



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Syntéza a biologická aktivita oxysterolů s modifikovaným

B kruhem

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Eliška Pochylá
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2022

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Eliška Pochylá
Název práce	Syntéza a biologická aktivita oxysterolů s modifikovaným B kruhem
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	<p>Oxysteroly vznikají jako produkty katabolismu cholesterolu v buňkách. Tyto oxidované deriváty cholesterolu obsahují ve své struktuře hydroxylové, keto, epoxidové nebo karboxylové skupiny, umístěné na alfa nebo beta kruhu případně na postranním řetězci. Výzkumy posledních let naznačují, že oxysteroly jsou asociovány s celou řadou onemocnění včetně rakoviny a neurodegenerativních onemocnění.</p> <p>Diplomová práce se zabývá studiem biologické aktivity 17 oxysterolů s modifikovaným B kruhem. Oxysteroly byly podrobeny několika biologickým testům. Byla zkoumána jejich cytotoxická aktivita na nádorových buňkách HeLa a normální buněčné linii RPE-1, odvozené od epitelových buněk sítnice oka. Část práce byla věnována studiu jejich neuroprotektivní aktivity na buňkách SH-SY5Y. Ke studiu byl použit model glutamátem indukované buněčné smrti a barvení propidium jodidem. Na základě získaných výsledků byly vybrány 3 látky, které nejúčinněji snižovaly toxický efekt glutamátu na buňky. S těmito látkami byly provedeny podrobnější testy jejich biologické aktivity.</p>
Klíčová slova	Oxysteroly, neuroprotektce, cytotoxicita
Počet stran	73
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Eliška Pochylá
Title of thesis	Synthesis and biological activity of oxysterols with modified B ring
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D.
The year of presentation	2022
Abstract	<p>Oxysterols are formed as products of cholesterol catabolism in cells. These oxidized cholesterol derivatives has incorporated hydroxyl, keto, epoxide or carboxyl groups in their structure. This groups are located on the alpha or beta ring or on the side chain. Research in recent years suggests that oxysterols are associated with many diseases, including cancer and neurodegenerative diseases. This master thesis deals with the study of biological activities of 17 oxysterols with modified B ring. Oxysterols have been subjected to several biological tests. Their cytotoxic activity was tested on tumor cells HeLa and normal cell line RPE-1 derived from retinal epithelial cells. Part of the work was devoted to the study of their neuroprotective activity on SH-SY5Y cells. A model of glutamate-induced cell death and propidium iodide staining was used for the study. Based on the results, 3 substances were selected for the most effectively reduction of the toxic effect of glutamate on cells. More detailed tests of their biological activity were performed with these substances.</p>
Keywords	Oxysterols, neuroprotection, cytotoxicity
Number of pages	73
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Miroslava Kvasnici, Ph.D. a za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Eliška Pochylá

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Miroslavu Kvasnicovi, Ph.D. za věnovaný čas, cenné rady a především za trpělivost při vypracování mé diplomové práce a analýzu látek pomocí HRMS a NMR. Dále Mgr. Lucii Rárové, Ph.D. a Mgr. Gabrielovi Gonzalezovi, Ph.D. za cenné rady při biologickém testování připravených látek. Mgr. Gabrielovi Gonzalezovi, Ph.D. také za statistické vyhodnocení dat neuroprotektivní aktivity syntetizovaných látek. Poděkování patří i kolektivu Laboratoře růstových regulátorů a Katedry experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého za podporu a pomoc v laboratoři. Tato diplomová práce vznikla za finanční podpory grantu GAČR_20-15621-S.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
1 ÚVOD.....	9
2 OXYSTEROLY.....	10
2.1 Vznik oxysterolů.....	11
2.1.1 Enzymatická oxidace.....	12
2.1.2 Neenzymatická oxidace.....	13
2.2 Transport v buňkách.....	14
3 BIOLOGICKÁ AKTIVITA OXYSTEROLŮ.....	15
3.1 Role oxysterolů v metabolismu cholesterolu.....	15
3.2 Nádorová aktivita oxysterolů.....	17
3.3 Prozánětlivá aktivita.....	19
4 OXYSTEROLY A NEURODEGENERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ.....	20
4.1 Neurodegenerativní onemocnění.....	20
4.2 Alzheimerova choroba.....	21
4.2.1 Charakteristika choroby.....	21
4.2.2 Vliv genetiky.....	22
4.2.3 Možnosti léčby.....	23
4.2.4 Vliv oxysterolů na patogenezi Alzheimerovy choroby.....	24
4.3 Parkinsonova choroba.....	25
4.3.1 Charakteristika a vznik.....	25
4.3.2 Možnosti léčby.....	26
4.3.3 Genetická predispozice.....	27
4.3.4 Zapojení oxysterolů při patogenezi Parkinsonovy choroby.....	28
4.4 Glutamát jako model studia neurodegenerace.....	30
5 MATERIÁL A METODY.....	32
5.1 Materiál a přístroje.....	32
5.2 Metody.....	33
5.2.1 Obecný postup při syntéze oxysterolů.....	33
5.2.2 Testování cytotoxické aktivity na nádorových a nenádorových buňkách.....	46
5.2.3 Příprava buněk SH-SY5Y pro testování.....	48
5.2.4 Příprava koncentrační řady syntetizovaných látek.....	48

