

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

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



Tereza Jakubcová

**Molekulární mechanismus buněčné smrti během fototermální terapie nádorů za použití
zlatých nanočástic**
**Molecular mechanism of cell death during gold nanoparticle based photothermal cancer
therapy**

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Monika Žárská, PhD.

Praha, 2024

Poděkování

Děkuji všem, kteří mě během psaní této práce podporovali. Zvláštní poděkování patří mým mentorům, MUDr. Zdeňkovi Hodnému, CSc. a Mgr. Monice Žárské, PhD., kteří mě vždy navedli správným směrem.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama z uvedené literatury a na základě konzultací se svou školitelkou. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29.04.2024

Podpis

Abstrakt

Plazmonická fototermální terapie (PPTT) je inovativní metoda pro léčbu nádorových onemocnění využívající nanomateriály, zejména zlaté nanočástice. Na rozdíl od klinicky používaných nádorových terapií slibuje minimální invazivitu, vysokou specifitu a minimalizaci vedlejších účinků léčby. Po vystavení rakovinných buněk elektromagnetickému záření o vlnových délkách blízkých infračervenému spektru dochází k vytvoření lokální hypertermie, která je zlatými nanočásticemi generována. Mechanismus indukované buněčné smrti však neprobíhá vždy stejným způsobem. Tato práce si klade za cíl porovnat dosud známé reakční mechanismy buněk na hypertermii vyvolanou PPTT a zdůraznit její potenciál pro klinickou terapii rakoviny. Porovnává identifikované mechanismy buněčných smrtí pozorovaných během PPTT, které zahrnují apoptózu, nekrózu, nekroptózu, buněčnou smrt závislou na autofagii, buněčnou smrt závislou na lysozomech a NETózu, které se vzájemně liší na molekulární úrovni. Pochopení molekulární podstaty těchto drah je zásadní pro optimalizaci účinnosti PPTT a její další testování jak *in vivo*, tak v klinických studiích.

Klíčová slova: plasmonická fototermální terapie, zlaté nanočástice, buněčná smrt

Abstract

Plasmonic photothermal therapy (PPTT) is an innovative method of cancer treatment using nanomaterials, especially gold nanoparticles. Unlike clinically used cancer therapies, it promises minimisation the invasiveness and side effects as well as high specificity. Exposure of cancer cells to the near-infrared light leads to local hyperthermia, which is generated by gold nanoparticles. Nevertheless, the mechanism of induced cell death does not proceed each time in the same manner. This work aims to compare to date known mechanisms governing the different cellular responses to PPTT-induced hyperthermia and highlights its potential for clinical cancer therapy. It compares the mechanisms of cell death observed and identified during PPTT, including apoptosis, necrosis, necroptosis, lysosome-dependent cell death, autophagy-dependent cell death and NETosis, which differ at the molecular level. Understanding the molecular basis of the cell death pathways is crucial for optimizing the efficacy of PPTT and its future testing both *in vivo* and in clinical trials.

Keywords: plasmonic photothermal therapy, gold nanoparticles, cell death

Seznam použitých zkratk

zkratka	anglicky	česky
3-MA	<i>3-methyladenine</i>	3-methyladenin
7AAD	<i>7-Aminoactinomycine D</i>	7-Aminoactinomycine D
AnnV	<i>Annexin V</i>	Annexin V
Apaf-1	<i>apoptosis protease activating factor-1</i>	apoptotický proteázový aktivační faktor 1
Atg	<i>autophagy-related genes</i>	geny spojené s autofagií
AuNCs	<i>gold nanocages</i>	zlaté nanokostky
AuNPs	<i>gold nanoparticles</i>	zlaté nanočástice
AuNR-BCPM	<i>AuNR-block copolymer micelle</i>	AuNR-bloková kopolymerová micela
AuNRs	<i>gold nanorods</i>	zlaté nanotyčky
AuNSs	<i>gold nanoshells</i>	zlaté nanoslupky
B16-BL6	<i>murine skin melanoma cell line</i>	buněčná linie odvozená od myšního kožního melanomu
BAD	<i>Bcl2 associated agonist of cell death</i>	agonista buněčné smrti asociovaný s Bcl2
BAK	<i>Bcl2 associated antagonist/killer</i>	antagonista/zabiják asociovaný s Bcl2
BAX	<i>Bcl2 associated X</i>	protein X asociovaný s Bcl2
Bcl2	<i>B-cell lymphoma-2</i>	rodina bcl genů, B-buňky lymfomu 2
BID	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>	agonista smrti interagující domény BH3
BS		buněčná smrt
C	<i>cathepsin</i>	katepsin
CASP	<i>caspase</i>	kaspáza
cFLIP	<i>cellular FLICE-like inhibiting protein</i>	buněčný FLICE-podobný inhibující protein
cIAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>	buněčný inhibitor apoptózy
CTAB	<i>cetyltrimethylammonium bromide</i>	cetyl(trimethyl)amonium-bromid
CYLD	<i>cylindromatosis</i>	gen CYLD lysin 63 deubiquitinázy
Cyt c	<i>cytochrome c</i>	cytochrom c
DISC	<i>death inducing signalling complex</i>	signální komplex indukující smrt
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	deoxyribonukleová kyselina
ECM	<i>extracellular matrix</i>	extracelulární matrix
EMT-6	<i>murine mammary carcinoma cell line</i>	buněčná linie odvozená od myšního karcinomu mléčné žlázy
EPR	<i>enhanced permeability and retention effect</i>	efekt zvýšené permeability a retence
ER	<i>endoplasmic reticulum</i>	endoplazmatické retikulum
FA	<i>folic acid</i>	kyselina listová
FADD	<i>Fas associated death domain protein</i>	protein domény smrti asociovaný s Fas
HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>	buňky spinocelulárního nádoru hlavy a krku
IL-18	<i>interleukin-18</i>	interleukin-18
KB	<i>subline of the ubiquitous keratin-forming tumor cell line HeLa</i>	podtyp buněčné linie HeLa formující keratin
LAMP	<i>lysosome-associated membrane glycoprotein</i>	membránový glykoprotein asociovaný s lysozomy
LC3	<i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>	protein 1 lehkého řetězce 3 asociovaný s mikrotubuly
LSP	<i>localized surface plasmon</i>	lokalizovaný povrchový pasmon
LSPR	<i>localized surface plasmon resonance</i>	lokalizovaná povrchová pasmonová rezonance
LUBAC	<i>linear ubiquitin chain assembly complex</i>	komplex lineárního ubikvitinového řetězce
ME180	<i>epidermoid carcinoma cell line</i>	buněčná linie epidermoidního karcinomu

MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>	buňky myších embryonálních fibroblastů
MLKL	<i>mixed lineage kinase domain like pseudokinase</i>	kinázová doména smíšené linie podobná pseudokináze
MPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>	přechodový pór mitochondriální permeability
MSC	<i>mesenchymal stem cells</i>	mezenchymální kmenové buňky
MTAB	<i>(16-mercaptohexadecyl)-trimethylammonium bromide</i>	(16-merkaptohexadecyl)-trimethylamonium-bromid
NCCD	<i>Nomenclature Committee on Cell Death</i>	Nomenklaturní komise pro buněčnou smrt
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>	jaderný faktor κB
NIR	<i>near infra red</i>	vlnové délky z blízké infračervené oblasti spektra
NPs	<i>nanoparticles</i>	nanočástice
p62	<i>Sequestosome 1</i>	protein účastnící se autofagie
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>	neutrofilní extracelulární pasti
PARP	<i>poly-ADP ribose polymerase</i>	poly-ADP-ribóza-polymeráza
PEG	<i>polyethylene glycole</i>	polyethylen glykol
Pin1	<i>peptidyl prolyl cis/trans isomerase</i>	peptidyl prolyl cis/trans izomeráza
PLM		permeabilizace lysozomální membrány
PPTT	<i>plasmonic photothermal therapy</i>	plazmonická fototermální terapie
PS	<i>phosphatidylserine</i>	fosfatidylserin
PSS	<i>polystyrene sulphonate</i>	polystyren-sulfonát
RBS		regulovaná buněčná smrt
RF	<i>rifampicine</i>	rifampicin
ROS	<i>reactive oxygen species</i>	reaktivní formy kyslíku
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>	reverzní transkripce polymerázové řetězové reakce
SiHa	<i>cell line derived from squamous cell carcinoma</i>	buněčná linie odvozená od spinocelulárního karcinomu
SP	<i>surface plasmon</i>	povrchový plasmon
TEM	<i>transmission electron microscopy</i>	transmisní elektronová mikroskopie
TNCB	<i>cell line derived from triple negative breast cancer</i>	buněčná linie odvozená od triple-negativního karcinomu prsu
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>	tumor nekrotizující faktor
TRADD	<i>TNFR1-associated death domain protein</i>	protein domény smrti asociovaný s TNFR1
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>	ligand indukující apoptózu související s TNF
TT	<i>thermal therapy</i>	termální terapie
ULK	<i>Unc-51-like kinase</i>	kináza podobná Unc-51
VIS	<i>visible spectrum</i>	viditelné spektrum
WT	<i>wild type</i>	divoký typ

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Nanomateriály a nanočástice	2
2.1 Definice nanotechnologie a nanomateriálů	2
2.2 Rozdělení nanomateriálů.....	3
2.3 Syntéza a úpravy nanočástic	3
3. Plasmonická fototermální terapie (PPTT) a využití AuNPs	4
3.1 Zlaté nanočástice (AuNPs).....	4
3.1.1 Hlavní charakteristiky AuNPs.....	4
3.1.2 Velikost a tvar AuNPs a ladění jejich optických a fyzikálních vlastností	6
3.1.3 Povrchové modifikace AuNPs	6
3.1.3.1 PEGylace.....	7
3.1.3.2 MTAB	7
3.2 Průběh terapie.....	7
3.3 Výhody a nevýhody PPTT	8
3.3.1 Výhody PPTT.....	8
3.3.2 Nevýhody PPTT	8
3.4 Klinické studie PPTT	10
4. Molekulární mechanismy buněčné smrti	10
4.1 Buněčná smrt indukovaná v rámci aplikace PPTT	11
4.2 Apoptóza	12
4.2.1 Apoptóza indukovaná aplikací PPTT.....	15
4.3 Nekróza	17
4.3.1 Nekróza indukovaná aplikací PPTT.....	18
4.4 Nekroptóza	19
4.4.1 Nekroptóza indukovaná aplikací PPTT.....	20
4.5 Buněčná smrt závislá na autofagii.....	22
4.5.1 Buněčná smrt závislá na autofagii indukovaná aplikací PPTT	23
4.6 NETóza.....	24
4.6.1 NETóza indukovaná aplikací PPTT	25
4.7 Lysozom-dependentní buněčná smrt.....	25
4.7.1 Lysozom-dependentní buněčná smrt indukovaná aplikací PPTT	27
5. Závěr	27
Seznam použité literatury.....	29

1. Úvod

Snaha porozumět vzniku a formování zhoubných nádorů probíhá po mnoho staletí, kdy nejranější záznamy sahají do starověkého Egypta, asi 3 000 před naším letopočtem. Již z tohoto období existují záznamy o nádoru (či vředu) prsu a jejich neléčitelnosti.

Dnešní znalosti o nádorové transformaci a nádorových onemocněních jsou mnohem hlubší. Ve zdravé tkáni probíhá buněčné dělení, např. za účelem regenerace. Když buňka projde určitým počtem dělení (zestárne), aktivuje programovanou buněčnou smrt, a nakonec je eliminována buňkami imunitního systému. V případě nádorové transformace je tento proces narušen a buňka se začíná nekontrolovatelně dělit. Takové buňky pronikají do okolních tkání, později migrují krevním řečištěm po těle a zakládají nová nádorová ložiska, tzv. metastázy (Sudhakar 2009).

Aktuálně se mezi klinicky nejběžněji užívané terapie nádorových onemocnění řadí chirurgický zákrok doplněný chemoterapií a radioterapií. I přes široké využití mohou mít tyto přístupy nedostatky, kterým se moderní medicína a výzkum snaží předejít. Jedná se zejména o finanční nákladnost, vysokou invazivitu, vedlejší účinky léčby zahrnující výskyt druhotných nádorů a v případě radio-/chemorezistentních buněk také nízkou účinnost. Nově vyvíjené klinické metody léčby kladou důraz zejména na pozorování mechanismů rezistence nádorových buněk a na specifitu léčby pro nádorovou tkáň (Zhang et al. 2018). Jednou z nových a slibných metod nádorové léčby je termální (TT) či plasmonická fototerminální terapie (*plasmonic photothermal therapy*, PPTT), která slibuje zejména nízkou invazivitu pro organismus a zároveň specifitu pro nádorové buňky. Výsledky aktuálních publikací poukazují na minimální vedlejší účinky léčby spolu s žádoucí protinádorovou stimulací imunitního systému (Ali et al. 2017). TT/PPTT je také kombinovatelná s chemoterapií a radioterapií pro dosažení maximální efektivity léčby (Darsajini et al. 2023).

PPTT využívá fototerminálních vlastností kovových nanomateriálů – zlatých nanočástic (*gold nanoparticles*, AuNPs) k cílenému poškození a destrukci nádorových buněk. AuNPs jsou schopny efektivně přeměňovat energii elektromagnetického záření na teplo prostřednictvím jevu lokalizované povrchové plasmonové rezonance (*localized surface plasmon resonance*, LSPR). Díky tomu jsou schopné lokálně navýšit teplotu, což následně zapříčiňuje odumírání nádorových buněk v důsledku hypertermie (Alkilany et al. 2012). Buněčnou smrt (BS) lze tradičně rozdělit na regulovanou a náhodnou. Kromě tohoto základního rozdělení byly popsány další podtypy BS, které se navzdory rozsáhlému propojení skrze signální molekuly, liší molekulárním mechanismem jejich průběhu. Jsou jimi například apoptóza, NETotická BS,

lysozom-dependentní BS, nekroptóza nebo pyroptóza (Galluzzi et al. 2007; Kroemer et al. 2009).

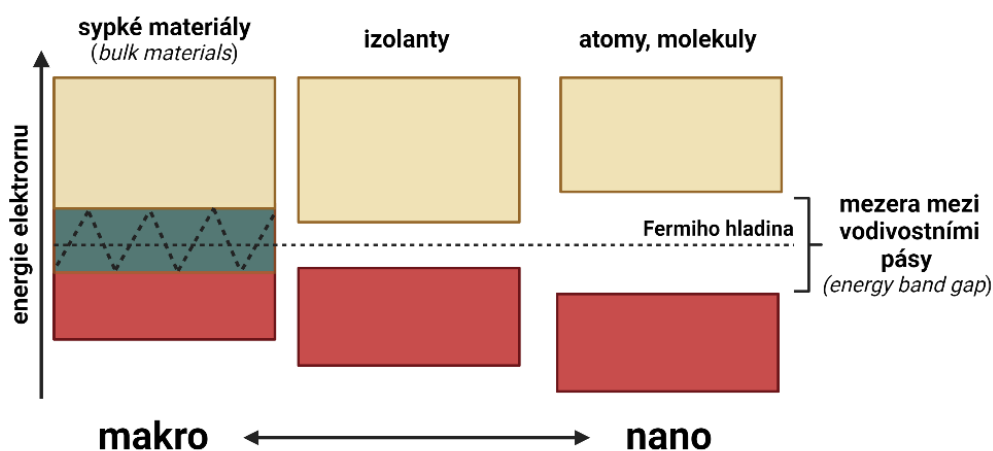
Vzhledem k omezenému množství dostupných dat o indukci a průběhu BS při PPTT má tato práce za cíl poskytnout aktuální přehled těchto mechanismů. Porozumění těmto procesům je zásadní pro možné budoucí klinické využití PPTT, neboť umožňuje optimalizaci této terapeutické metody a minimalizaci vedlejších účinků léčby.

