follow-up of cardiovascular risk factors in Glut1 deficiency treated with ketogenic diet therapies: A prospective, multicenter case series", *Clin. Nutr.*, roč. 37, č. 6, s. 2246–2251, pro. 2018, doi: 10.1016/j.clnu.2017.11.001.
- [61] M. J. Sharman *et al.*, „A Ketogenic Diet Favorably Affects Serum Biomarkers for Cardiovascular Disease in Normal-Weight Men", *J. Nutr.*, roč. 132, č. 7, s. 1879–1885, čvc. 2002, doi: 10.1093/jn/132.7.1879.
- [62] P. Lagiou, S. Sandin, M. Lof, D. Trichopoulos, H.-O. Adami, a E. Weiderpass, „Low carbohydrate-high protein diet and incidence of cardiovascular diseases in Swedish women: prospective cohort study", *BMJ*, roč. 344, s. e4026, čer. 2012, doi: 10.1136/bmj.e4026.

- [63] G. J. Buse, K. D. Riley, C. M. Dress, a T. D. Neumaster, „Patient with gemfibrozil-controlled hypertriglyceridemia that developed acute pancreatitis after starting ketogenic diet", *Curr. Surg.*, roč. 61, č. 2, s. 224–226, bře. 2004, doi: 10.1016/S0149-7944(03)00159-4.
- [64] W. A. Stewart, K. Gordon, a P. Camfield, „Acute Pancreatitis Causing Death in a Child on the Ketogenic Diet", *J. Child Neurol.*, roč. 16, č. 9, s. 682–682, zář. 2001, doi: 10.1177/088307380101600910.
- [65] R. Nakao, T. Abe, S. Yamamoto, a K. Oishi, „Ketogenic diet induces skeletal muscle atrophy via reducing muscle protein synthesis and possibly activating proteolysis in mice", *Sci. Rep.*, roč. 9, č. 1, Art. č. 1, pro. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-56166-8.
- [66] K. J. Martin-McGill *et al.*, „Ketogenic diets as an adjuvant therapy for glioblastoma (KEATING): a randomized, mixed methods, feasibility study", *J. Neurooncol.*, roč. 147, č. 1, s. 213–227, bře. 2020, doi: 10.1007/s11060-020-03417-8.
- [67] X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, a M. A. El-Sayed, „Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles", *Lasers Med. Sci.*, roč. 23, č. 3, s. 217–228, čvc. 2008, doi: 10.1007/s10103-007-0470-x.*
- [68] M. Rahaman, S. Moras, L. He, T. I. Madeira, a D. R. T. Zahn, „Fine-tuning of localized surface plasmon resonance of metal nanostructures from near-Infrared to blue prepared by nanosphere lithography", *J. Appl. Phys.*, roč. 128, č. 23, s. 233104, pro. 2020, doi: 10.1063/5.0027139.
- [69] M. R. K. Ali *et al.*, „Efficacy, long-term toxicity, and mechanistic studies of gold nanorods photothermal therapy of cancer in xenograft mice", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 114, č. 15, s. E3110–E3118, dub. 2017, doi: 10.1073/pnas.1619302114.
- [70] V. P. Pattani, J. Shah, A. Atalis, A. Sharma, a J. W. Tunnell, „Role of apoptosis and necrosis in cell death induced by nanoparticle-mediated photothermal therapy", *J. Nanoparticle Res.*, roč. 17, č. 1, s. 20, led. 2015, doi: 10.1007/s11051-014-2822-3.
- [71] M.-R. Jo, S.-H. Bae, M.-R. Go, H.-J. Kim, Y.-G. Hwang, a S.-J. Choi, „Toxicity and Biokinetics of Colloidal Gold Nanoparticles", *Nanomater. Basel Switz.*, roč. 5, č. 2, s. 835–850, kvě. 2015, doi: 10.3390/nano5020835.
- [72] L. Freitas de Freitas, G. H. C. Varca, J. G. Dos Santos Batista, a A. Benévolo Lugão, „An Overview of the Synthesis of Gold Nanoparticles Using Radiation Technologies", *Nanomaterials*, roč. 8, č. 11, Art. č. 11, lis. 2018, doi: 10.3390/nano8110939.*

- [73] S. Her, D. A. Jaffray, a C. Allen, „Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, roč. 109, s. 84–101, led. 2017, doi: 10.1016/j.addr.2015.12.012.*
- [74] W. Cai, T. Gao, H. Hong, a J. Sun, „Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology", *Nanotechnol. Sci. Appl.*, roč. 1, s. 17–32, zář. 2008.*
- [75] X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian, a M. A. El-Sayed, „Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods", *J. Am. Chem. Soc.*, roč. 128, č. 6, s. 2115–2120, úno. 2006, doi: 10.1021/ja057254a.