5.2.5	Testování cytotoxicity na buňkách SH-SY5Y	48
5.2.6	Test buněčné smrti	49
5.2.7	Měření oxidativního stresu pomocí dihydroethidia	50
5.2.8	Měření aktivity kaspázy 3, 7	51
5.2.9	Měření mitochondriálního membránového potenciálu	52
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	54
6.1	Syntéza látek	54
6.2	Testování cytotoxické aktivity na nádorových a nenádorových buňkách	57
6.3	Testování cytotoxicity na buňkách SH-SY5Y	59
6.4	Test buněčné smrti	61
6.5	Měření oxidativního stresu.....	63
6.6	Měření aktivity kaspázy 3,7	64
6.7	Měření mitochondriálního membránového potenciálu	65
7	ZÁVĚR	67
	POUŽITÁ LITERATURA	68

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACAT	acyl-CoA:cholesterolacyltransferáza
ACH	Alzheimerova choroba
APOE	apolipoprotein E
DHE	dihydroethidium
DMEM	Dulbeccoho modifikované Eagleho médium
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
ER	estrogenový receptor
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
LDH	laktát dehydrogenáza
L-dopa	L-dihydroxyphenylalanin
LRRK2	leucin repetitivní kináza 2
LXR	játerní X receptor
MPP+	1-methyl-4-fenylpyridin
MPTP	1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NMDA	N-methyl-D-asparátový receptor
NMR	nukleární magnetická rezonance
OSBP	oxysterol vázající protein (oxysterol-binding protein)
ORPs	proteiny související s OSBP (OSBP-related proteins)
PCH	Parkinsonova choroba
PI	propidium jodid
PMSP	fenylmethylsulfonyl fluorid
ROS	reaktivní formy kyslíku
SCAP	protein aktivující štěpení SREBP (SREBP cleavage activating protein)
SERM	selektivní regulátory estrogenového receptoru
SREBP	sterolový regulační element

1 ÚVOD

Oxysteroly vznikají při katabolismu cholesterolu v buňkách. Tyto oxidované deriváty obsahují ve své struktuře další hydroxylové, keto, epoxidové či karboxylové skupiny navázané na 27 uhlíkatý cholestanový skelet. Modifikace mohou nastat vlivem enzymatické oxidace za účasti enzymů z rodiny cytochromu P450 na postranním řetězci. Neezymatickou oxidací reaktivními kyslíkovými radikály dochází k modifikaci nejčastěji na B kruhu cholestanové struktury. V organismus se oxysteroly zapojují do celé řady procesů. Jejich klíčová role je v kontrole homeostázy cholesterolu, kde pomáhají regulovat jeho hladiny a podílí se i na transportu. Významnou úlohu mají při zánětlivé reakci, která je jednou ze závažných příčin a komplikací u chronických onemocnění. Oxysteroly mohou zesilovat celkový zánět tím, že indikují syntézu zánětlivých cytokinů a chemokinů. Jejich zvýšené hladiny vedou ke zvýšené tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů, čímž je narušena redoxní rovnováha a organismus je vystaven zvýšenému oxidativnímu stresu. V současné době je zkoumáno jejich zapojení do průběhu celé řady onemocnění včetně neurodegenerativních onemocnění, jejichž přesná příčina není doposud známa.