2. Nanomateriály a nanočástice

2.1 Definice nanotechnologie a nanomateriálů

Nanotechnologie je obor zaměřující se na manipulaci s materiály a strukturami v měřítku nanometrů. Podle Slovníku cizích slov pochází předpona „nano” z řeckého původu nanos, což v překladu znamená „trpaslík” (Klimeš 1983). Jako nanometr se rozumí jedna miliardtina metru. V porovnání s materiály a strukturami, které se nacházejí v makro-měřítku, disponují odlišnými chemickými a fyzikálními vlastnostmi, a to ze dvou důvodů: 1) nanomateriály mají velký specifický povrch, což způsobuje jejich chemickou reaktivitu a také ovlivňuje jejich vysokou pevnost či elektrické vlastnosti a 2) kvantové jevy dominují v chování nanomateriálu tak, že ovlivňují jejich optické, elektrické a magnetické vlastnosti (Roduner 2006).

Materiály jsou struktury složené z atomů. Interakce mezi atomy sypkých materiálů (*bulk materials*) vyúsťuje v distribuci vodivostních pásů. Atomy, které spolu interagují, tvoří husté vodivostní pásy, což vede k jejich eventuálnímu překrytí a elektrony se tak mezi nimi mohou volně pohybovat, jak lze vidět na Obr. 1, vlevo. Naopak materiál s rozměry v nanoměřítku je tvořen méně atomy, a tak jsou mezery mezi jejich vodivostními pásy mnohem větší než u sypkých materiálů, znázorněno na Obr.1 vpravo. Za takových podmínek se optické



Obr. 1: Distribuce vodivostních pásů v různých materiálech. Změny velikosti mezer mezi vodivostními pásy materiálů se snižujícím se počtem atomů v systému (zleva doprava), obrázek převzat z publikace od Roduner et al 2006 a přepracován v *BioRenderu*.

a elektrické vlastnosti nanomateriálů liší od vlastností makro-objektů a jejich elektronová struktura začíná připomínat elektronovou strukturu atomu.

Fermiho hladina je úroveň energie, která představuje nejvyšší energetický stav v krystalické struktuře, který ještě lze obsadit elektrony. Poloha této hladiny rozlišuje, zdali se jedná o kov, izolant, nebo polovodič. Mezery mezi vodivostními pásy představují minimální energii, která je potřebná pro excitaci valenčních elektronů. Zvětšování mezery mezi vodivostními pásy se označuje jako kvantové omezení (*quantum confinement*) a pro jeho dosažení musí být alespoň jeden rozměr materiálu v nanoměřítku (Roduner 2006).

Většina definic stanovuje hranici nanoměřítku mezi 1–100 nm (Kreyling et al. 2010; Alkilany et al. 2012). Nano-vlastnosti materiálů se však nemění nebo nezanikají přesně mimo tento interval. Například podle G. Kreyling et al nelze přesně horní rozměrovou hranici nanomateriálu stanovit, kvůli nezanedbatelnosti specifického povrchu částic. Skupina místo toho navrhuje alternativní definici, podle které je nanomateriálem objekt, jehož objemově specifický povrch je roven nebo přesahuje $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ objemu materiálu (Kreyling et al. 2010).

2.2 Rozdělení nanomateriálů

Nanomateriály lze obecně dělit podle různých kritérií. Podle materiálu, ze kterých jsou vyrobeny, je dělíme na 1) kovové nanomateriály, do kterých se řadí hlavně nanočástice (NPs) a nanotyčky (NRs) vyrobené ze vzácných kovů jako jsou zlato, stříbro, platina nebo měď, 2) oxidy kovů, kterými jsou nanomateriály na bázi oxidu železa (Fe_3O_4) nebo oxidu titanu (TiO_2), 3) polovodičové nanomateriály zahrnující kvantové tečky o průměru obvykle v rozmezí od dvou do deseti nanometrů (10 -50 atomů), 4) nanomateriály na bázi uhlíku, jako jsou grafen, uhlíkové nanotrubičky a nanodiamanty a na 5) biopolymerní/organické nanočástice a supramolekulární struktury (Kumar et al. 2023).

Nanomateriály dále rozdělujeme na 2D, 1D a 0D. Toto označení udává, kolik rozměrů objektu se nenachází v nanoměřítku. 2D materiály, např. tenké vrstvy (*thin films*), mají alespoň jeden rozměr v intervalu nanoměřítku. Do skupiny 1D materiálů, jejichž alespoň dva rozměry jsou v intervalu nanoměřítku, se řadí např. nanotrubičky (*nanotubes*), nanodráty (*nanowires*) a nanovlákná (*nanofibres*). 0D materiály, typicky nanočástice (*nanoparticles*), mají všechny tři rozměry v intervalu nanoměřítku (Kumar et al. 2023).

2.3 Syntéza a úpravy nanočástic

Existuje mnoho metod syntézy nanočástic, které rozdělujeme do dvou velkých skupin: top-down a bottom-up. Bottom-up syntéza využívá fyzikálních a chemických přístupů pro samouspořádání menších elementů (molekul či atomů) do větších struktur, a děje se v roztoku

za přítomnosti redukčních činidel. Top-down syntéza naopak využívá postupy, jako jsou litografie, leptání nebo mletí, k eliminaci větších kusů materiálu na nano-objekty. Top-down syntéza je méně častá kvůli vysokým nákladům, časové náročnosti a nutnosti speciálních a finančně náročných přístrojů. Bottom-up syntézu lze naopak modifikovat pomocí mnohých chemických přístupů, a tak ji za definovaných podmínek provádět i v nesespecializovaných laboratořích. Výsledkem syntézy jsou ideálně nanočástice o identické velikosti, chemické kompozici i krystalické struktuře, které jsou rozptýlené a netvoří aglomeráty (Christian et al. 2008; Scarabelli et al. 2015).

3. Plasmonická fototermální terapie (PPTT) a využití AuNPs

Současné neselektivní terapeutické přístupy, jako je chemoterapie a radioterapie, jsou sice účinné proti nádorovým buňkám, mají ale vysokou toxicitu vůči zdravým tkáním. Toxicita vede k mnohým vedlejším účinkům jako jsou nevolnost, zvracení, průjemy, vypadávání vlasů, horečka, nebo poškození ústní sliznice. Při užití klasických nádorových terapií je také velké riziko vzniku sekundárních nádorů. Komplikace související s konvenčními onkoterapiemi posilují potřebu vývoje specifických postupů a léčiv, které slibují vyšší účinnost a hlavně rapidní snížení počtu vedlejších účinků (Altun and Sonkaya 2018).

PPTT představuje moderní terapeutický přístup slibující několik významných výhod, včetně minimální invazivity a specifity. PPTT využívá nanoskopických kovových materiálů, zejména zlatých nanočástic (AuNPs), které na rozdíl od nekovových nanočástic disponují výjimečnými optickými a fyzikálními vlastnostmi jako jsou lokalizovaná povrchová plasmonová rezonance (*localized surface plasmon resonance*, LSPR) elektronů na povrchu nanočástic a fototermální efekt. Tyto dvě vlastnosti nachází uplatnění v PPTT, kde slouží k cílené destrukci nádorové tkáně za vytvoření lokální hypertermie, indukované zahřátím nádorových buněk obsahujících nanočástice. V historii výzkumu bylo pro terapeutické účely a PPTT zkoumáno mnoho kovových nanočástic, avšak AuNPs se prokázaly být zdaleka nejnadějnějšími, především díky jejich vynikající biokompatibilitě, jednoduché a levné syntéze, možnosti modifikace povrchu a ladění jejich optických a fyzikálních vlastností během syntézy (Kelly et al. 2003; Pérez-Hernández et al. 2015).

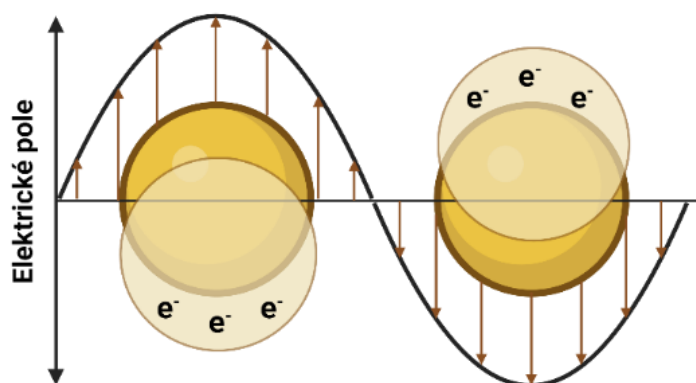
3.1 Zlaté nanočástice (AuNPs)

3.1.1 Hlavní charakteristiky AuNPs

Zmíněná LSPR a fototermální efekt představují dvě fundamentální charakteristiky kovových nanomateriálů, jež stojí v centru pozornosti zkoumání jejich užití v praxi. Společně tyto dva jevy přispívají ke konverzi zářivé energie na energii tepelnou prostřednictvím absorpce

elektromagnetického záření a k následnému zvýšení teploty ozařovaného materiálu (Kelly et al. 2003; Pérez-Hernández et al. 2015).

V důsledku kolektivní oscilace elektronů ve vodivostním pásu, které jsou excitovány po vybuzení energetickým zdrojem (např. elektromagnetické záření), na povrchu kovové částice vzniká struktura nazývaná povrchový plasmon (*surface plasmon*, SP). Je-li povrchový plasmon excitován na povrchu kovové nanočástice (1-100 nm) o velikosti srovnatelné s vlnovou délkou dopadajícího záření (≥ 400 nm), volné elektrony účastníci se kolektivních oscilací jsou v pohybu omezeny, a v takovém případě o tzv. lokalizovaném povrchovém plasmonu (*localized surface plasmon*, LSP). Elektromagnetické vlny dopadajícího záření jsou zachycovány na kovovém povrchu díky jejich interakci s volnými elektrony. Za určitých podmínek (při určité frekvenci záření a úhlu jeho dopadu) dochází k rezonanci mezi oscilujícími elektrony a dopadajícím zářením. Kombinovaná excitace složená z lokalizovaného povrchového plasmonu a elektromagnetického pole dopadajícího světla na povrchu kovových nanočástic se nazývá lokalizovaná povrchová plasmonová rezonance (*localized surface plasmon resonance*; LSPR) (Burda et al. 2005), kterou znázorňuje Obr. 2.



Obr. 2 Znázornění lokalizované povrchové plasmonové rezonance (LSPR). Dopadající elektromagnetické záření zapříčiňuje excitaci elektronů na povrchu AuNP v důsledku čehož vzniká LSP. Pokud jsou excitované elektrony AuNPs v konkrétní rezonanční frekvenci s dopadajícím zářením, dochází k jevu LSPR a absorpce záření je pak velmi silná. Obrázek převzat z publikace od Kelly et al 2003 a vytvořen v *BioRenderu*.

Fototermální efekt je důsledkem absorpce energie elektromagnetického záření (typicky z VIS/NIR oblasti) materiálem či látkou za následné tvorby tepla. Energie z absorbovaných fotonů je přenášena na molekuly materiálu, čímž se zvyšuje jejich kinetická energie, a tak i teplota materiálu. Pokud dochází k excitaci elektronů v konkrétní rezonanční frekvenci nanočástic, jsou absorpce světla a následný fototermální efekt řádově zesíleny. Dopadající elektromagnetické záření není nanočásticí kompletně absorbováno, ale jeho část je rozptýlena do okolí (tzv. Rayleighův rozptyl). Rozptýlené záření, které dosahuje frekvence,

jako záření dopadající, lze využít pro zobrazování AuNPs v biologických systémech (Kelly et al. 2003; Pérez-Hernández et al. 2015).

3.1.2 Velikost a tvar AuNPs a ladění jejich optických a fyzikálních vlastností

Nano-vlastnosti nanočástic závisí především na jejich velikosti, materiálu a tvaru. Tyto proměnné parametry lze ovlivnit například změnami teplot během syntézy. Tak lze navodit určité syntetické jevy, které vedou k tvorbě různých tvarů nanočástic. Takovým jevem je například splynutí dvou různých krystalizačních domén, čehož je typicky využíváno při syntéze nanočástic z kovů a oxidů kovů. Tvorbu syntetických jevů během růstu je možné ovlivňovat také stabilizačními činidly jako jsou halogenidové ionty, chloridy nebo bromidy.

Během syntézy AuNPs lze také modifikovat frekvenci LSP pro efektivní absorpci vlnových délek např. v NIR (*near infrared*) oblasti spektra, které jsou optimální pro využití v PPTT, protože v porovnání se zářením jiných vlnových délek nejlépe prostupují tkáněmi. Třemi hlavními typy AuNPs absorbujícími NIR záření, které se v současné době testují, jsou nanoslupky (*gold nanoshells*, AuNSs), zlaté nanotyčky (*gold nanorods*, AuNRs) a zlaté nanokostky (*gold nanocages*, AuNCs). Konkrétně lze jejich absorpční vlnovou délku upravit změnou tloušťky zlaté obalové vrstvy (v případě AuNSs a AuNCs), nebo změnou poměru mezi velikostí příčné a podélné strany nanočástice (v případě AuNRs) (Link and El-Sayed 1999; Prodan et al. 2003).

3.1.3 Povrchové modifikace AuNPs

Syntéza AuNPs obvykle probíhá v roztoku za přítomnosti redukčních činidel podle různých syntetických metod, jako jsou například Turkevichova metodaⁱ, nebo růst z krystalizačního jádraⁱⁱ. Tyto metody využívají surfaktant, jehož účelem je stabilizace nanočástic a zabránění tvorbě agregátů. Nejčastěji využívanými surfaktanty jsou citrát sodný a CTAB (cetyl(trimethyl)amonium-bromid), avšak v důsledku jejich nekovalentní asociace s nanočásticí při užití *in vivo* vykazují takto připravené AuNPs vysokou cytotoxicitu (Qiu et al. 2010). Disociovaná molekula CTABu může reagovat s komponenty biologického prostředí, a tak navozovat cytotoxický stres. Pro další užití AuNPs je tedy nezbytné původní surfaktant nahradit kovalentně vázanou molekulou, což lze provést jeho přímou výměnou za analog nesoucí thiolovou funkční skupinu. Výsledkem je radikální snížení toxických vlastností AuNPs (Niidome et al. 2006; Zarska et al. 2018).

ⁱTurkevichova metoda je založená na redukci prekurzoru kovu kyseliny tetrachlorozlatité (HAuCl₄) pomocí redukčních činidel (citrát sodný), kdy citrát ze soli redukuje zlaté kationty, které se následně shlukují do zlatých atomů (John Turkevich et al. 1951).

ⁱⁱMetoda růstu z krystalického jádra využívá k růstu nanočástic krystalizační jádra (*seeds*), která slouží jako nukleační centra katalyzující redukci atomů zlata na jejich povrchu (Gole and Murphy 2004).