- [76] C. Yan, Y. Wang, Q. Tian, H. Wu, a S. Yang, „Concentration effect on large scale synthesis of high quality small gold nanorods and their potential role in cancer theranostics", *Mater. Sci. Eng. C*, roč. 87, s. 120–127, čer. 2018, doi: 10.1016/j.msec.2018.02.021.
- [77] Q. Chen *et al.*, „Photothermal Therapy Promotes Tumor Infiltration and Antitumor Activity of CAR T Cells", *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla*, roč. 31, č. 23, s. e1900192, čer. 2019, doi: 10.1002/adma.201900192.
- [78] Q. Chen, L. Xu, C. Liang, C. Wang, R. Peng, a Z. Liu, „Photothermal therapy with immune-adjuvant nanoparticles together with checkpoint blockade for effective cancer immunotherapy", *Nat. Commun.*, roč. 7, s. 13193, říj. 2016, doi: 10.1038/ncomms13193.
- [79] S. M. Amini, „Gold nanostructures absorption capacities of various energy forms for thermal therapy applications", *J. Therm. Biol.*, roč. 79, s. 81–84, led. 2019, doi: 10.1016/j.jtherbio.2018.12.007.*
- [80] L. C. Kennedy *et al.*, „A New Era for Cancer Treatment: Gold-Nanoparticle-Mediated Thermal Therapies", *Small*, roč. 7, č. 2, s. 169–183, 2011, doi: 10.1002/smll.201000134.
- [81] R. Tong, H. H. Chiang, a D. S. Kohane, „Photoswitchable nanoparticles for in vivo cancer chemotherapy", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 110, č. 47, s. 19048–19053, lis. 2013, doi: 10.1073/pnas.1315336110.*
- [82] Y.-S. Chen, Y.-C. Hung, I. Liau, a G. S. Huang, „Assessment of the In Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles", *Nanoscale Res. Lett.*, roč. 4, č. 8, s. 858, kvě. 2009, doi: 10.1007/s11671-009-9334-6.
- [83] Y.-P. Jia, B.-Y. Ma, X.-W. Wei, a Z.-Y. Qian, „The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles", *Chin. Chem. Lett.*, roč. 28, č. 4, s. 691–702, dub. 2017, doi: 10.1016/j.ccllet.2017.01.021.*

- [84] C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, a C. Yin, „Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles", *Biomaterials*, roč. 31, č. 13, s. 3657–3666, kvě. 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.065.
- [85] Park S, Lee Wj, Park S, Choi D, Kim S, a Park N, „Reversibly pH-responsive gold nanoparticles and their applications for photothermal cancer therapy", *Sci. Rep.*, roč. 9, č. 1, pro. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-56754-8.
- [86] C. Christie, S. J. Madsen, Q. Peng, a H. Hirschberg, „Photothermal Therapy Employing Gold Nanoparticle- Loaded Macrophages as Delivery Vehicles: Comparing the Efficiency of Nanoshells Versus Nanorods", *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. Off. Organ Int. Soc. Environ. Toxicol. Cancer*, roč. 36, č. 3, s. 229–235, 2017, doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2017021545.
- [87] Wang C, Sun A, Qiao Y, Zhang P, Ma L, a Su M, „Cationic surface modification of gold nanoparticles for enhanced cellular uptake and X-ray radiation therapy", *J. Mater. Chem. B*, roč. 3, č. 37, čvc. 2015, doi: 10.1039/C5TB00766F.
- [88] M. R. K. Ali, S. R. Panikkanvalappil, a M. A. El-Sayed, „Enhancing the Efficiency of Gold Nanoparticles Treatment of Cancer by Increasing Their Rate of Endocytosis and Cell Accumulation Using Rifampicin", *J. Am. Chem. Soc.*, roč. 136, č. 12, s. 4464–4467, bre. 2014, doi: 10.1021/ja4124412.*
- [89] F. Wang *et al.*, „Proteomics identifies EGF-like domain multiple 7 as a potential therapeutic target for epidermal growth factor receptor-positive glioma", *Cancer Commun.*, roč. 40, č. 10, s. 518–530, říj. 2020, doi: 10.1002/cac2.12092.
- [90] K. Watanabe, O. Tachibana, K. Sata, Y. Yonekawa, P. Kleihues, a H. Ohgaki, „Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas", *Brain Pathol. Zurich Switz.*, roč. 6, č. 3, s. 217–223; discussion 23-24, čvc. 1996, doi: 10.1111/j.1750-3639.1996.tb00848.x.
- [91] D. M. O'Rourke *et al.*, „A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma", *Sci. Transl. Med.*, roč. 9, č. 399, čvc. 2017, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa0984.
- [92] J. Schuster *et al.*, „A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study", *Neuro-Oncol.*, roč. 17, č. 6, s. 854–861, čer. 2015, doi: 10.1093/neuonc/nou348.