Cíle práce:

1. Syntéza derivátů oxysterolů s modifikací na B kruhu.
2. Biologická aktivita syntetizovaných látek.
 - Cytotoxicita na nádorových a normálních buňkách
 - Neuroprotektivní účinek na buňkách SH-SY5Y

2 OXYSTEROLY

Oxysteroly jsou oxidované deriváty cholesterolu, disponující rozmanitými biologickými aktivitami. Běžné modifikace těchto 27 uhlíkatých cholestanových derivátů obsahují ve své struktuře další hydroxylové, keto, epoxidové či karboxylové skupiny (Olkkonen, 2012). Primární oxysteroly jsou klasifikovány na základě umístění modifikace, která může být buď na postranním řetězci nebo na některém z kruhů cholestanového skeletu. Oxysteroly, které obsahují více než jednu modifikaci, jsou označovány jako sekundární. Sekundární modifikace zahrnují zavedení další keto, hydroxy, epoxy nebo hydroperoxy skupiny ke struktuře oxysterolu. (Luu, 2016)

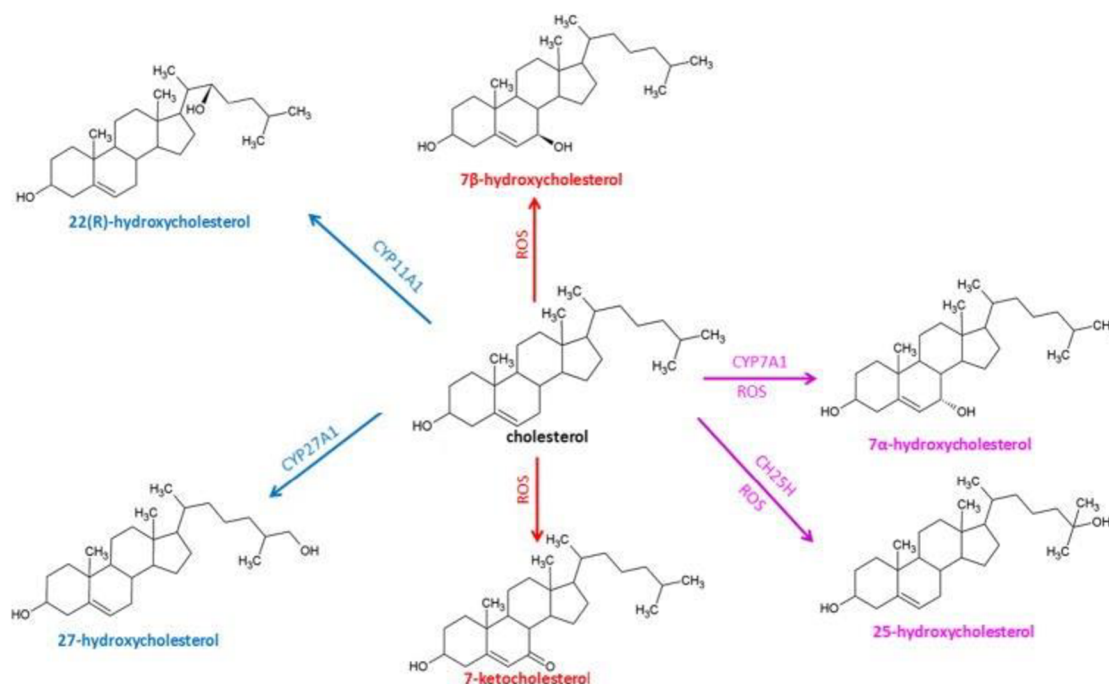
Podstatný milník v oblasti výzkumu oxysterolů nastal v roce 1973, kdy Kandutsch a Chen zjistili, že některé oxysteroly se mohou podílet na inhibici syntézy cholesterolu. Různé modely buněčných kultur ukázaly, že cholesterol není schopen inhibovat svou vlastní biosyntézu. Překvapivě byla biosyntéza cholesterolu inhibována vzorkem obsahujícím cholesterol s jeho oxidovanými formami. Tuto schopnost přisuzovali právě oxysterolům - 7 α -hydroxycholesterolu, 7 β -hydroxycholesterolu a 7-ketocholesterolu (Kandutsch, 1973).

V roce 1978 byla Kandutschem a jeho kolegy na základě předchozích výsledků formulována oxysterolová hypotéza o cholesterolu (Kandutsch a kol., 1978). Mnoha dalšími vědci byla teorie celá léta zpochybňována. Dnes je již všeobecně uznáváno, že samotný cholesterol hraje ústřední roli ve zprostředkování své vlastní zpětné inhibiční vazby. Oxysteroly regulují homeostázu cholesterolu pomocí transkripčních i postranskripčních mechanismů (Luu, 2016).

V posledních letech jsou oxysteroly zkoumány v souvislosti s neurodegenerativními onemocněními, aterosklerózou či regulací metabolismu cholesterolu.