3.1.3.1 PEGylace

Jednou z často využívaných povrchových modifikací nanočástic je výměna CTABu za thiolový polyethylenglykol (PEG). PEG je lineární hydrofilní polymer skládající se z opakujících se jednotek ethylen glykolu. PEGylované AuNPs (tj. AuNPs s kovalentním připojením PEGu) vykazují téměř neutrální náboj, což výrazně zvyšuje jejich retenční dobu a cirkulaci v organismu prostřednictvím omezení nespecifických interakcí s retikuloendoteliálním systémem, imunitními buňkami, krevními buňkami a proteiny (Niidome et al. 2006; Ernsting et al. 2013).

3.1.3.2 MTAB

Nekovalentní asociaci CTAB s AuNPs lze dále nahradit např. kovalentním ukotvením jeho přímého thiolového analogu, (16-merkaptohexadecyl)trimethylamonium-bromidu (MTABu) (Vigderman et al. 2012). Díky této substituci jsou výsledné nanočástice stabilní a mají kladný náboj, což usnadňuje jejich následné pohlcení buňkami (Zarska et al. 2016). Snazší internalizace kladně nabitých AuNPs probíhá prostřednictvím jejich interakcí se záporně nabitými a vysoce sulfatovanými postranními řetězci proteoglykanů na plazmatické membráně (PM) buněk (Payne et al. 2007).

3.2 Průběh terapie

Postup terapie lze rozdělit na čtyři hlavní kroky, a to na 1) syntézu nanočástic, 2) zavedení nanočástic do oblasti nádoru, 3) lokální ozáření nádoru laserovým zdrojem o příslušné vlnové délce a 4) pozorování reakce nádorových buněk a remisi nádoru.

1) Syntéza AuNPs většinou probíhá podle výše zmíněných bottom-up metod. Nasyntetizované AuNPs jsou následně povrchově modifikovány podle zvolené strategie jejich pronádorového cílení. 2) Zavedení nanočástic do těla pacienta lze provést buď injekčně přímo do nádorové tkáně nebo intravenózně, kdy je akumulace nanočástic v nádorových buňkách zajištěna díky tzv. efektu zvýšené permeability a retence buněk (*enhanced permeability and retention*, EPR efekt) cévního zásobení nádoru. Díky rychlému a nerovnoměrnému růstu cév je cévní systém nádoru velmi neuspořádaný a má vyšší míru poréznosti ve srovnání s normální tkání. ERP efekt tedy umožňuje preferenční akumulaci chemoterapeutik, nebo také nanočástic, v nádorové tkáni (Madea H 2001). 3) Díky LSPR a fototermálnímu efektu lze v nádorové tkáni, která obsahuje AuNPs, vytvořit po ozáření laserem o frekvenci korespondující s frekvencí oscilujících elektronů na povrchu nanočástic, hypertermické prostředí. 4) Na hypertermické prostředí buňky následně reagují spuštěním buněčné smrti, kterou lze detekovat pomocí biopsie buněk a histopatologické analýzy (Ali et al. 2016; Ali et al. 2019).

3.3 Výhody a nevýhody PPTT

3.3.1 Výhody PPTT

Mezi běžně klinicky užívané metody pro léčbu zhoubných nádorů řadíme chirurgický zákrok, chemoterapii a radioterapii. Nicméně tyto metody nejsou vždy efektivní, vzhledem k vlastnostem nádorových buněk, které dokážou nabývat nových mutací, vyvíjet se v čase či metastázovat. Chirurgický zákrok spolehlivě odstraní pouze makroskopicky viditelnou část nádoru. Nádorové buňky neopouzdřených ložisek mohou být roztroušeny i do okolní zdravé tkáně. Samostatnou otázkou je pak odstranění mozkových nádorů, např. glioblastomu, kdy je chirurgický zákrok sám o sobě značným rizikem. Účinky chemoterapie a radioterapie jsou neselektivní a působí i na buňky zdravé tkáně, což způsobuje vážné a četné vedlejší účinky léčby. V neposlední řadě dlouhodobé působení chemoterapií a opakované dávky iradiace mohou vést ke ztrátě citlivosti rakovinných buněk k této léčbě a zároveň neřeší případy již chemo-/radiorezistentních buněk (Pattani et al. 2015; Zhang et al. 2018).

Výše vyjmenované jsou pouze ta nejdůležitější úskalí, proč se moderní výzkum a medicína soustředí na vývoj nových terapeutických přístupů pro efektivní léčbu rakoviny. Hlavní potenciální výhody PPTT jsou neinvazivita a specifita, které spočívají v lokálním ozáření konkrétního místa, kde se nádor nachází. Užití externího laseru, který je schopný prostupovat okolní nenádorovou tkáň slibuje šetrnější odstranění nádorové masy a zároveň umožní redukovat nutnost odstranění zdravé tkáně obklopující nádorové ložisko. Pro lepší cílení léčby lze AuNPs také modifikovat připojením specifických protilátek či aptamerů, a to buď prostřednictvím kovalentní vazby, anebo pasivní adsorpce (Ali et al. 2017). Specifitu terapie lze dále zvýšit cílením nanočástic pomocí mezenchymálních kmenových buněk (*Mesenchymal Stem Cells*, MSC) obsahujících AuNPs. MSC migrují do nádorového prostředí a mohou sloužit jako nosiče pro cílené podávání léčiv do izolovaných nádorů nebo metastáz (Gao et al. 2013). Protože PPTT indukuje BS vyvoláním fyzikálního stresu, může zároveň aktivovat prozánětlivou reakci buněk, která může být v určité míře žádoucí pro stimulaci protinádorové imunitní odpovědi. V teoretické rovině pak pro PPTT neexistuje omezení na konkrétní typ nádoru, mohla by proto představovat perspektivní “univerzální” terapii pro různé druhy nádorových onemocnění (Ali et al. 2019).

3.3.2 Nevýhody PPTT

Pro klinickou aplikaci PPTT je nezbytné, aby AuNPs nepředstavovaly žádná zdravotní a ekologická rizika. S novou metodou léčby se však pojí možnost projevení neznámých vedlejších účinků při *in vivo* aplikaci, které často nelze pozorovat při *in vitro* experimentech.

Aktuálně chybí dostatečné záznamy o dlouhodobém osudu AuNPs v biologickém systému. Ačkoliv jsou AuNPs biokompatibilní a chemicky inertní, nejsou však biologicky odbouratelné. Výsledky dosavadních studií ukazují, že spíše než samotné zlato obsažené v nanočásticích, to jsou jejich parametry jako je velikost, tvar, náboj, povrchové modifikace a dávkování (koncentrace), které mají vliv na jejich toxicitu (Tong et al. 2007; Chen et al. 2009; Oh et al. 2011; Muñoz et al. 2016; Ali et al. 2019).

Dlouhodobé chování nanočástic v živém organismu je současným předmětem studií. Některé z nich ukazují, že toxicita AuNPs je přímo úměrná jejich velikosti. V případě AuNPs s větším průměrem (15-100 nm) byl zaznamenán minimální cytotoxický účinek, na rozdíl od těch s menším průměrem (1-15 nm). To lze přičíst jejich většímu specifickému povrchu, v důsledku čehož mají vyšší pravděpodobnost interakce se svým okolím, a v porovnání s většími nanočásticemi spíše vyvolávají imunitní odpověď (Pan et al. 2007; Park et al. 2011). Ali et al sledovali dlouhodobé účinky AuNPs-PEG o rozměrech 25 x 5,5 nm na xenografní organismus myši s HNSCC. Po 15 měsících po ozáření autoři detekovali akumulaci AuNRs v játrech, ledvinách, slezině a plicích, v těchto tkáních však nebyly prokázány strukturální změny nebo histopatologické abnormality (Ali et al. 2017).

Faktorem ovlivňujícím míru toxicity AuNPs je také jejich surfaktant a povrchový náboj, který má významný vliv na interakci s biologickými povrchy, na míru pohlcování AuNPs buňkou a také na dobu cirkulace v krevním oběhu. Mnoho dostupných studií demonstrující korelaci mezi povrchovým nábojem AuNPs a cytotoxicitou uvádí škodlivé účinky anionických i kationických AuNPs. Například studie publikovaná Schaeublinem et al popisuje chování kladně nabitých, negativně nabitých a neutrálních AuNPs, kdy anionické i kationické AuNPs vykazovaly toxicitu i při relativně nízkých koncentracích (10 mg/mL) (Schaeublin et al. 2011). V jiné studii od Goodman et al je demonstrována mnohem vyšší toxicita kationických nanočástic než u jejich anionických analogů. Jejich toxický účinek je vysvětlován silným přilnutím k PM, což vede k jejímu porušení či ztenčování (Goodman et al. 2004). Žárská et al naopak ve své publikaci popisují výměnu toxického surfaktantu CTABu za netoxický MTAB, který nanočásticím dává kladně nabitý charakter a navzdory vysoké akumulaci nanočástic v buňkách, nebyly pozorovány žádné toxické účinky (Zarska et al. 2018).

Kromě fyzikálně-chemických parametrů je toxicita AuNPs ovlivněna také dávkováním a dobou expozice tkáně NIR záření. Nízké koncentrace AuNPs a krátká doba expozice nejsou spojovány s toxicitou, zároveň mají ale nízkou fototerminální účinnost. Z tohoto důvodu je důležité co nejpřesněji optimalizovat proměnné parametry (tzn. dobu expozice korespondující s koncentrací nanočástic, jejich velikostí a tvarem) tak, aby vyvolaly minimální

cytotoxickou odezvu ve zdravé tkáni a zároveň maximální buněčnou odpověď na termální stres (Ali et al. 2016).

3.4 Klinické studie PPTT

V předešlých letech započalo klinické testování terapie AuroLase, která využívá PEGylované křemičito-zlaté AuNSs s komerčním názvem AuroShell. V období let 2009 až 2016 byla provedena studie zaměřená na obecné sledování vedlejších účinků aplikace nanočástic AuroShell v refrakterních a recidivujících nádorech hlavy a krku (Nanospectra Biosciences 2008). V roce 2016 bylo v USA dále spuštěno klinické testování AuroShell nanočástic na lokalizovaném karcinomu prostaty (Rastinehad et al. 2019). Během trvání studie byly pomocí biopsie prokázány pozitivní výsledky termoterapie na ablaci nádoru. Studie byla proto prodloužena a trvá do současnosti. Terapie AuroLase prozatím prokázala potenciál být účinnou metodou, a to zejména díky cílenému působení na nádor a minimalizaci negativních účinků na okolní tkáň.

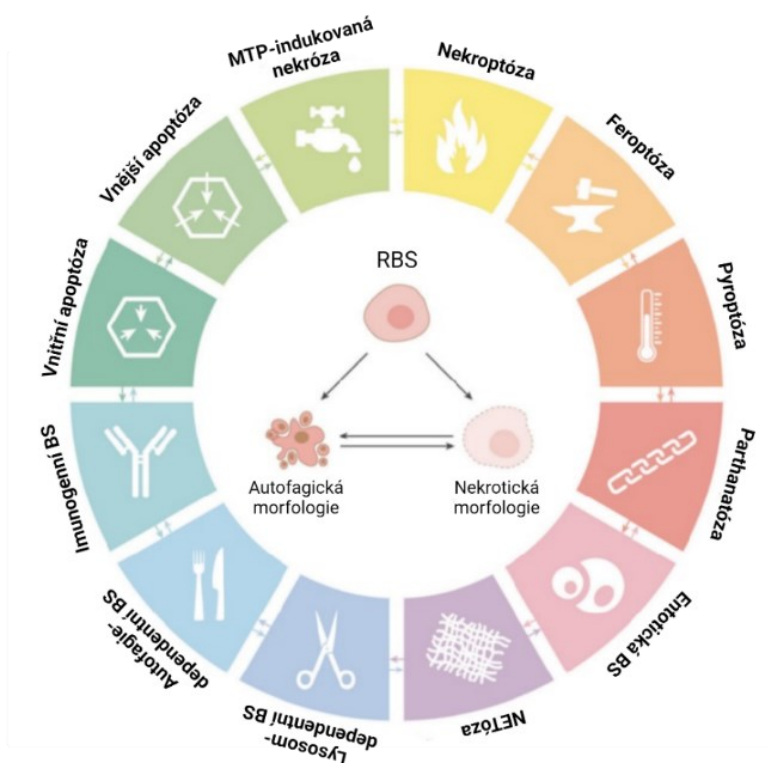
4. Molekulární mechanismy buněčné smrti

Výzkum molekulárních mechanismů BS je intenzivně se rozvíjející oblast vědy zaměřující se na identifikaci BS na molekulární úrovni. Dnes jsou běžně známé formy BS apoptóza (*apoptosis*) a nekróza (*necrosis*). Kromě nich byly pozorovány také další typy, jako například ferroptóza, nekroptóza, NETóza a pyroptóza. Od roku 2005 Nomenklaturní výbor pro buněčnou smrt (*Nomenclature Committee on Cell Death*, NCCD) aktualizuje klasifikace BS do specifických podskupin, jak shrnuje Obr. 3 (Galluzzi et al. 2018).

BS lze rozdělit na základě morfologických znaků, anebo molekulárních mechanismů. Podle starší klasifikace lze rozdělit BS na tři typy, které jsou charakteristické odlišnou morfologií. Jsou jimi apoptóza, autofagická BS a nekróza. 1) Pro apoptózu je typické smršťování cytoplazmy, rozsáhlá kondenzace chromatinu, fragmentace jádra a tvorba váčkovitých výběžků z PM, která zůstává intaktní. Tyto procesy vyúsťují v tvorbu váčků, tzv. apoptotických tělísek, které jsou následně degradovány uvnitř lysozomů okolních fagocytů. 2) Autofagická BS (také buněčné trávení), je proces vnitrobuněčné degradace struktur, kdy jsou části buněčné cytoplazmy (např. poškozené orgány) uzavírány do váčků známých jako autofagozomy, které následně splývají s lysozomy za vzniku autolysozomů. Morfologicky se buňka zásadně nemění, přibývá však počet membránových (autofagických) váčků. 3) Během nekrózy dochází k buněčnému otoku/edému (*cell swelling*), který vede k poškození PM a následnému uvolnění cytoplazmy, včetně jejího proteolytického obsahu, do extracelulární

matrix (ECM), kde negativně ovlivňuje okolní buňky (Galluzzi et al. 2007; Bruce Alberts et al. 2018; Galluzzi et al. 2018).

Na základě molekulárních mechanismů lze BS rozdělit na dvě základní skupiny, a to regulovanou a náhodnou. Podle NCCD patří mezi regulovanou BS (RBS) každá smrt, která je spuštěná molekulární signální kaskádou. To, že je smrt regulovaná neznamena, že způsobuje pouze nezáznětlivou buněčnou odpověď. NCCD mezi RBS řadí apoptózu, nekroptózu, ferroptózu, pyroptózu, parthanatózu, entotickou BS, NETózu, MPT-řízenou nekrozu, BS závislou na autofagii, BS závislou na lysozomech, a další, jak znázorňuje Obr. 3. Je nutné zdůraznit, že se obor vyvíjí a v souvislosti s tím dochází k průběžné aktualizaci tohoto rozdělení (Fuchs and Steller 2011; Galluzzi et al. 2018).