- [93] Y. Ren, H. Qi, Q. Chen, a L. Ruan, „Thermal dosage investigation for optimal temperature distribution in gold nanoparticle enhanced photothermal therapy", *Int. J. Heat*

- Mass Transf.*, roč. 106, s. 212–221, bře. 2017, doi:
10.1016/j.ijheatmasstransfer.2016.10.067.
- [94] J. Nguyen *et al.*, „Flow arrest intra-arterial delivery of small TAT-decorated and neutral micelles to gliomas", *J. Neurooncol.*, roč. 133, č. 1, s. 77–85, kvě. 2017, doi:
10.1007/s11060-017-2429-5.
- [95] K. Maier-Hauff *et al.*, „Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme", *J. Neurooncol.*, roč. 81, č. 1, s. 53–60, led. 2007, doi:
10.1007/s11060-006-9195-0.
- [96] L. Tian *et al.*, „Correlation of regional deposition dosage for inhaled nanoparticles in human and rat olfactory", *Part. Fibre Toxicol.*, roč. 16, č. 1, s. 6, led. 2019, doi:
10.1186/s12989-019-0290-8.
- [97] R. Raliya, D. Saha, T. S. Chadha, B. Raman, a P. Biswas, „Non-invasive aerosol delivery and transport of gold nanoparticles to the brain", *Sci. Rep.*, roč. 7, č. 1, Art. č. 1, bře. 2017, doi: 10.1038/srep44718.
- [98] L. Saulite, K. Pleiko, I. Popena, D. Dapkute, R. Rotomskis, a U. Riekstina, „Nanoparticle delivery to metastatic breast cancer cells by nanoengineered mesenchymal stem cells", *Beilstein J. Nanotechnol.*, roč. 9, s. 321–332, 2018, doi: 10.3762/bjnano.9.32.
- [99] Y. Zhang *et al.*, „Macrophage-Membrane-Coated Nanoparticles for Tumor-Targeted Chemotherapy", *Nano Lett.*, roč. 18, č. 3, s. 1908–1915, bře. 2018, doi:
10.1021/acs.nanolett.7b05263.
- [100] Raoof M *et al.*, „Stability of antibody-conjugated gold nanoparticles in the endolysosomal nanoenvironment: implications for noninvasive radiofrequency-based cancer therapy", *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, roč. 8, č. 7, říj. 2012, doi:
10.1016/j.nano.2012.02.001.
- [101] Gannon Cj, Patra Cr, Bhattacharya R, Mukherjee P, a Curley Sa, „Intracellular gold nanoparticles enhance non-invasive radiofrequency thermal destruction of human gastrointestinal cancer cells", *J. Nanobiotechnology*, roč. 6, led. 2008, doi: 10.1186/1477-3155-6-2.
- [102] Cardinal J *et al.*, „Noninvasive radiofrequency ablation of cancer targeted by gold nanoparticles", *Surgery*, roč. 144, č. 2, srp. 2008, doi: 10.1016/j.surg.2008.03.036.
- [103] S. Gupta *et al.*, „Effects of Near-infrared Laser Irradiation of Biodegradable Microspheres Containing Hollow Gold Nanospheres and Paclitaxel Administered

- Intraarterially in a Rabbit Liver Tumor Model", *J. Vasc. Interv. Radiol. JVIR*, roč. 23, č. 4, s. 553–561, dub. 2012, doi: 10.1016/j.jvir.2011.12.017.
- [104] L. A. Sordillo, Y. Pu, S. Pratavieira, Y. Budansky, a R. R. Alfano, „Deep optical imaging of tissue using the second and third near-infrared spectral windows", *J. Biomed. Opt.*, roč. 19, č. 5, s. 056004, kvě. 2014, doi: 10.1117/1.JBO.19.5.056004.
- [105] S. Wang *et al.*, „Iron and magnetic: new research direction of the ferroptosis-based cancer therapy", *Am. J. Cancer Res.*, roč. 8, č. 10, s. 1933–1946, říj. 2018.*
- [106] L. Chen *et al.*, „Fe²⁺/Fe³⁺ Ions Chelated with Ultrasmall Polydopamine Nanoparticles Induce Ferroptosis for Cancer Therapy", *ACS Biomater. Sci. Eng.*, roč. 5, č. 9, s. 4861–4869, zář. 2019, doi: 10.1021/acsbmaterials.9b00461.
- [107] R. Skouta *et al.*, „Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models", *J. Am. Chem. Soc.*, roč. 136, č. 12, s. 4551–4556, bře. 2014, doi: 10.1021/ja411006a.