2.1 Vznik oxysterolů

Oxysteroly byly identifikovány jako oxidační produkty cholesterolu. Oxidují se hlavně zavedením keto nebo hydroxylové skupiny na B-kruh cholesterolového skeletu, převážně v pozici 7 (Gill, 2008). Oxysteroly se dělí do dvou skupin. Jednu skupinu tvoří ty oxidované na sterolovém B kruhu, hlavně ve výše zmíněné poloze 7. Řadí se zde 7-ketocholesterol nebo 7 α -hydroxycholesterol a 7 β -hydroxycholesterol. Druhou skupinu reprezentují oxysteroly vzniklé oxidací na postranním řetězci. Příkladem takového oxysterolu je 24(S)-hydroxycholesterol nebo 25-hydroxycholesterol. Obecně se dá říct, že první skupina vzniká neenzymatickou oxidací narozdíl od druhé, která má převážně enzymatický původ. Ovšem i zde existují výjimky. Příkladem je již výše zmíněný 7 α -hydroxycholesterol a 25-hydroxycholesterol, jejichž původ může být jak enzymatický, tak neenzymatický (Brown, 2009).

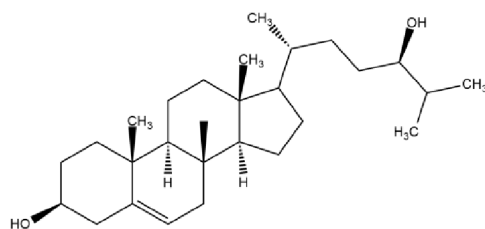


Obrázek 1: Vznik vybraných oxysterolů. Modře je znázorněn vznik enzymatickou oxidací, červeně neenzymatickou oxidací a fialová barva značí obě možné cesty vzniku. Převzato a upraveno dle Kloudová, 2017.

2.1.1 Enzymatická oxidace

Postranní řetězec cholesterolu podléhá převážně enzymatické oxidaci. Oxidaci způsobují enzymy endoplazmatického retikula nebo mitochondriální cholesterolhydroxylázy, které řadíme do rodiny cytochromu P450 (Samadi, 2021). Většina takto vzniklých oxysterolů nemá dlouhou životnost, jelikož jsou dále oxidovány na žlučové kyseliny, které jsou následně vyloučeny z těla. Při přeměně cholesterolu na oxysteroly dochází ke změně na polárnější molekuly, což jim umožňuje vstup skrze lipofilní membrány (Björkhem, 2007).

Mezi enzymaticky vzniklé oxysteroly patří již zmiňovaný 24(S)-hydroxycholesterol. Jedná se o jeden z hlavních oxysterolů v lidském organismu nacházející se v množství 50-100 ng/ml (Björkhem, 2007). Syntetizuje se v centrální nervové soustavě z cholesterolu za účasti 24-hydroxylasy (CYP46A1). Jeho klíčová role je v regulaci homeostázy a efluxu cholesterolu v mozku (Samadi, 2021). Mikrosomální 24-hydroxylasa je přítomna převážně v neuronech. Neuronální buňky syntetizují cholesterol velmi pomalu v porovnání s gliovými buňkami. Proto může docházet k toku cholesterolu z gliových buněk do krevního oběhu ve formě apolipoproteinu E. Na regulaci tohoto toku se v určité míře podílí přenašeč cholesterolu ABC1, který je pod kontrolou jaderného receptoru LXR. Právě 24(S)-hydroxycholesterol je aktivátorem zmíněného receptoru a tím zvyšuje transport cholesterolu k nervovým buňkám. Díky své přítomnosti v mozku je 24(S)-hydroxycholesterol často označován jako cerebrosterol (Björkhem, 2007).