Obr. 3: Hlavní podskupiny rozdělení RBS. Narušení homeostázy vlivem vnějšího nebo vnitřního stresu vede k aktivaci různých molekulárních signálních drah, které následně způsobují zánik buňky některou z uvedených BS. Každý z těchto druhů RBS je iniciován specifickými molekulárními mechanismy, které avšak vykazují jistou míru propojení. Kromě různých molekulárních mechanismů se RBS projevují různými morfologickými znaky. Obrázek byl převzat z publikace od Galluzzi et al. 2018 a přepracován v *BioRenderu*.

4.1 Buněčná smrt indukovaná v rámci aplikace PPTT

Výzkum účinků PPTT za použití AuNPs zahrnuje analýzu vlivu terapie na nádorové buňky a jejich mikroprostředí. Aktuálně se studie zaměřují především na identifikaci vnitrobuněčných cílových destinací AuNPs, nastavení různých fyzikálních podmínek ozařování a na detekci a

charakterizaci indukovaných BS. Sledování indukce BS se provádí *in vitro* na různých buněčných modelech, což má za následek značnou variabilitu výsledků různých studií.

AuNPs jsou do buněk internalizovány prostřednictvím endocytózy a následně se do cílových destinací uvnitř buňky dostávají endocytickou transportní dráhou. Bylo pozorováno, že AuNPs se v závislosti na své velikosti dostávají do jádra, nebo jsou lokalizovány v endosomech (Nativo et al. 2008), mitochondriích (Mkandawire et al. 2015), na PM (Tong et al. 2007) a ve velké míře také v lysozomech (Chen et al. 2010; Zarska et al. 2016). Za určitých okolností (internalizace do buněk pomocí lipozomů, nebo pokud jsou modifikovány peptidy penetrujícími membránu) mohou být AuNPs lokalizovány také volně v cytoplazmě (Nativo et al. 2008). Vnitrobuněčná lokalizace AuNPs přímo ovlivňuje iniciaci typu BS, protože umístění AuNPs v buňce je oblastí prudkého zvýšení teploty, a to vede k iniciaci BS prostřednictvím různých vnitřních stresových stimulů (Pérez-Hernández et al. 2015).

Bylo také pozorováno, že iniciaci různých typů BS lze modulovat prostřednictvím regulace podmínek nastavených během laserového ozařování. Zjevným cílem je najít takové parametry PPTT, které by preferenčně indukovaly nezářlivý proces odstranění nádorových buněk. Na druhé straně se v souvislosti s PPTT také diskutuje téma indukce protinádorové imunity, která by potenciálně mohla být aktivována zánětlivou smrtí nádorových buněk (Odion et al. 2021). Reakce buněk na ozáření je však komplexní a závisí zejména na množství a internalizaci AuNPs, intenzitě a době ozáření nádorové tkáně, stejně jako na množství absorbované energie a jejím rozptylu (Pérez-Hernández et al. 2015).

V rámci aplikace PPTT byly identifikovány různé typy BS včetně apoptózy, nekrózy, nekroptózy a NETózy, BS závislé na autofagii, a také BS závislé na lysozomech (Chen et al. 2010; Pérez-Hernández et al. 2015). Následující kapitoly předkládají jejich přehled.

4.2 Apoptóza

Apoptóza je typ RBS, který je klíčovým procesem v mnohobuněčných organismech, podílejícím se na embryonálním vývoji, regulaci imunitního systému nebo běžné obměně buněk v tkáních. Disregulace této dráhy má za následky např. vývoj nádorových a autoimunitních onemocnění. Během apoptózy dochází v buňce k charakteristickým morfologickým a biochemickým změnám. Patří mezi ně smrštění buňky, kolaps cytoskeletálních struktur, rozpad jaderného obalu, kondenzace chromatinu a jeho rozpad na menší fragmenty. Na povrchu buňky se objevují váčkovité výrůstky původem z PM (*membrane blebbing*), které se posléze formují do tzv. apoptotických tělísek. Tyto postupující změny minimalizují poškození a zánět v okolních tkáních, protože nedochází k vyelití cytoplazmy do

ECM. Molekuly na povrchu apoptotických tělísek signalizují okolním buňkám a buňkám imunitního systému o nutnosti jejich eliminace.

Apoptotická signální dráha je zprostředkována štěpicími enzymy nazývanými proteázy. Ve svém aktivním místě obsahují cystein a substrátovou molekulu štěpí v oblasti kyseliny asparagové, jsou proto nazývané kaspázy (*caspases* – C jako cystein a Asp jako kyselina asparagová). V buňce jsou kaspázy syntetizovány jako neaktivní prekurzory a jsou aktivovány proteolytickým štěpením. Dle posloupnosti působení rozlišujeme iniciační a exekuční pro-kaspázy. Po přijetí signálu pro iniciaci apoptózy, iniciační pro-kaspázy a adaptorové proteiny společně vytváří aktivační komplexy, kde dochází ke vzájemnému štěpení. Takto aktivované iniciační kaspázy dále štěpí exekuční pro-kaspázy, které ve své aktivní formě štěpí další exekuční pro-kaspázy, ale hlavně cílové proteiny, jako jsou například jaderné laminy, inhibiční proteiny DNA endonukleázy nebo adhezivní proteiny. Kaspázová kaskáda může být aktivována 1) vnější apoptotickou cestou (*extrinsic apoptosis*), nebo 2) vnitřní apoptotickou cestou (*intrinsic apoptosis*), které se mezi sebou liší na úrovni aktivních iniciačních pro-kaspáz a aktivačních komplexů, ale také prvotním signálem pro iniciaci (Galluzzi et al. 2007; Pop et al. 2007; Bruce Alberts et al. 2018). Zjednodušené schéma vnější a vnitřní apoptotické dráhy je znázorněno na Obr. 4.

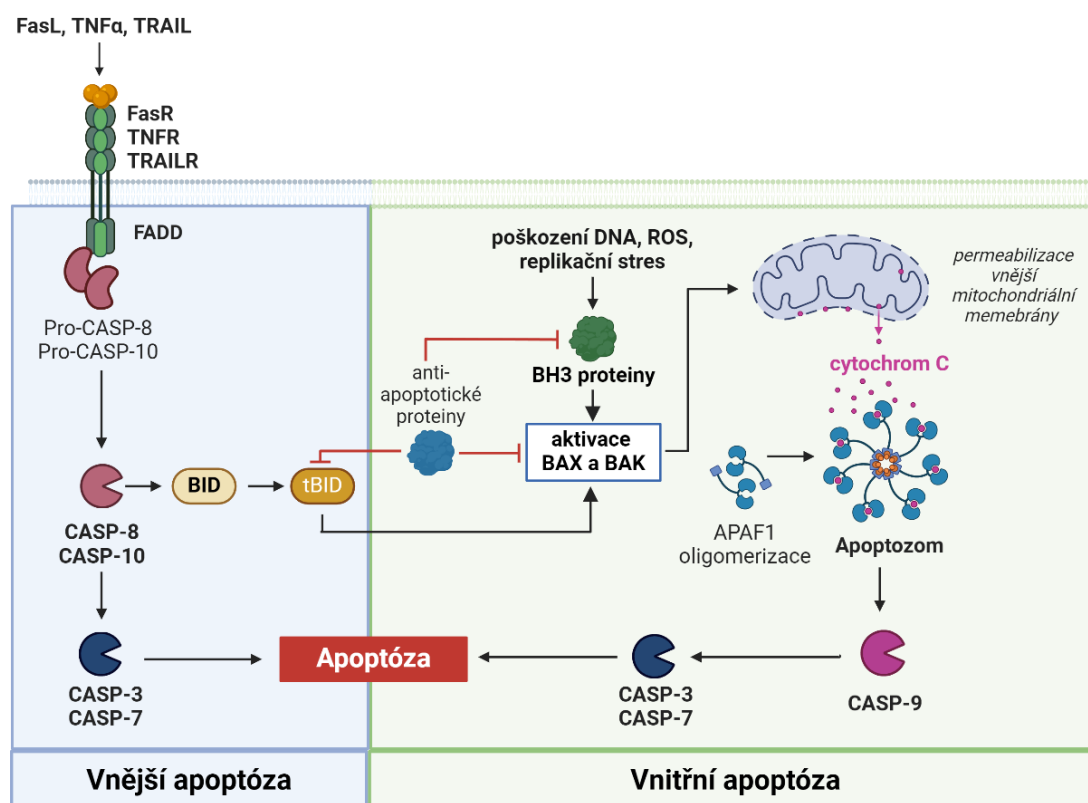
Vnější dráha apoptózy je iniciována vazbou extracelulárního signálního ligandu na extracelulární doménu transmembránového receptoru PM buňky. Rozlišujeme receptory smrti (*death receptors*) a receptory dependence (*dependence receptors*) (Orlinick et al. 1999; Gaur and Aggarwal 2003; Bredesen et al. 2005). Mezi receptory smrti se řadí FAS receptory a receptory super-rodiny proteinů TNF (*tumor necrosis factor*), konkrétně TNFR1 a TRAILR1/2 (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Receptor1/2*). Po vazbě ligandu nastává konformační změna intracelulární části receptoru, která umožňuje interakci adaptorových proteinů a sestavení DISC komplexu (*death inducing signaling complex*), na kterém dochází k aktivaci iniciačních pro-kaspáz CASP8 a CASP10. Iniciační pro-kaspázy dále štěpí exekuční pro-kaspázy CASP3 a CASP7, které propagují apoptotickou odpověď. Protože je aktivace této signální dráhy závislá na těchto receptorech a extracelulárních ligandech, je její iniciace v souvislosti s PPTT velmi nepravděpodobná.

Regulace dráhy vnější apoptózy se děje pomocí intra- nebo extracelulárně působících proteinů, jako je protein cFLIP, který kompetuje o vazebná místa na DISC komplexu s iniciačními pro-kaspázami. Vazba ligandu na receptor smrti nemusí nutně znamenat propagaci BS, v určitých podmínkách nasává aktivace NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) signální kaskády prostřednictvím CASP8, která vyúsťuje v rozsáhlou zánětlivou odpověď a přežití

buňky (Orlinick et al. 1999; Kischkel et al. 2000; Gaur and Aggarwal 2003; Pérez-Hernández et al. 2015; Bruce Alberts et al. 2018).

Vnitřní dráha apoptózy je iniciována porušením homeostázy buněčného mikroprostředí, a tak je aktivace tohoto typu BS po aplikaci PPTT mnohem pravděpodobnější. V buňce je tato forma BS indukována v důsledku poškození DNA, akumulace reaktivních forem kyslíku (*reactive oxygen species*, ROS), replikačního stresu nebo defektů během mitotického dělení buňky. Spouštění vnitřní apoptózy se děje uvolněním mitochondriálních proteinů, typicky cytochromu c (cyt c), které se za fyziologických podmínek nachází v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Cyt c po uvolnění do cytosolu asociuje s adaptorovým proteinem Apaf1 (*apoptotic protease activating factor-1*), což následně vede k oligomazaci a tvorbě heptamerových struktur. Heptamerový komplex se nazývá apoptozóm a slouží k rekrutaci a aktivaci iniciačních pro-kaspáz, zejména CASP9, které dále propagují signální kaskádu aktivací exekučních pro-kaspáz CASP3 a CASP7.

Uvolnění cyt c z mezimembránového prostoru mitochondrií je regulováno proteiny z rodiny Bcl2, jež působí buď pro- nebo anti-apoptoticky. Tyto proteiny mají strukturální homologii, kdy sdílí jednu až čtyři homologické domény. Pro- a anti-apoptotické varianty



Obr. 4: Zjednodušené schéma vnější a vnitřní dráhy apoptózy. Vnější dráha apoptózy začíná vazbou ligandu na receptor smrti a pokračuje aktivací iniciačních a exekučních pro-kaspáz vyúsťující v BS. Vnitřní dráha apoptózy začíná aktivací pro-apoptotických BH3-*only* proteinů a pokračuje uvolněním cyt c do cytosolu za následného formování apoptozomu, který slouží jako lešení pro aktivaci kaspázové kaskády vedoucí k apoptóze. Obrázek byl vytvořen v *BioRenderu*.

proteinů společně heterodimerizují a vzájemně se tak inhibují a regulují svoje působení. Rovnováha mezi aktivitou těchto dvou skupin Bcl2 proteinů určuje, zdali bude buňka žít, nebo bude iniciována vnitřní apoptotická dráha. Regulační pro-apoptotické proteiny z rodiny Bcl2 se rozdělují na BH123 proteiny a BH3-*only* proteiny. Nejznámějšími BH123 proteiny jsou BAX (*Bcl2 associated X*) a BAK (*Bcl2 antagonist/killer*). BAX a BAK proteiny podstupují aktivaci pomocí BH3-*only* proteinů (např. pomocí proteinu BID), kdy v aktivní formě vytváří homodimery, které oligomerizují a formují v membráně mitochondrie póry, které zapříčiňují její permeabilizaci. Skrze tyto póry dochází k translokaci proteinů původně lokalizovaných v mezimembránovém prostoru mitochondrií do cytosolu, kde se účastní dalších interakcí vyústujících v apoptózu (Bruce Alberts et al. 2018).

4.2.1 Apoptóza indukovaná aplikací PPTT

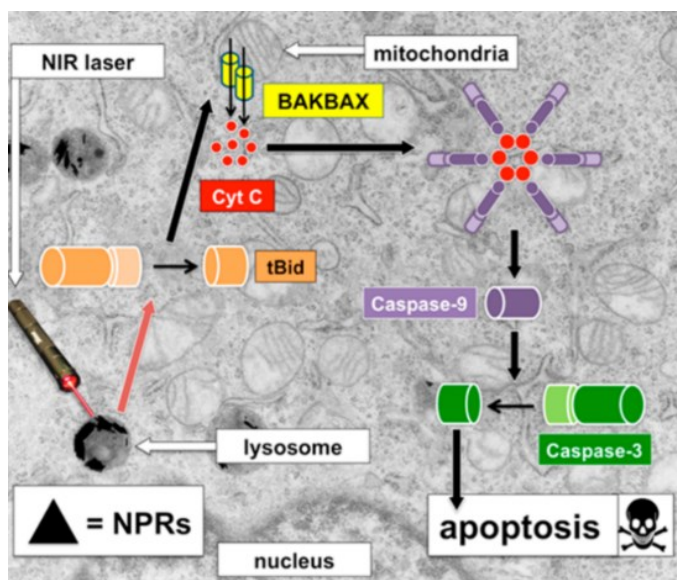
Pérez-Hernandez et al v roce 2015 ve své studii sledovali mechanismus indukce BS v ozářených buňkách myších fibroblastů (*mouse embryonic fibroblasts*, MEF). Zaměřili se zejména na identifikaci molekulárních mechanismů indukce BS a odlišení apoptózy a sekundární nekrózy. V *in vitro* experimentech nelze imitovat identické podmínky jako v *in vivo* prostředí s buňkami, které mají fagocytární aktivitu a později pohlcují apoptotická tělíska. Proto lze *in vitro* sledovat fenomén sekundární nekrózy, kdy buňky, které původně odumřely apoptózou, ztrácí integritu membrány a jeví se jako nekrotické.