- [108] M. Zhang a C.-H. Jang, „Imaging the oxidation effects of the Fenton reaction on phospholipids at the interface between aqueous phase and thermotropic liquid crystals", *J. Biosci. Bioeng.*, roč. 120, č. 2, s. 193–198, srp. 2015, doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.12.016.
- [109] M. Riegman *et al.*, „Ferroptosis occurs through an osmotic mechanism and propagates independently of cell rupture", *Nat. Cell Biol.*, roč. 22, č. 9, s. 1042–1048, zář. 2020, doi: 10.1038/s41556-020-0565-1.
- [110] B. Yu, B. Choi, W. Li, a D.-H. Kim, „Magnetic field boosted ferroptosis-like cell death and responsive MRI using hybrid vesicles for cancer immunotherapy", *Nat. Commun.*, roč. 11, č. 1, s. 3637, čvc. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-17380-5.
- [111] M. Gao, P. Monian, Q. Pan, W. Zhang, J. Xiang, a X. Jiang, „Ferroptosis is an autophagic cell death process", *Cell Res.*, roč. 26, č. 9, Art. č. 9, zář. 2016, doi: 10.1038/cr.2016.95.
- [112] J. P. Friedmann Angeli *et al.*, „Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice", *Nat. Cell Biol.*, roč. 16, č. 12, s. 1180–1191, pro. 2014, doi: 10.1038/ncb3064.
- [113] W. Hou *et al.*, „Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin", *Autophagy*, roč. 12, č. 8, s. 1425–1428, srp. 2016, doi: 10.1080/15548627.2016.1187366.*
- [114] Y. Wang, L. Yu, J. Ding, a Y. Chen, „Iron Metabolism in Cancer", *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 20, č. 1, pro. 2018, doi: 10.3390/ijms20010095.*

- [115] H. Li *et al.*, „Iron regulatory protein 2 modulates the switch from aerobic glycolysis to oxidative phosphorylation in mouse embryonic fibroblasts", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 116, č. 20, s. 9871–9876, kvě. 2019, doi: 10.1073/pnas.1820051116.
- [116] M. Buccarelli *et al.*, „Inhibition of autophagy increases susceptibility of glioblastoma stem cells to temozolomide by igniting ferroptosis", *Cell Death Dis.*, roč. 9, č. 8, Art. č. 8, srp. 2018, doi: 10.1038/s41419-018-0864-7.
- [117] Y. Zhang *et al.*, „Glioblastoma Therapy Using Codelivery of Cisplatin and Glutathione Peroxidase Targeting siRNA from Iron Oxide Nanoparticles", *ACS Appl. Mater. Interfaces*, roč. 12, č. 39, s. 43408–43421, zář. 2020, doi: 10.1021/acsami.0c12042.
- [118] D. S. Nesterova *et al.*, „Sexually dimorphic impact of the iron-regulating gene, HFE, on survival in glioblastoma", *Neuro-Oncol. Adv.*, roč. 2, č. 1, s. vdaa001, pro. 2020, doi: 10.1093/noajnl/vdaa001.
- [119] D. L. Schonberg *et al.*, „Preferential Iron Trafficking Characterizes Glioblastoma Stem-like Cells", *Cancer Cell*, roč. 28, č. 4, s. 441–455, říj. 2015, doi: 10.1016/j.ccell.2015.09.002.
- [120] N. Malhotra *et al.*, „Potential Toxicity of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles: A Review", *Mol. Basel Switz.*, roč. 25, č. 14, čvc. 2020, doi: 10.3390/molecules25143159.*
- [121] C. J. Legge, H. E. Colley, M. A. Lawson, a A. E. Rawlings, „Targeted magnetic nanoparticle hyperthermia for the treatment of oral cancer", *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.*, roč. 48, č. 9, s. 803–809, říj. 2019, doi: 10.1111/jop.12921.
- [122] S. E. Kim *et al.*, „Ultrasmall nanoparticles induce ferroptosis in nutrient-deprived cancer cells and suppress tumour growth", *Nat. Nanotechnol.*, roč. 11, č. 11, s. 977–985, lis. 2016, doi: 10.1038/nnano.2016.164.
- [123] Y. Cheng *et al.*, „Rotating magnetic field induced oscillation of magnetic particles for in vivo mechanical destruction of malignant glioma", *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, roč. 223, s. 75–84, úno. 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.12.028.
- [124] S. N. Moysidis *et al.*, „Magnetic field-guided cell delivery with nanoparticle-loaded human corneal endothelial cells", *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, roč. 11, č. 3, s. 499–509, dub. 2015, doi: 10.1016/j.nano.2014.12.002.
- [125] Z. Fan *et al.*, „Nrf2-Keap1 pathway promotes cell proliferation and diminishes ferroptosis", *Oncogenesis*, roč. 6, č. 8, s. e371, srp. 2017, doi: 10.1038/oncsis.2017.65.