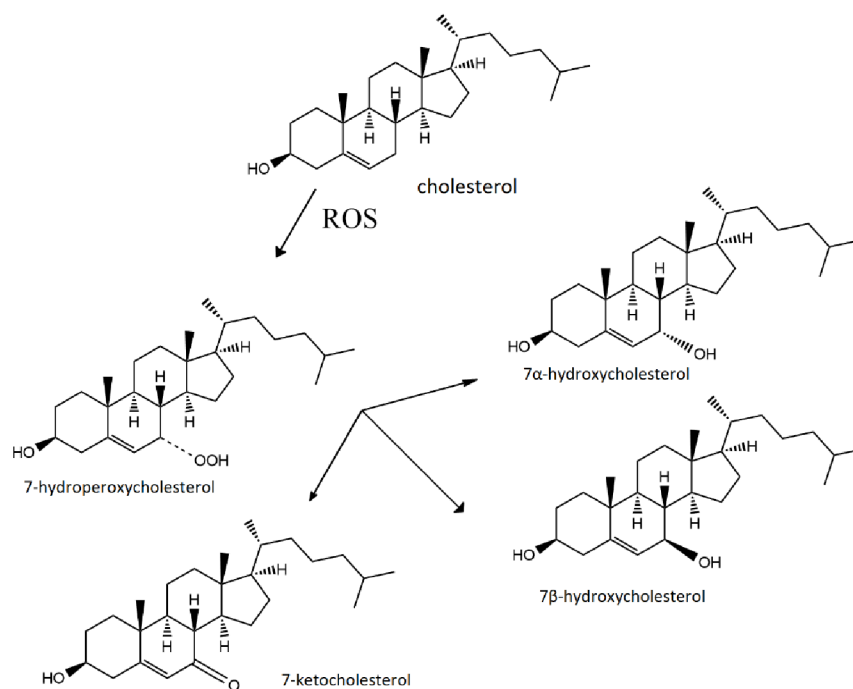


Obrázek 2: Struktura cerebrosterolu – 24(S)-hydroxycholesterolu.

Dalším příkladem oxysterolu s enzymatickým původem je 7 α -hydroxycholesterol, syntetizovaný v játrech enzymem 7 α -monooxygenázou, patřící do CYP7A1. 7 α -hydroxycholesterol se podílí jako meziprodukt na syntéze žlučových kyselin klasickou cestou. Klasická cesta začíná 7 α -hydroxylací cholesterolu a zabezpečuje až 50 % celkové syntézy žlučových kyselin člověka (Björkhem, 2001).

2.1.2 Neenzymatická oxidace

Cholesterol je snadno atakován reaktivními kyslíkovými radikály. Jedná se především o hydroxylové radikály, které atakují vodík na uhlíku v pozici C7 na cholesterolovém skeletu. Postupně vznikají hydroperoxydy cholesterolu (Obrázek 3), které nejsou stálé a dalšími reakcemi vznikají 7 α -hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol nebo 7-ketocholesterol (Brown, 2009).



Obrázek 3: Neenzymatická oxidace cholesterolu.

Neenzymatická interakce hydroperoxidu s dvojnou vazbou cholesterolu může dát vzniku 5,6(α/β)-epoxycholesterolu (Samadi,2021). Bylo dokázáno, že hlavní neenzymaticky

vzniklé oxysteroly, mezi něž patří 7-ketocholesterol, 7 β -hydroxycholesterol a 5 β ,6 β -epoxycholesterol, vykazují cytotoxické vlastnosti (Lemaire-Ewing a kol, 2005).

Výzkum Juliana a kol. (2003) ukázal, že neenzymaticky vzniklé oxysteroly se podílí na patologických stavech. U pacientů s dědičnou poruchou metabolismu lipidů dochází k výrazně zvýšené hladině plazmatických oxysterolů – 7-ketocholesterolu a 7 β -hydroxycholesterolu, fungující jako *in vivo* markery oxidativního stresu (Juliana a kol, 2003).

2.2 Transport v buňkách

Oxysteroly se ve velmi malém množství nachází ve zdravých savčích tkáních a krevním oběhu. Stejně jako cholesterol mohou pronikat skrze buněčné membrány. Prostup skrze membrány je ovšem v porovnání s cholesterolem mnohem rychlejší, a to především zásluhou zvýšené hydrofility, kterou oxysteroly disponují. Díky tomu jsou i přístupnější pro receptory, nacházející se v cytosolu (Yan, 2008)

Transport většiny oxysterolů v plazmě je zajišťován skrze vazby na protein albumin nebo na lipoproteiny (Lin, 1996). Volné formy oxysterolů jsou transportovány pomocí proteinů, označovaných jako oxysterols-binding proteins (OSBP) nebo OSBP-related proteins (ORPs) (Luu, 2016). Jedná se o minimálně 12 člennou skupinu proteinů, která se podílí na regulaci metabolismu a transportu cholesterolu a lipidových molekul. Vyskytují se z velké části v endoplazmatickém retikulu a rovněž v navazujícím Golgiho aparátu (Kloudová, 2017). Na svém terminálním konci mají OSBP karboxylovou skupinu, která obsahuje ligand vázající doménu, na základě čehož OSBP na sebe mohou vázat oxysteroly či cholesterol s rozdílnou afinitou. Kromě již zmíněného transportu oxysterolů se OSBP i ORPs významně podílí na vnitrobuněčném vezikulárním transportu a buněčné signalizaci (Luu, 2016).