Pro identifikaci BS v ozářených MEF byly použity markery 7-Aminoactinomycin D (7AAD) a Annexin V (AnnV). 7AAD je markerem nekrózy, který prostupuje pouze narušenou PM a integruje se do DNA. AnnV je naproti tomu markerem apoptózy díky jeho specifické vazbě na fosfatidylserin (PS), který je v důsledku apoptózy exponován na vnější straně PM. Translokaci PS z vnitřní na vnější část PM však nelze považovat za typický apoptotický znak, protože nastává jako důsledek indukce i jiných, na molekulární úrovni odlišných, RBS (de Vasconcelos et al. 2019). Pro jasný důkaz přítomnosti apoptózy byla proto sledována také aktivace CASP3.

MEF inkubovali s PEGylovanými AuNPs trojúhelníkového tvaru konjugované s molekulami glukózy. Následně byly buňky ozářeny laserem o intenzitě 5 W/cm² po dobu 30 sekund, 2, 4 a 10 minut. Buňky ozařované 30 sekund měly 18 hodin po ozáření výhradně apoptotický charakter, naproti tomu buňky ozařované po dobu 10 minut byly apoptotické 1 hodinu po ozáření a staly se sekundárně nekrotickými 5 hodin po ozáření. Buňky ozářené 2 minuty laserem o vyšší intenzitě (30 W/cm²) ihned po ozáření odumíraly nekrózou. Tyto výsledky prokazují, že indukci BS lze regulovat prostřednictvím různé doby ozáření a intenzitou ozařovacího zdroje.

Dále autoři usilovali o identifikaci konkrétního molekulárního mechanismu spouštějícího apoptózu, a to prostřednictvím MEF mutantů s umlčenou expresí genů klíčových pro apoptotickou signální kaskádu (konkrétně BAK, BAX, BID, CASP3 a CASP9). Po ozáření byla indukce BS porovnána s divokým typem (*wild type*, WT) MEF, které 5 hodin po ozáření vykazovaly apoptotický charakter. Všichni MEF mutantů byli za stejných podmínek vůči apoptóze zcela rezistentní, což naznačuje, že do procesu aktivace apoptotické signální dráhy jsou zapojeny proteiny CASP3, CASP9 a protein BID, který aktivuje proteiny BAX a BAK. Tento mechanismus byl potvrzen v ozářených buňkách pozorováním signifikantního úbytku neštěpené formy proteinu BID a detekcí nárůstu jeho štěpené formy.

V návaznosti na tyto výsledky autoři navrhnou cestu aktivace přes vnitřní dráhu apoptózy skrze štěpení BH3-*only* proteinů pomocí uvolnění lysozomálních enzymů, viz Obr. 5. Pomocí konfokální mikroskopie a transmisní elektronové mikroskopie (TEM) Hernandez et al pozorovali, že před ozářením se AuNPs nacházely výhradně v lysozomech. Avšak již po jedné hodině od ozáření lze sledovat přítomnost AuNPs v cytosolu, po 5 hodinách je lokalizace AuNPs v lysozomech velmi nepatrná. To lze vysvětlit hypotézou, že po ozáření dochází k permeabilizaci lysozomální membrány, což vede k uvolnění nanočástic společně s dalším lysozomálním obsahem, jako jsou katepsiny, do cytoplazmy. Tyto enzymy pak mohou proteolyticky aktivovat protein BID a propagovat apoptotickou signální dráhu (Pérez-Hernández et al. 2015).

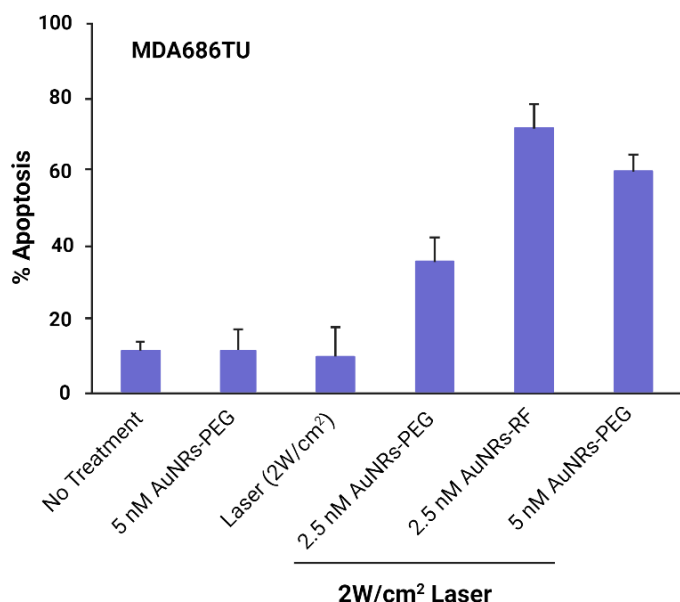


Obr. 5: Navrhovaný mechanismus indukce apoptózy aplikací PPTT. Po ozáření MEF buňky odumírají apoptózou prostřednictvím aktivace proteinu Bid, která iniciuje oligomerizaci Bak a/nebo Bax ve vnější mitochondriální membráně. V té je následně vytvořen pór umožňující uvolnění molekul z mezimembránového prostoru mitochondrií, včetně cyt c, který následně iniciuje aktivaci apoptózy. Obrázek je součástí publikace od Pérez-Hernandez et al. 2015.

Detekci apoptózy ve své publikaci z roku 2017 popisují také Ali et al. Jejich experimenty měly za cíl optimalizovat velikost, povrchové modifikace a koncentraci AuNRs pro maximální indukci apoptotické BS, a také pozorovat rozdíly v efektivitě indukce apoptózy PEGylovaných AuNRs a AuNRs konjugovaných s rifampicinem (AuNR-RF). Pro ozařování

použili laser o výkonu 2 W/cm^2 . Oba typy AuNRs byly inkubovány s buněčnou linií MDA686TU v různých koncentracích. AuNR-RF v koncentraci 2,5 nM AuNR-RF vykazovaly dvojnásobnou účinnost oproti PEGylovaným AuNRs, jak znázorňuje graf na Obr. 6, a ukázaly se tak být v této studii pro indukci apoptózy nejúčinnějšími. Apoptóza byla potvrzena vizualizací štěpených proteinů CASP3 a PARP (*poly-ADP ribose polymerase*) na imunoblotu.

Dále autoři testovali účinnost PPTT *in vivo* na myších modelech. Signifikantní redukce růstu nádoru byla pozorována v případě AuNRs-RF o koncentraci 2,5 nM a ozáření tkáně laserem o výkonu 2 W/cm^2 . Kvantitativní proteomická analýza ozářených nádorů identifikovala aktivaci drah souvisejících s apoptózou (granzym B, fosforylace BAD, kaspázová kaskáda). Výsledky získané z této analýzy byly porovnány se signálními procesy v kontrolních nádorech neozařených myší. Byla zjištěna rapidně zvýšená exprese proteinů cyt c a Apaf-1. Tyto proteiny vedou k aktivaci iniciátorových kaspáz (např. CASP9), které následně aktivují exekuční kaspázy (např. CASP3) (Ali et al. 2017).



Obr. 6: Porovnání indukce apoptózy za užití různých koncentrací AuNRs s odlišnými povrchovými modifikacemi. Nejúčinnější indukce apoptózy byla detekována při užití 2,5 nM AuNR-RF, kdy byla pozorována skoro dvojnásobná účinnost než při užití AuNR-PEG. Apoptotické buňky byly identifikovány jako AnnV pozitivní. Graf je součástí výsledků prezentovaných v publikaci od Ali et al. 2017.

4.3 Nekróza

Nekrotická BS je typicky popisována jako náhodná a neregulovaná, avšak může mít určité regulační mechanismy, jako například MPT-řízená nekróza (*Mitochondrial Permeability Transition*, MPT). Nekróza je vyvolána fyzikálními a chemickými stresy, včetně hypoxie, ischemie, hypoglykémie, extrémními změnami teplot nebo deprivace živin. V důsledku těchto faktorů dochází například ke zvýšení intracelulární hladiny vápníku a tvorbě reaktivních forem kyslíku (*Reactive Oxygen Species*, ROS), které následně přímo poškozují PM či alterují buněčný metabolismus a bioenergetiku, což nakonec vyvolá nekrotickou smrt. Vysoká koncentrace vápenatých iontů v cytosolu vede k přetížení mitochondrií, což má negativní

následky na bioenergetický metabolismus buňky. ROS svým reaktivním charakterem poškozují lipidy, proteiny a DNA, zapříčiňují poškození mitochondrií a porušení membránové integrity (Halestrap et al. 1997; Nakagawa et al. 2005; Halestrap 2006). Morfologicky se tyto efekty projevují buněčným bobtnáním, prasknutím PM a vylitím obsahu buňky do ECM. V konečném stádiu nekrózy jsou z buněk uvolňovány prozánětlivé molekuly jako jsou *heat shock* proteiny, histony nebo cytokiny, které následně signalizují o nekrotické události okolním buňkám (Pattani et al. 2015).

4.3.1 Nekróza indukovaná aplikací PPTT

Chen et al ve své studii v roce 2010 zkoumali indukci BS prostřednictvím PPTT aplikací různých intenzit laseru. Pro experimenty použili AuNRs konjugované s polystyren sulfonátem (AuNR-PSS) o průměrném poměru stran tyček 3,92. Inkubace AuNR-PSS s buňkami myšího nádoru mléčné žlázy (buněčná linie EMT-6) byla následovaná jejich ozářením dvou-fotonovým laserem o různých intenzitách (18, 28, 56 a 93 mJ/cm²).

Pro detekci BS autoři použili fluorescenční barvy YOPRO-1 a propidium jodid, které jsou také vhodné pro hodnocení integrity buněčných membrán. YOPRO-1 vstupuje do buněčné cytoplazmy i při mírné zvýšení propustnosti PM, zatímco propidium jodid zůstává mimo buňky. Avšak při výrazně zvýšené propustnosti membrány proniká do buněk i propidium jodid.

Při užití intenzity laseru 93 mJ/cm² dochází téměř okamžitě k jakýmsi intracelulárním „mikroexplozím“, které buňku okamžitě usmrtí. Proces destrukce je iniciován onkózou (= tj. otokem a koagulací cytoplazmy), která je doprovázena tvorbou váčkovitých výrůstků z PM a zvýšenou permeabilitou membrány. „Mikroexploze“ jsou dále zodpovědné za perforaci a tvorbu kavit v PM velkých až 10 μm, což následně zapříčiňuje kompletní rozrušení PM. Duální barvení jádra prokazuje, že BS nastala po 4 minutách u takto ozářených buněk. Při ozáření buněk nižší intenzitou (56 mJ/cm²) byly pozorovány mírnější vnitřní „mikroexploze“. Při užití intenzity 28 mJ/cm² byly „mikroexploze“ stále pozorovatelné, avšak buňky získávaly nekrotický charakter až po 16 minutách od ozáření. Výsledky studie také dokazují, že indukce BS závisí nejen na intenzitě ozáření, ale také na množství AuNRs internalizovaných do buňky. Při ozáření buněk laserem o intenzitě 18 mJ/cm², buňky s nízkým obsahem AuNR-PSS neodumřely ani 1462 sekund po ozáření. Naopak při užití stejné intenzity a vyšší koncentrace AuNR-PSS bylo, navzdory předchozímu výsledku, zřejmé výrazné bobtnání buněk, tvorba bublin a významná tvarová deformace buněk již 240 sekund po ozáření (Chen et al. 2010). Tyto výsledky podporují důležitost testování proměnných parametrů terapie.

Tong et al v roce 2007 testovali PPTT pomocí AuNRs konjugovaných s folátem (AuNRs-F), které inkubovali s KB buňkami (podtyp buněčné linie HeLa). Pozorovali stádia

internalizace AuNRs-F do buněk, kdy detekovali transport AuNRs-F směrem k jádru a k PM. Nekrotická BS byla prokázána pomocí ethidium bromidu, který potvrdil narušení membránové integrity. Kromě toho, bylo také zřejmé bobtnání a otoky buněk, což jsou znaky typické pro nekrózu. Studie dále prokazuje, že míra buněčného poškození ozářením závisí na lokalizaci nanočástic v rámci buňky v době ozáření. Buňky obsahující F-AuNRs internalizované do vnitrobuněčného prostoru vyžadovaly pro získání nekrotického charakteru výkon laseru 60 mW, zatímco buňky s F-AuNRs navázanými na membráně pouze výkon 6 mW. Autoři efektivnější poškození buněk při nižší intenzitě ozáření odůvodňují teorií, že prvotní akumulace F-AuNRs na PM soustředí fototermální účinky do omezené oblasti, což poskytuje přímé a tak nejrychlejší poškození PM. Nakonec zdůrazňují, že relativně nízká tepelná vodivost buněčné membrány může přispívat k větším teplotním gradientům, což může vést k intenzivnějším hypertermickým účinkům (Tong et al. 2007).

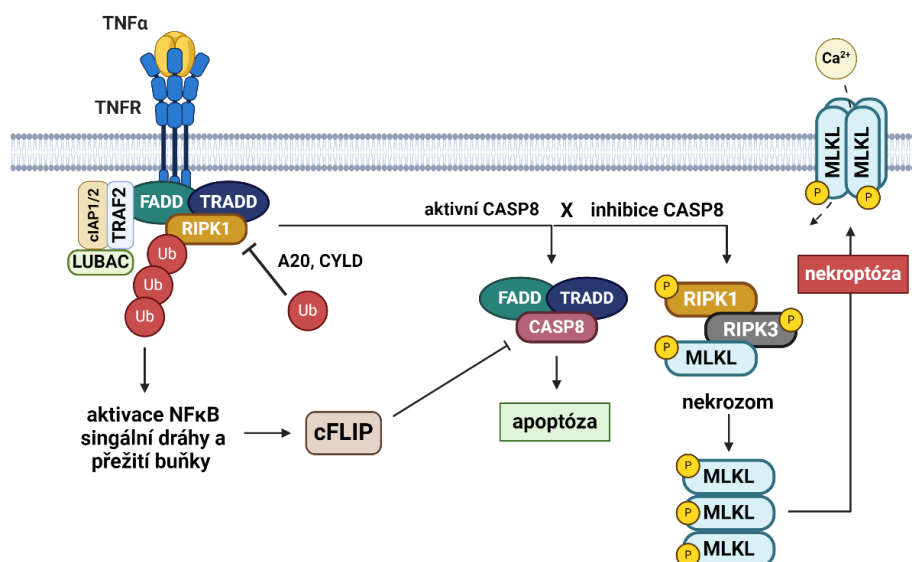
4.4 Nekroptóza

Nekroptóza, ačkoliv má morfologicky nekrotický charakter, je regulována specifickými molekulárními dráhami a je tedy vhodné ji označovat jako podtyp RBS. Tato forma BS může být iniciována jak vnějšími stimuly (vazbou TNF α , TRAIL ligandů), tak vnitřními stresovými podněty. Přenos stresových signálů je zprostředkován receptory smrti, přičemž TNFR1 představuje nejprozkoumanější dráhu transdukce signálu. Molekulární indukce nekroptózy pak zásadně závisí zejména na aktivitě kinázy RIPK3 (*Receptor Interacting Protein Kinase 3*) a MLKL (*Mixed Lineage Kinase domain-Like pseudokinase*). Jedním z hlavních rozdílů mezi nekroptózou a apoptózou je schopnost nekroptózy vyvolat silnou imunitní odpověď (Murphy et al. 2013).