Existují důkazy o tom, že ORP souvisí s buněčnou proliferací a kancerogenezí. V nádorových buňkách dochází ke změně jejich hladiny na úrovni mRNA nebo proteinů, což značí souvislost odlišné exprese a funkce ORP s nádorovým bujením. Při použití inhibitorů zvaných ORPphilins dochází k inhibici růstu nádoru a antiproliferační aktivitě. Tyto inhibitory jsou schopny oslabit OSBP nebo ORP4L (Weber-Boyvat, 2013).

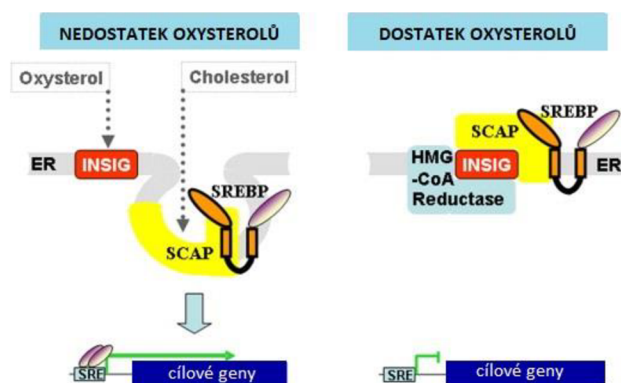
3 BIOLOGICKÁ AKTIVITA OXYSTEROLŮ

3.1 Role oxysterolů v metabolismu cholesterolu

V mozku je přítomno až 25 % celkového množství cholesterolu v těle. Nachází se zde především v neesterifikované formě. Klíčovou roli v kontrole homeostázy cholesterolu hrají právě oxysteroly (Samadi, 2021).

Transkripční faktory, nazývaní se proteiny vázající sterolový regulační element (SREBP), regulují expresi ústředních enzymů v metabolismu cholesterolu (Gill, 2008). První SREBP byl izolován v roce 1993. Briggs a kol. (1993) došli ke zjištění, že SREBP, jako DNA vázající se protein, reguluje transkripci genu receptoru pro lipoprotein s nízkou hustotou (Briggs a kol, 1993). Jsou známy dva geny SREBP-1 a SREBP-2. SREBP-1 má 2 izoformy: SREBP-1a a SREBP-1c. Pochází ze stejného genu, ale liší se použitím odlišných promotorů a alternativním sestřihem. (Goldstein, 2006). Řízení exprese genů, účastnících se syntézy mastných kyselin, fosfolipidů a triglyceridů, spadá pod kontrolu genu SREBP-1c. Druhá izoforma SREBP-1a má podobnou specifitu jako SREBP-1c a SREBP-2 (Gill, 2008). Řízení exprese genů pro syntézu cholesterolu (HMG-CoA reduktázy) a vychytávání cholesterolu (LDL receptor), zabezpečuje SREBP-2. (Gill, 2008) SREBP se vytváří v endoplazmatickém retikulu v podobě membránově vázaných prekurzorů. Ty jsou následně vázány na SREBP-cleavage activating proteiny (SCAP), které mění svou konformaci na základě změny hladiny cholesterolu. Pokud je cholesterolu málo, SCAP společně s SREBP putují do Golgiho aparátu. Zde dochází ke štěpení proteázami. Výsledkem je uvolnění transkripčního faktoru SREBP, který může vstoupit do jádra a zahájit expresi cílových genů (Obrázek 4). Ovšem, pokud je cholesterolu dostatek, komplex SREBP-SCAP je zachycen v endoplazmatickém retikulu proteinem INSIG (Gill, 2008). SCAP se váže na cholesterol, na kterém rozeznává tetracyklické steroidní jádro a 3 β -hydroxylovou skupinu. Může se vázat i na sterol s absencí postranního řetězce. Pokud sterol obsahuje polární skupinu jako je například hydroxylová skupina na postranním řetězci, SCAP není schopen se na sterol navázat. Na rozdíl od proteinu INSIG, který přítomnost hydroxylové skupiny na postranním řetězci vyžaduje. Umístění hydroxylové skupiny může být na pozicích 22, 24, 25 nebo 27. Přímá vazba proteinu INSIG na hydroxylovou skupinu na postranním řetězci je nepravděpodobná, ale vazba může být

zprostředkována nepřímo prostřednictvím interakce s vodou (Radhakrishnan, 2007). Studie Radhakrishnana a kol. (2007) rovněž dospěla k závěru, že regulace aktivace SREBP může být jednak samotným cholesterolem tak i oxysteroly. Cholesterol se váže na SCAP, kdežto oxysteroly interagují s proteinem INSIG, a tak ovlivňují aktivaci SREBP (Radhakrishnan, 2007).



Obrázek 4: Vliv oxysterolů na SREBP dráhu homeostázy cholesterolu. Převzato a upraveno dle Gill, 2008.

Hladinu cholesterolu lze rovněž regulovat pomocí jaterního X receptoru (LXR). LXR receptory kontrolují intracelulární homeostázu cholesterolu pomocí katabolismu a transportu cholesterolu. Studie Janowského a kol. (1996) odhalila, že oxysteroly fungují jako aktivátory LXR. (Janowski, 1996) Mezi nejúčinnější ligandy patří 24(S)-hydroxycholesterol, 22(R)-hydroxycholesterol a 24(S), 25-epoxycholesterol (Janowski, 1999). Ve studii o několik let později Janowski a kol. (1999) dospěli ke zjištění, že pro vysokoafinitní vazbu a aktivaci LXR je nutné, aby došlo k polohově specifické monooxidaci na sterolovém postranním řetězci. Zavedení kyslíku na B kruh sterolu vede k selektivní vazbě na subtyp LXR α . Získané poznatky by mohly posloužit k návrhu silných ligandů s farmakologickým využitím (Janowski, 1999).

Dalším regulačním mechanismem metabolismu cholesterolu je enzym endoplazmatického retikula 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reductáza (HMG-CoA) (Sever, 2003). Jedná se o klíčový enzym při syntéze cholesterolu. Studie Songa a kol. (2004)

ukázala, že celá řada oxysterolů, jako je 25-hydroxycholesterol, 5-cholesten-3 β ,16 β ,27-triol, 24(S)-hydroxycholesterol a 27-hydroxycholesterol, způsobuje ubikvitinizaci HMG-CoA reduktázy a její následnou degradaci v proteazomu (Song, 2004). Degradace HMG-CoA je ovlivněna také vazbou proteinu INSIG, na který se vážou oxysteroly. Po vazbě proteinu INSIG dochází k urychlené degradaci HMG-CoA (Sever, 2003).

Je známo, že oxysteroly fungují jako substráty pro enzym acyl-CoA:cholesterolacyltransferázu (ACAT), jenž umožňuje zrychlení esterifikace cholesterolu (Cases, 1998). V savčích buňkách byly identifikovány dva geny enzymu ACAT. ACAT1 se exprimuje převážně v kožních buňkách, makrofázích a buňkách nadledvin. ACAT2 převažuje v hepatocytech a ve střevech (Chang, 2006).

3.2 Nádorová aktivita oxysterolů

Oxysteroly mají vliv na patologii a progresi celé řady typů rakovin. Vliv na růst a přežití nádorů má také hladina exprese enzymů, které metabolizují oxysteroly. Kohortová studie vzorků s histologicky potvrzeným primárním kolorektálním karcinomem se zabývala zjištěním souvislostí mezi expresí vybraných enzymů cytochromu P450, které se podílí na tvorbě oxysterolů, a prognózou pacientů. Dobrá prognóza je spojována se sníženou expresí enzymů, což vede ke snížené koncentraci oxysterolů. Opakem tomu bylo u pacientů se špatnou prognózou, kde hladiny enzymů byly zvýšené. Následkem je zvýšení hladin oxysterolů, jenž podporují invazi a metastázy nádorových buněk vlivem cílových genů LXR. Zvýšená hladina oxysterolů vede k přežití a růstu nádorových buněk díky úniku imunitní odpovědi a chemoatrakce proangiogenních neutrofilů. Například zvýšené hladiny enzymu CYP27A1, vytvářejícího 27-hydroxycholesterol, se pojily se špatnou prognózou u kolorektálního karcinomu (Swan, 2016).

Podobný vliv CYP27A1 byl popsán i u karcinomu prsu (Nelson, 2013; Wu, 2013). Cílení na inhibici CYP27A1 se zdá být jako vhodný podmět pro léčbu karcinomu prsu. Naznačuje to i Mast a kol. (2015) a jejich studie schválených protinádorových léků. Mezi testovanými sloučeninami se našly čtyři silné inhibitory 27-hydroxylázy CYP27A1 včetně dvou léků na rakovinu vykazující inhibici > 75 %. Nejsilnější inhibiční aktivitu s 87 % měl protinádorový lék

anastrozol, který je známý jako inhibitor aromatasy. Jeho inhibiční aktivita byla následně potvrzena *in vivo* na myším modelu (Mast a kol., 2015).