Stimulace TNFR1 receptoru vazbou TNF molekuly vede k vytvoření komplexu proteinů, který se skládá z TRADD, TRAF2 (*TNF-receptor-associated factor 2*), RIPK1 a buněčných inhibitorů apoptózy cIAP1/2 a LUBAC (*inhibitor of apoptosis 1/2, linear ubiquitin chain assembly complex*). Budoucí osud buňky následně závisí na posttranslačních modifikacích RIPK1. Buď proteiny cIAP1/2 a LUBAC polyubiquitínují RIPK1, což zajišťuje následnou aktivaci MAPK (*mitogen activated protein kinase*) signálních drah, které vedou ke zvýšení exprese genů prozánětlivé odpovědi a přežití buňky (Cho et al. 2009). Anebo je RIPK1 deubiquitínována např. proteinem A20 (*TNF- α -induced protein 3*) (Onizawa et al. 2015) či CYLD (*Cylindromatosis*), které se účastní regulace zánětlivých, tumor-supresorových a imunitních signálních drah buňky (Hitomi et al. 2008). V druhém případě je v cytosolu vytvořen apoptotický komplex zahrnující FADD a CASP8, který následně propaguje apoptotickou BS (Zhang et al. 2019).

Pokud je ale aktivita CASP8 v buňce inhibována, například genetickou nebo farmaceutickou cestou, dochází k asociaci RIPK1 s RIPK3. Tímto způsobem vytváří strukturu nazývanou nekrozóm, který dále propaguje nekroptotickou signální kaskádu. Obě kinázy v tomto komplexu podstupují auto- a transforforylaci, které jsou nezbytné pro jejich aktivaci (Li et al. 2012). Aktivní RIPK3 dále katalyzuje fosforylaci MLKL, což vede k tvorbě oligomerů, často tri- nebo tetramerů, které jsou exponovány na PM a způsobují její permeabilizaci vytvořením pórů a propustných kanálů (Sun et al. 2012).

Na rozdíl od apoptózy, kterou lze zjednodušeně definovat jako BS závislou na aktivaci iniciačních kaspáz, iniciace nekroptózy probíhá zcela nezávisle na kaspázách. Navzdory tomu spolu tyto dráhy sdílí značnou část signálních molekul, což zajišťuje jejich vzájemné propojení a umožňuje komplexní regulaci, která je klíčová pro výslednou buněčnou odpověď. Mezi regulační molekuly těchto procesů patří například protein cFLIP, jehož zvýšená koncentrace umožňuje inhibici apoptózy interakcí s CASP8 v buňkách s aktivní NF- κ B signální dráhou (Feoktistova et al. 2011). Zjednodušené schéma nekroptotické dráhy znázorňuje Obr. 7.



Obr. 7: Zjednodušené schéma nekroptotické dráhy. Vazba TNF α na TNFR1 stimuluje tvorbu komplexu, jehož hlavními složkami jsou FADD, TRAF2, cIAP1/2 a LUBAC. Polyubiquitinace RIPK1 vyúsťuje v aktivaci NF- κ B signální dráhy a přežití buňky. V případě zablokování NF- κ B signální dráhy je vytvořen komplex zahrnující FADD, TRAF2 a CASP8, který následně vede k apoptotické BS. Inhibice aktivity CASP8 vyúsťuje v interakci RIPK1 s RIPK3, které vytváří nekrozóm, kde probíhá fosforylace MLKL, jejíž monomery oligomerizují a následně na PM permeabilizují membránu tvorbou pórů. Obrázek byl vytvořen v *BioRenderu*.

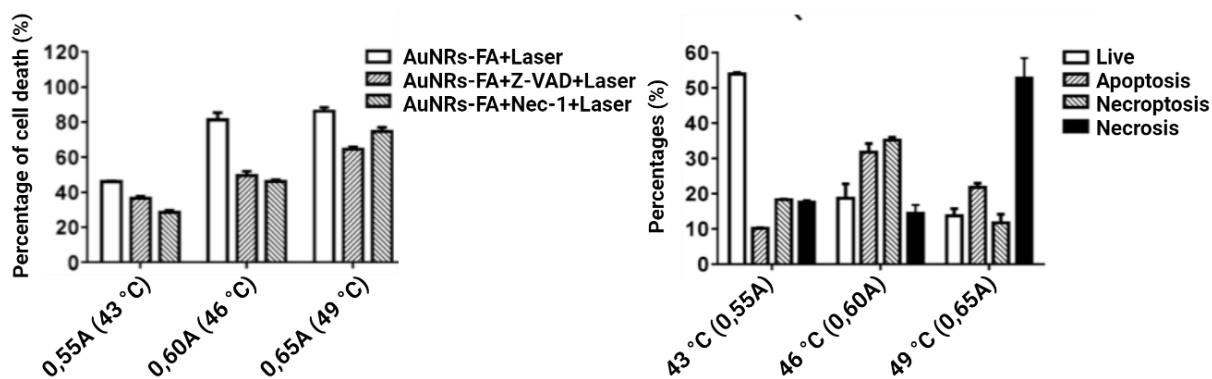
4.4.1 Nekroptóza indukovaná aplikací PPTT

Zhang et al ve své *in vitro* studii v roce 2018 použili AuNRs konjugované s molekulami kyseliny listové (*folic acid*, FA) pro dosažení efektivnější internalizace do buněk izolovaných z myšího melanomu (buněčná linie B16-BL6). Jedním z hlavních cílů studie bylo

prokázat, že indukce BS je teplotně dependentní proces a následně identifikovat mechanismy BS aktivované během ozařování.

Aplikací různých intenzit laseru o vlnové délce 808 nm (laserový výkon 0,956 W, 1,275 W a 1,593 W) zahřívali buňky obsahující AuNRs-FA na nízkou (43 °C), střední (46 °C) a vysokou (49 °C) teplotu po dobu 15 minut. Výsledný graf na Obr. 8 vlevo znázorňuje, že při zahřátí na 43 °C umírá 46,1 % buněk, při zahřátí na 46 °C umírá 81,3 % buněk a při zahřátí na 49 °C umírá 86,3 % buněk. Následně byly indukované BS v ozařovaných buňkách identifikovány pomocí specifických inhibitorů signálních drah apoptózy (Z-VAD, syntetický inhibitor kaspáz) a nekroptózy (Necrostatin-1, inhibitor RIPK1). Předpokladem pro rozlišení BS je, že po zablokování konkrétními inhibitory bude pozorován úbytek odumírajících buněk. Po zablokování nekroptotické signální dráhy se procento odumírajících buněk po jejich ošetření PPTT skutečně významně snížilo při teplotě 43 °C z 46,1 % na 28,5 %, při teplotě 46 °C z 81,3 % na 46,2 % a při teplotě 49 °C z 86,3 % na 74,6 %.

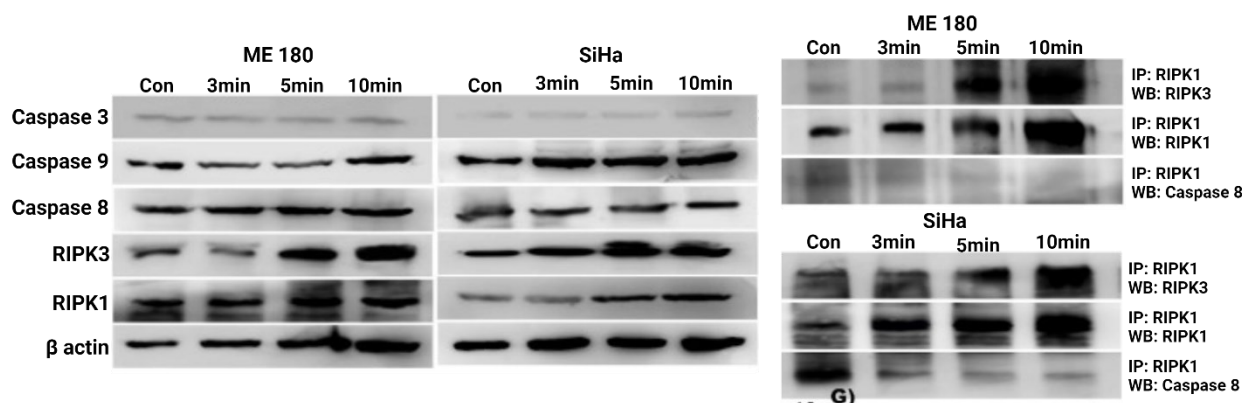
Obr. 8 vpravo znázorňuje zahřívání buněk obsahujících AuNRs-FA na tři teplotní hladiny a příslušné procento buněk odumírajících danou BS. Po zahřátí na 43 °C více než polovina buněk přežila (53,9 %). Po zahřátí na 46 °C bylo detekováno 18,7 % živých, 31,8 % apoptotických, 35,1 % nekroptotických a 14,4 % nekrotických buněk. Za použití teploty 46 °C tedy buňky umírají především prostřednictvím nekroptózy a apoptózy. Po zahřátí buněk na 49 °C byly indukovány zejména nekróza (52,8 %) a minoritně také apoptóza. Obecně z těchto výsledků lze shrnout, že indukce BS v ozařovaných buňkách je teplotně závislý proces a indukci jednotlivých BS lze regulovat intenzitou ozařovacího zdroje (Zhang et al. 2018).



Obr. 8: Indukce různých typů BS v závislosti na teplotě. Graf vlevo srovnává procento mrtvým buněk po ošetření PPTT bez inhibice signální dráhy (AuNRs-FA+Laser), s inhibicí apoptózy (AuNRs-FA+Z-VAD+Laser) a inhibicí nekroptózy (AuNRs-FA+Nec-1+Laser). Z grafu je patrná jasná korelace mezi zvyšováním teploty a BS. Při inhibici apoptotické a nekroptotické dráhy lze vidět úbytek odumírajících buněk oproti ozáření buněk kontrolních s AuNRs-FA, avšak bez inhibitoru. Graf vpravo představuje procento živých, apoptotických, nekroptotických a nekrotických buněk po aplikaci PPTT. Grafy jsou součástí výsledků publikovaných od Zhang et al. 2018.

Parida et al v roce 2017 pozorovali indukcii nekroptotické BS při aplikaci PPTT na nádorových buňkách děložního čípku (buněčná linie SiHa a ME180), které inkubovali s 10 µg/mL AuNRs vložených do blokované kopolymerové micely (*AuNR-block copolymer micelle*, AuNR-BCPM) složené z PEGu a lipové a folátové kyseliny. Buňky byly následně ozářeny laserovou diodou o výkonu 4 W po dobu 3, 5 a 10 minut.

Následná analýza experimentů zahrnovala identifikaci mRNA, imunoprecipitační metody a zobrazení proteinů na imunoblotu. Klíčovými komponenty nekroptotické signální dráhy jsou RIPK1, RIPK3 a MLKL, jejichž mRNA hladiny byly vizualizovány pomocí polymerázové řetězové reakce spojené s reverzní transkripcí (RT-PCR), která ukázala jejich lineární růst v závislosti na době ozáření. Pro případnou identifikaci byly pomocí imunoblotu, společně s proteiny RIPK1 a RIPK3, vizualizovány také CASP3, CASP8 a CASP9, které jsou typické pro apoptotickou signální dráhu. Na rozdíl od signifikantně narůstající intenzity zón RIPK1 a RIPK3, u žádné z kaspáz není zřejmá změna intenzit v žádném kroku ozařování, jak ukazuje Obr. 9, vlevo. Pro potvrzení formace nekrozonu a interakce proteinů RIPK1 a RIPK3, byl z lyzátu ozářených buněk imunoprecipitován protein RIPK1. Následně byl proveden imunoblot ko-immunoprecipitačních proteinů RIPK3 a CASP8. Evidentní tvorba nekrozonu byla potvrzena díky jasně zvýšené expresi RIPK3 při prodlužování délky ozáření, byla také pozorována zvýšená exprese RIPK1. Naopak u obou testovaných buněčných linií byla pozorována pouze zanedbatelná exprese kontrolní CASP8, viz Obr. 9, vpravo (Parida et al. 2017). Tyto výsledky prokazují přítomnost nekroptotické BS po aplikaci PPTT.



Obr. 9: Imunoblot znázorňující expresi kaspáz a komponent nekroptotické signální dráhy v buňkách po aplikaci PPTT. Vlevo: detekce významného nárůstu hladin RIPK3 a RIPK1 po ošetření buněk. Vpravo: ko-immunoprecipitace RIPK1, RIPK3 a CASP8 pro potvrzení formace nekrozonu. Výsledky experimentů prezentovali ve své publikaci Parida et al. 2017.

4.5 Buněčná smrt závislá na autofagii

Autofagie je řízený proces vnitrobuněčného trávení, při kterém je cytoplazmatický materiál uzavřen do cytosolických váčků a dopraven do lysozomů k jejich degradaci. Po uzavření váčku

vzniká struktura nazývaná autofagozom, která následně splývá s lysozomem za vzniku autolysozomu, ve kterém je obsah degradován lysozomálními enzymy. Jednou z úloh autofagie je podpora přežití buněk ve stresových podmínkách nebo v situacích s omezenou dostupností živin, a to prostřednictvím recyklace důležitých buněčných komponent (Denton a Kumar 2019).

Autofagie je evolučně konzervovaný proces kódovaný a regulovaný geny spojenými s autofagií (*autophagy-related genes*, Atg) (Tsukada a Ohsumi 1993). Iniclace autofagie vyžaduje Atg1/ULK (*Unc-51-like kinase*) komplex (Mizushima 2010), jehož funkcí je přenášet signály indukující rekrutaci proteinů nezbytných pro tvorbu autofagozomů, jako je například protein LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*). Poslední fází tvorby autofagozomu je inserce lipidovaného Atg8 do autofagozomální membrány, což vede k vytvoření uzavřeného autofagozomálního váčku.

Protože je autofagie pro buňku přirozený proces, a navíc může být aktivní současně s indukcí jiných BS, rozlišení její specifické role při zprostředkování BS je obtížné. Nicméně je známo, že molekulární mechanismy autofagie přispívají k buněčnému zániku v různých vývojových a patofyziologických situacích, a proto je na místě BS závislou na autofagii rozlišovat. Existují tři hlavní situace, kde se uplatňuje role autofagie v souvislosti s BS: 1) autofagie asociovaná s BS, kdy se objevuje jako doprovodný fenomén BS, 2) autofagie zprostředkovaná BS, kterou lze pozorovat v opačném kontextu, kdy autofagie samotná indukuje apoptózu a 3) na BS závislá na autofagii, která probíhá nezávisle na apoptóze nebo nekróze (Denton a Kumar 2019).

4.5.1 Buněčná smrt závislá na autofagii indukovaná aplikací PPTT

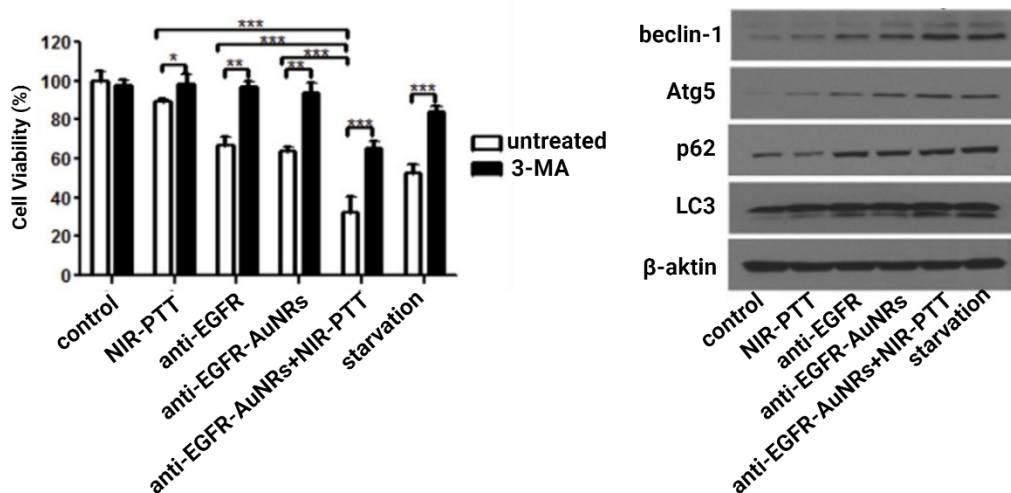
Zhang et al v roce 2017 sledovali reakci na ozáření u TNBC buněk (*Triple Negative Breast Cancer cell line*), které inkubovali s AuNRs konjugovanými s anti-EGFR protilátkou (anti-EGFR-AuNPs). Buňky byly předem inkubovány buď s inhibítorem autofagie 3-methyladeninem (3-MA), nebo bez něj a následně ozářeny laserem o výkonu 1,5 W/cm² po dobu 3 minut. Po aplikaci PPTT byla provedena analýza životaschopnosti všech skupin různě ošetřených buněk, jak je znázorněno na Obr. 10, vlevo.

Buňky inkubované bez 3-MA zřetelně odumíraly, zatímco u buněk pre-inkubovaných s inhibítorem autofagie byla pozorována významná redukce cytotoxicity a celkový úbytek odumřelých buněk, což naznačuje přítomnost na autofagii závislé BS. Pro podpoření těchto výsledků byl pomocí imunofluorescence vizualizován protein LC3, jehož vysoká hladina byla zřejmá u buněk inkubovaných s anti-EGFR protilátkami, anti-EGFR-AuNRs a anti-EGFR-AuNRs+NIR-PTT. Kromě fluorescenční vizualizace byly provedeny imunoblotty proteinů, které se účastní autofagických procesů (beclin1, Atg5, LC3 a p62), viz Obr. 10, vpravo. Oproti

kontrolám byl nárůst intenzity zón zaznamenán u všech detekovaných proteinů v buňkách inkubovaných s anti-EGFR protilátkou, anti-EGFR-AuNRs i anti-EGFR-AuNRs+NIR-PTT. Na základě těchto výsledků autoři shrnují, že za těchto podmínek PPTT podporuje na autofagii závislou BS. Součástí studie bylo pozorování účinků terapie na myším modelu. Ozáření buněk obsahujících anti-EGFR-AuNPs způsobilo signifikantní zmenšení velikosti nádoru a následná imunohistochemická analýza, v souladu s předchozími výsledky, potvrdila nárůst exprese proteinů beclin-1 a LC3 (Zhang et al. 2017).

4.6 NETóza

NETotická BS představuje specifický typ RBS, který byl původně identifikován u neutrofilních buněk. Později byl tento typ BS také sledován u dalších buněk hematopoetického původu, jako jsou eozinofily (Yousefi et al. 2008) nebo bazofily (Morshed et al. 2014). V případě NETotické BS buňky vylučují lepkavé sítě, formálně nazývané neutrofilní extracelulární pasti (*Neutrophil Extracellular Traps*, NETs), které obsahují chromatin, granulární a cytoplazmatické proteiny (Metzler et al. 2014). Tvorba NETs může být reakcí buňky na mikrobiální infekci nebo na stimulaci některých z receptorů smrti (např. ligandem IL-18). Termín NETóza by měl být používán pouze v případě, kdy jsou přítomny důkazy o BS, neboť jejich uvolnění automaticky neznamená odumření buňky (Pilszczek et al. 2010).



Obr. 10: Detekce BS závislé na autofagii na nádorových buňkách TNBC. Vlevo: analýza viability různě ošetřených buněk. U buněk pre-inkubovaných s anti-EGFR-AuNPs a ošetřených PTT lze pozorovat významné snížení v počtu odumřelých buněk po podání inhibitoru autofagie 3-MA. Vpravo: imunoblot znázorňující detekci proteinů účastnících se tvorby autofagozomů, obrázky jsou výsledky prezentované v publikaci Zhang et al. 2017.

Přesný molekulární mechanismus vypouštění NETs není zcela objasněn, bylo ale navrženo několik hypotéz o průběhu tohoto procesu. Zdá se, že NETóza a uvolňování NETs jsou závislé na NADPH oxidáze a tvorbě ROS, které hrají klíčovou roli v iniciaci této BS. Z

neutrofilních granul jsou do cytosolu buňky uvolňovány elastázy a myeloperoxidázy (Fuchs et al. 2007), které jsou následně translokovány do jádra, kde jsou proteolyticky aktivní. V jádře degradují histony, a tak způsobují i dekonduzaci chromatinu (Metzler et al. 2014), což vede ke vzniku chromatinových vláken smíchaných s cytoplazmatickými a jadernými komponenty a jejich vytlačování do ECM. Tento proces nakonec vyústí v narušení PM a RBS. Elastázy přítomné v cytosolu také katalyzují proteolýzu F-aktinu, což způsobuje nevratné poškození cytoskeletárních struktur buňky (Fuchs et al. 2007).

4.6.1 NETóza indukovaná aplikací PPTT

V rámci již výše zmíněné studie od Ali et al z roku 2017 (viz kapitola Apoptóza indukovaná aplikací PPTT) byla provedena série *in vivo* experimentů na myších modelech. Dva typy nanočástic (AuNRs-PEG a AuNRs-RF) byly intratumorálně injikovány do xenografního modelu myši s HNSCC. Nejúčinnějšími se pro tento experiment prokázaly být malé AuNRs-RF o koncentraci 2,5 nM ozářené laserem o výkonu 2 W/cm² po dobu 2 minut, kdy byla po 25 dnech od ozáření pozorována signifikantní redukce růstu nádoru bez vážných vedlejších účinků. Po aplikaci PPTT byla provedena analýza proteomu buněk podkožních nádorů ozařovaných myši za účelem sledování zvýšení či snížení exprese proteinů typických pro konkrétní BS. Kromě proteinů hrajících klíčovou roli v apoptotické BS byl v rámci této studie identifikován nárůst celkem devíti proteinů, které se účastní NETotické BS, včetně histonu 2 (H2), histonu 4 (H4), IL-18 a Pin1 (Ali et al. 2017).

4.7 Lysozom-dependentní buněčná smrt

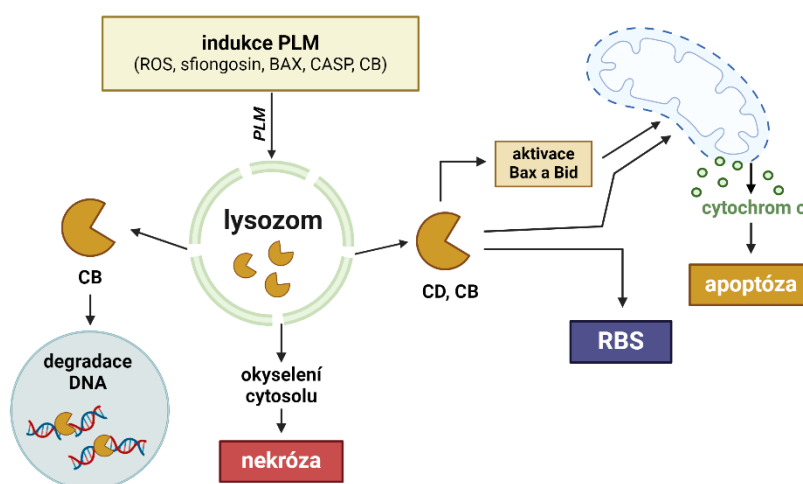
Lysozomy jsou membránové organely nacházející se v cytosolu buněk. Obsahují hydrolytické enzymy jako jsou proteázy, hydrolázy nebo nukleázy, které provádí intracelulární štěpení a recyklaci makromolekul. Tyto enzymatické proteiny obvykle vykazují nejvyšší aktivitu při nízké hodnotě pH, které by bylo, mimo lysozom, pro buňku fatální. V těchto specializovaných buněčných organelách V-ATPáza udržuje pH okolo hodnoty 5 prostřednictvím transportu H⁺ dovnitř lysozomů. Před vlastními hydrolázami je lysozomální membrána chráněná lysozom-specifickými proteiny LAMP-1 a LAMP-2 (*lysosome-associated membrane proteins-1 and -2*), které jsou silně glykosylovány a odolávají proteolytickému štěpení (Chen et al. 1985).

Lysozom-dependentní BS je typem RBS, jehož podstatou je permeabilizace lysozomální membrány (PLM). Aktivace tohoto procesu se děje v odpovědi na stresové podněty jako je stimulace receptorů smrti nebo akumulace ROS. V důsledku zvýšené propustnosti membrány lysozomů se jejich obsah uvolňuje do cytoplazmy buňky, kde

ektopicky přítomné proteolytické enzymy (zejména kathepsiny B, D) štěpí a aktivují proteiny dalších signálních drah, a to včetně kaspáz (Foghsgaard et al. 2001).

Mechanismus indukce PLM zatím není zcela objasněn. Nejznámějším stimulem indukce PLM je akumulace železa v lysozomech. Volné ionty železa hromadí se v lysozomech totiž katalyzují přeměnu peroxidu vodíku na hydroxylové radikály, které následně ničí lysozomální membránu (Terman et al. 2006). PLM může být rovněž indukována akumulací sfingosinu, který se po protonaci hromadí v lysozomech, kde funguje jako detergent (Kah Gedal et al. 2001). Kromě toho byla také, před změnami ve struktuře mitochondrií, pozorována translokace pro-apoptotických proteinů z rodiny Bcl-2 do membrány lysozomů, což následně vyvolalo PLM. To naznačuje, že působení Bcl-2 proteinů na PLM je nezávislé na permeabilizaci mitochondriální membrány (Kah gedal et al. 2005). PLM mohou také indukovat samotné kaspázy, které představují mediátory indukce apoptózy závislé na PLM (Werneburg et al. 2004).

Procesy následující po indukci PLM jsou variabilní, stejně jako mechanismy jejich aktivace a jejich přehled je znázorněn na Obr. 11. Tyto buněčné události závisí na rozsahu PLM a typu stimulu indukujícího BS. V případě masivního narušení lysozomální membrány dochází k prudkému okyselení cytoplazmy a odumření buňky nekrotickou BS (Chen et al. 1985). Naopak částečná či postupná PLM způsobuje uvolnění kathepsinů D a B (CB a CD), které jsou aktivní i při neutrálním cytosolickém pH a mohou štěpit proteiny BAX a BID, a tak spouštět apoptotickou dráhu (Kah Gedal et al. 2001). Kathepsiny mohou také sami indukovat různé typy RBS (Sevenler et al. 2015). CB může být translokován do jádra, kde degraduje DNA (Bröker et al. 2004).



Obr. 11: Lysozom-dependentní BS. Po indukci PLM se do cytosolu buňky uvolňují CB a CD, které mohou způsobovat následující buněčné osudy: 1) CB a CD štěpí proteiny BAX a BID, které následně spouští apoptózu. 2) CB a CD sami indukují jeden z typů RBS a 3) CB je translokován do jádra, kde degraduje DNA. V případě poškození lysozomální membrány dochází k prudkému okyselení cytosolu a odumření buňky nekrotickou BS. Obrázek byl vytvořen v *BioRenderu*.

4.7.1 Lysozom-dependentní buněčná smrt indukovaná aplikací PPTT

Mimo již zmíněné, Pérez-Hernández et al navrhli v kontextu jejich výsledků prezentovaných v kapitole Apoptóza indukovaná aplikací PPTT, hypotézu o lysozom-dependentní BS, která je odůvodněna finální lokalizací a zadržováním AuNPs v lysozomech. V důsledku vytvoření silně hypertermického prostředí pravděpodobně dochází k narušení struktury lysozomálních membrán, a to vede k uvolnění jejich obsahu včetně katepsinů do cytosolu, kde dochází ke štěpení substrátů, např. pro-kaspáz, které dále propagují aktivaci signálních drah pro usmrcení buňky. PLM byla potvrzena daty z TEM, kdy bylo detekováno zřetelné uvolnění AuNPs z lysozomů do cytoplazmy u laserem ošetřených buněk (Chen et al. 2010; Pérez-Hernández et al. 2015).

5. Závěr

Současná onkologická terapie zahrnuje chirurgický zákrok, chemoterapii a radioterapii. Stále je však nutné usilovat o vývoj efektivnějších technologií zejména v oblasti specifity cílení léčby a redukce jejich vedlejších účinků. PPTT je nová perspektivní terapie, která slibuje efektivní a šetrnou léčbu. Využívá fyzikálních a optických vlastností kovových nanočástic, zejména LSPR a fototermálního efektu, díky kterým je možné specifické a lokální ošetření nádoru. Pro efektivní využití PPTT je zásadní pochopit procesy aktivace a průběhu BS, která je iniciována a ovlivňována tímto terapeutickým přístupem, a také jak tyto procesy korelují s parametry ozařování aplikovanými při PPTT. Tato práce analyzuje podstatu terapie, průběh léčby a její dopady, spolu s experimentálními důkazy o její účinnosti. Poskytuje souhrn aktuálních poznatků o pozorovaných typech BS, které byly dosud publikovány v rámci testování PPTT jak *in vitro*, tak *in vivo*.

Zlaté nanočástice se pro účely PPTT ukázaly jako nejefektivnější, a to díky své biokompatibilitě, chemické stabilitě, snadné syntéze a možnosti ladění optických a fyzikálních vlastností. Jejich povrch lze modifikovat, a tak ovlivnit např. míru internalizace do buněk nebo snížit toxicitu. Existující studie dosud nepotvrzují absolutní bezpečnost AuNPs, informují ale o korelaci mezi velikostí AuNPs a toxickými účinky. Dlouhodobé chování AuNPs v živém organismu je předmětem současného a budoucího pozorování.

Nádorové buňky jsou usmrcovány pomocí elektromagnetického záření o vlnových délkách z blízké infračervené oblasti spektra. K identifikaci BS *in vitro* se využívají specifické inhibitory, detekce proteinů na imunoblotu, imunohistochemické a imunohistofluorescenční metody. Bylo prokázáno, že dlouhá doba expozice buněk vysokým intenzitám ozařovacího zdroje zpravidla způsobuje okamžitou nekrotickou smrt, zatímco nižší intenzita a kratší doba expozice (několik sekund až několik minut) vede k postupnému odumírání buněk, nejčastěji

apoptotickou či nekroptotickou BS. Ukázalo se, že typ aktivované BS závisí, mimo výše zmíněné, na koncentraci AuNPs v ozařovaných buňkách. Další typy BS, které byly pozorované při užití různých typů nanočástic, jsou BS závislá na autofagii (anti-EGFR-AuNPs) a NETotická BS (AuNR-RF). Dalším diskutovaným typem je lysozom-dependentní BS, o které lze předpokládat, že sama o sobě může působit nadřazeně jako spouštěč jiných RBS.

Bylo prokázáno, že podmínky užívané při PPTT lze přizpůsobit, a tak navodit požadovanou buněčnou odpověď, která je pro terapii konkrétního onkologického onemocnění nejvhodnější. Nicméně, různé podmínky při aplikaci PPTT a užití různých buněčných modelů komplikují srovnávání a interpretaci experimentů. Identifikace jednotlivých BS a jejich vzájemné odlišení je zároveň komplikováno nesčítelným množstvím vzájemných interakcí těchto signálních drah. Aby se PPTT mohla stát léčebnou metodou, je nezbytné zaměřit se na standardizaci testovacích protokolů, která zajistí konzistentnost a reprodukovatelnost výsledků napříč nezávislými výzkumy. Důležitým aspektem je rovněž pochopení komplexní buněčné odezvy na tuto terapii.

Seznam použité literatury

Ali, M.R.K. et al. 2017. Efficacy, long-term toxicity, and mechanistic studies of gold nanorods photothermal therapy of cancer in xenograft mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(15), pp. E3110–E3118.

Ali, M.R.K., Ibrahim, I.M., Ali, H.R., Selim, S.A. and El-Sayed, M.A. 2016. Treatment of natural mammary gland tumors in canines and felines using gold nanorods-assisted plasmonic photothermal therapy to induce tumor apoptosis. *International Journal of Nanomedicine* 11, pp. 4849–4863.

Ali, M.R.K., Wu, Y. and El-Sayed, M.A. 2019. Gold-Nanoparticle-Assisted Plasmonic Photothermal Therapy Advances Toward Clinical Application. *Journal of Physical Chemistry C* 123(25), pp. 15375–15393.

*Alkilany, A.M., Thompson, L.B., Boulos, S.P., Sisco, P.N. and Murphy, C.J. 2012. Gold nanorods: Their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, pp. 190–199.

Altun, İ. and Sonkaya, A. 2018. The Most Common Side Effects Experienced by Patients Were Receiving First Cycle of Chemotherapy. *Iran J Public Health* 47(8), pp. 1218–1219.

*Bredesen, D.E., Mehlen, P. and Rabizadeh, S. 2005. Receptors that mediate cellular dependence. *Cell Death and Differentiation* 12(8), pp. 1031–1043.

Bröker, L.E., Huisman, C., Span, S.W., Rodriguez, J.A., Kruyt, F.A.E. and Giaccone, G. 2004. Cathepsin B Mediates Caspase-Independent Cell Death Induced by Microtubule Stabilizing Agents in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Research* 64, pp. 27–30.

*Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Kieth Roberts and Peter Walter. 2018. Molecular Biology Of The Cell 5th edition. In: *Molecular Biology Of The Cell 5th edition* . 5th ed. New York: Garland Science, pp. 1115–1129.

*Burda, C., Chen, X., Narayanan, R. and El-Sayed, M.A. 2005. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Reviews* 105(4), pp. 1025–1102.

Chen, C.L. et al. 2010. In situ real-time investigation of cancer cell photothermolysis mediated by excited gold nanorod surface plasmons. *Biomaterials* 31(14), pp. 4104–4112.

Chen, J.W., Murphy, T.L., Willingham, M.C., Pastan, I. and August, J.T. 1985. Identification of Two Lysosomal Membrane Glycoproteins. *The Journal of the Cell Biology* 101(5), pp. 85–95.

Chen, Y.S., Hung, Y.C., Liao, I. and Huang, G.S. 2009. Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Nanoscale Research Letters* 4(8), pp. 858–864.

Cho, Y.S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T.D., Guildford, M. and Chan, F.K.M. 2009. Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell* 137(6), pp. 1112–1123.

*Christian, P., Von Der Kammer, F., Baalousha, M. and Hofmann, T. 2008. Nanoparticles: Structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology* 17(5), pp. 326–343.

Darsajini, A.G., Soleimani, M. and Mirjani, R. 2023. The Combination of Photothermal Therapy and Chemotherapy using Alginate-Modified Iron Oxide-Gold Nanohybrids Carrying Cisplatin. *Journal of Biomedical Physics and Engineering* 13(2), pp. 117–124.

*Denton, D. and Kumar, S. 2019. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death and Differentiation* 26(4), pp. 605–616.

- Ernsting, M.J., Murakami, M., Roy, A. and Li, S.D. 2013. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 172(3), pp. 782–794.
- Feoktistova, M. et al. 2011. CIAPs Block Ripoptosome Formation, a RIP1/Caspase-8 Containing Intracellular Cell Death Complex Differentially Regulated by cFLIP Isoforms. *Molecular Cell* 43(3), pp. 449–463.
- Foghsgaard, L. et al. 2001. Cathepsin B Acts as a Dominant Execution Protease in Tumor Cell Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor. *The Journal of Cell Biology* 153(5), pp. 999–1009.
- Fuchs, T.A. et al. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology* 176(2), pp. 231–241.
- *Fuchs, Y. and Steller, H. 2011. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 147(4), pp. 742–758.
- *Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L. and Kroemer, G. 2007. Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation* 14(7), pp. 1237–1243.
- *Galluzzi, L., Vitale I. et al. 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation* 25, pp. 486–541
- *Gao, Z., Zhang, L., Hu, J. and Sun, Y. 2013. Mesenchymal stem cells: A potential targeted-delivery vehicle for anti-cancer drug, loaded nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 9(2), pp. 174–184.
- *Gaur, U. and Aggarwal, B.B. 2003. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. In: *Biochemical Pharmacology*. pp. 1403–1408.
- Gole, A. and Murphy, C.J. 2004. Seed-mediated synthesis of gold nanorods: Role of the size and nature of the seed. *Chemistry of Materials* 16(19), pp. 3633–3640.
- Goodman, C.M., McCusker, C.D., Yilmaz, T. and Rotello, V.M. 2004. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chemistry* 15(4), pp. 897–900.
- *Halestrap, A.P. 2006. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochemical Society Transactions* 34, pp. 232–237.
- Halestrap, A.P., Woodfield, K.Y. and Connern, C.P. 1997. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *Journal of Biological Chemistry* 272(6), pp. 3346–3354.
- Hitomi, J., Christofferson, D.E., Ng, A., Yao, J., Degtarev, A., Xavier, R.J. and Yuan, J. 2008. Identification of a Molecular Signaling Network that Regulates a Cellular Necrotic Cell Death Pathway. *Cell* 135(7), pp. 1311–1323.
- John Turkevich, B., Cooper Stevenson, P. and Hillier, J. 1951. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discussions of the Faraday Society* 11(2), pp. 55–75.
- Kå gedal, K., Johansson, A.-C., Johansson, U., Heimlich, G., Roberg, K., Wang, N.S. and Jü rgensmeier, J.M. 2005. Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis-involvement of Bax? *International Journal of Experimental Pathology* 86, pp. 309–321.
- Kah Gedal, K., Zhao, M. and Brunk, U.T. 2001. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem. J* 359, pp. 335–343.
- *Kelly, K.L., Coronado, E., Zhao, L.L. and Schatz, G.C. 2003. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *Journal of Physical Chemistry B* 107(3), pp. 668–677.

- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J. and Ashkenazi, A. 2000. Apo2L/TRAIL-Dependent Recruitment of Endogenous FADD and Caspase-8 to Death Receptors 4 and 5. *Immunity* 12, pp. 611–620.
- Klimeš, L. 1983. *Slovník cizích slov*. 2nd ed. Praha: Státní pedagogické nakladatelství n.p. ISBN:14-545-83.
- Kreyling, W.G., Semmler-Behnke, M. and Chaudhry, Q. 2010. A complementary definition of nanomaterial. *Nano Today* 5(3), pp. 165–168.
- *Kroemer, G. et al. 2009. Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation* 16(1), pp. 3–11.
- *Kumar, R., Kumar, M. and Luthra, G. 2023. Fundamental approaches and applications of nanotechnology: A mini review. *Materials Today: Proceedings*.
- Li, J. et al. 2012. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell* 150(2), pp. 339–350.
- Link, S. and El-Sayed, M.A. 1999. Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. *Journal of Physical Chemistry B* 103(40), pp. 8410–8426.
- *Madae Hiroshi. 2001. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Elsevier Science Ltd* 41, pp. 189–207.
- Metzler, K.D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A. and Papayannopoulos, V. 2014. Myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Reports* 8(3), pp. 883–896.
- *Mizushima, N. 2010. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 22(2), pp. 132–139.
- Mkandawire, M.M. et al. 2015. Induction of apoptosis in human cancer cells by targeting mitochondria with gold nanoparticles. *Nanoscale* 7(24), pp. 10634–10640.
- Morshed, M. et al. 2014. NADPH Oxidase-Independent Formation of Extracellular DNA Traps by Basophils. *The Journal of Immunology* 192(11), pp. 5314–5323..
- Murphy, J.M. et al. 2013. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity* 39(3), pp. 443–453.
- Nakagawa, T. et al. 2005. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434(7033), pp. 652–658.
- Nanospectra Biosciences, Inc. 2008. *Pilot Study of AuroLase(tm) Therapy in Refractory and/or Recurrent Tumors of the Head and Neck*. Identifier: NCT00848042.
- Nativo, P., Prior, I.A. and Brust, M. 2008. Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles. *ACS Nano* 2(8), pp. 1639–1644.
- Niidome, T. et al. 2006. PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. *Journal of Controlled Release* 114(3), pp. 343–347.
- Odion, R., Liu, Y. and Vo-Dinh, T. 2021. Plasmonic Gold Nanostar-Mediated Photothermal Immunotherapy. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* 27(5).
- Onizawa, M. et al. 2015. The ubiquitin-modifying enzyme A20 restricts ubiquitination of the kinase RIPK3 and protects cells from necroptosis. *Nature Immunology* 16(6), pp. 618–627.

- *Orlinick, J.R., Vaishnav, A.K. and Elkon, K.B. 1999. Structure and function of Fas/Fas ligand. *International Reviews of Immunology* 18(4), pp. 293–308.
- Pan, Y. et al. 2007. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3(11), pp. 1941–1949.
- Parida, S. et al. 2017. Gold nanorod embedded reduction responsive block copolymer micelle-triggered drug delivery combined with photothermal ablation for targeted cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1861(1), pp. 3039–3052.
- Park, J. et al. 2011. Size dependent macrophage responses and toxicological effects of Ag nanoparticles. *Chemical Communications* 47(15), pp. 4382–4384.
- Pattani, V.P., Shah, J., Atalis, A., Sharma, A. and Tunnell, J.W. 2015. Role of apoptosis and necrosis in cell death induced by nanoparticle-mediated photothermal therapy. *Journal of Nanoparticle Research* 17(1), pp. 1–11.
- Payne, C.K., Jones, S.A., Chen, C. and Zhuang, X. 2007. Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. *Traffic* 8(4), pp. 389–401.
- Pérez-Hernández, M. et al. 2015. Dissecting the molecular mechanism of apoptosis during photothermal therapy using gold nanoprisms. *ACS Nano* 9(1), pp. 52–61.
- Pilszczek, F.H. et al. 2010. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology* 185(12), pp. 7413–7425.
- Pop, C., Fitzgerald, P., Green, D.R. and Salvesen, G.S. 2007. Role of proteolysis in caspase-8 activation and stabilization. *Biochemistry* 46(14), pp. 4398–4407.
- Prodan, E., Radloff, C., Halas, N.J. and Nordlander, P. 2003. A Hybridization Model for the Plasmon Response of Complex Nanostructures. *New Series* 302(5644), pp. 419–422.
- Qiu, Y. et al. 2010. Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials* 31(30), pp. 7606–7619.
- Rastinehad, A.R. et al. 2019. Gold nanoshell-localized photothermal ablation of prostate tumors in a clinical pilot device study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(37), pp. 18590–18596.
- *Roduner, E. 2006. Size matters: Why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews* 35(7), pp. 583–592.
- Scarabelli, L., Sánchez-Iglesias, A., Pérez-Juste, J. and Liz-Marzán, L.M. 2015. A “Tips and Tricks” Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. *Journal of Physical Chemistry Letters* 6(21), pp. 4270–4279.
- Schaeublin, N.M., Braydich-Stolle, L.K., Schrand, A.M., Miller, J.M., Hutchison, J., Schlager, J.J. and Hussain, S.M. 2011. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale* 3(2), pp. 410–420.
- Sevenler, D., Lortlar Ünlü, N. and Ünlü, M.S. 2015. Nanoparticle biosensing with interferometric reflectance imaging. In: *Nanobiosensors and Nanobioanalyses*. Springer Japan, pp. 81–95.
- Song, A.S., Najjar, A.M. and Diller, K.R. 2014. Thermally induced apoptosis, necrosis, and heat shock protein expression in 3D culture. *Journal of Biomechanical Engineering* 136(7).
- *Sudhakar, A. 2009. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy* 01(02), pp. i–iv.
- Sun, L. et al. 2012. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* 148(1–2), pp. 213–227.

- *Terman, A., Kurz, T., Gustafsson, B. and Brunk, U.T. 2006. Lysosomal labilization. *IUBMB Life* 58(9), pp. 531–539.
- Tong, L., Zhao, Y., Huff, T.B., Hansen, M.N., Wei, A. and Cheng, J.X. 2007. Gold nanorods mediate tumor cell death by compromising membrane integrity. *Advanced Materials* 19(20), pp. 3136–3141.
- Tsukada, M. and Ohsumi, Y. 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 333(1–2), pp. 169–174.
- de Vasconcelos, N.M., Van Opdenbosch, N., Van Gorp, H., Parthoens, E. and Lamkanfi, M. 2019. Single-cell analysis of pyroptosis dynamics reveals conserved GSDMD-mediated subcellular events that precede plasma membrane rupture. *Cell Death and Differentiation* 26(1), pp. 146–161.
- Vigderman, L., Manna, P. and Zubarev, E.R. 2012. Quantitative replacement of cetyl trimethylammonium bromide by cationic thiol ligands on the surface of gold nanorods and their extremely large uptake by cancer cells. *Angewandte Chemie - International Edition* 51(3), pp. 636–641.
- Werneburg, N., Guicciardi, M.E., Yin, X.-M. and Gores, G.J. 2004. TNF-mediated lysosomal permeabilization is FAN and caspase 8/Bid dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, pp. 436–443.
- Yousefi, S. et al. 2008. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nature Medicine* 14(9), pp. 949–953.
- Zarska, M. et al. 2016. Two-Step Mechanism of Cellular Uptake of Cationic Gold Nanoparticles Modified by (16-Mercaptohexadecyl)trimethylammonium Bromide. *Bioconjugate Chemistry* 27(10), pp. 2558–2574.
- Zarska, M. et al. 2018. Biological safety and tissue distribution of (16-mercaptohexadecyl)trimethylammonium bromide-modified cationic gold nanorods. *Biomaterials* 154, pp. 275–290.
- Zhang, M., Kim, H.S., Jin, T. and Moon, W.K. 2017. Near-infrared photothermal therapy using EGFR-targeted gold nanoparticles increases autophagic cell death in breast cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 170, pp. 58–64. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.03.025.
- Zhang, X. et al. 2019. Ubiquitination of RIPK1 suppresses programmed cell death by regulating RIPK1 kinase activation during embryogenesis. *Nature Communications* 10(1), pp. 1–15.
- Zhang, Y. et al. 2018. Temperature-dependent cell death patterns induced by functionalized gold nanoparticle photothermal therapy in melanoma cells. *Scientific Reports* 8(1), pp. 1–9.