Oxysteroly mohou dále cílit na estrogenový receptor (ER), patřící do rodiny jaderných hormonálních receptorů. Po navázání ligandu podléhá ER dimerizaci. Prodělaná konformační změna umožňuje vazbu na DNA a následnou expresi cílového genu. Postupem času se zjistilo, že existují sloučeniny, které jsou schopné modulovat aktivitu ER. Takové sloučeniny jsou označovány jako selektivní modulátory ER (SERM) (Dusell, 2008). V roce 2007 Umetani a kol. identifikovali 27-hydroxycholesterol jako endogenní SERM (Umetani, 2007). U 27-hydroxycholesterolu byla pozorována částečná agonistická aktivita, projevující se na úrovni genové exprese i na úrovni buněčné proliferace. Studie Dusella a kol. (2008) ukázala, že vyvolává expresi cyklinu D1 a zvyšuje počet buněk MCF7 v S-fázi buněčného cyklu (Dusell, 2008).

Dokázána byla antiproliferační a proapoptická aktivita oxysterolů na nádorové buňky adenokarcinomu tlustého střeva. Inhibici buněčného růstu nádorové linie tlustého střeva Caco-2 a spuštění apoptického procesu, aktivováním kaspázy 3, vyvolal 7 β -hydroxycholesterol (Roussi, 2005) a směs oxysterolů, zahrnující 7 α -hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol, 5 α ,6 α -epoxycholesterol a 5 β ,6 β -epoxycholesterol (Biasi, 2009). Pokud jsou oxysteroly aplikovány samostatně, mají prokazatelně silnější proapoptické účinky v porovnání se směsí oxysterolů. Proapoptická aktivita 7 β -hydroxycholesterolu byla silnější než při použití směsi 7 β -hydroxycholesterolu a 25-hydroxycholesterolu (Aupeix, 1995).

Studie Carvalho a kol. (2010) zkoumala vliv několika syntetizovaných oxysterolů na nádorové buňky tlustého střeva HT-29 a další vybrané line. Připravené steroly měly různé chemické modifikace na C17 a na B kruhu. Oxysteroly oxidované na pozicích C6 nebo C7 mají na zkoumané buňky HT-29 největší cytotoxický efekt. Jednalo se o 7 β -hydroxycholesterol s hodnotou IC₅₀ 6,9 \pm 0,3 μ M a 5 α -cholestan-3 β ,6 β -diol s hodnotou IC₅₀ 12 \pm 0,7 μ M. Zmíněný 7 β -hydroxycholesterol s dvojnou vazbou na Δ 5 se ukázal jako nejvíce cytotoxický a selektivní pro velkou část nádorových buněk. Pozoruhodností studie je taktéž synergický účinek kombinace chemoterapeutika doxorubicinu a cholestan-3 β ,5 α ,6 β -

triolu. Již v nízké koncentraci oxysterolu (1 μ M) došlo k významnému posílení cytotoxického efektu doxorubicinu proti nádorovým buňkám tlustého střeva HT-29, aniž by došlo k ovlivnění cytotoxického efektu doxorubicinu na normální buňky ARPE-19 (Carvalho a kol., 2010).

3.3 Prozánětlivá aktivita

Jednou z příčin komplikací a vzestupu závažných chronických onemocnění je zánět. Mezi charakteristické rysy zánětu patří aktivace fagocytů, jejichž změna hladiny vede k zvýšení reaktivních forem kyslíku (ROS). ROS podporují a rovněž rozšiřují zánět, čímž dochází k posunu redoxní rovnováhy v organismu, vedoucí k zvýšení oxidačních reakcí a v důsledku toho i oxidativního stresu. Celkový zánět může být zesilován v důsledku vzájemné up-regulace oxysterolů a zánětu (Poli, 2013).

25-hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol a 7-ketocholesterol jsou spjaty se zesilující zánětlivou reakcí, neboť indukují expresi i syntézu celé řady zánětlivých cytokinů. Jedná se například o tumor nekrotizující faktor α , interleukin 1 β a 6 (Prunet, 2006). Kromě cytokinů indukují expresi i syntézu chemokinů, mezi které patří například interleukin 8 (IL-8) a monocytový chemotaktický protein (Vejux, 2009). Exprese zmíněných zánětlivých mediátorů je závislá na aktivitě transkripčního peptidu označovaného jako nukleární faktor κ B, který je silně up-regulován oxysteroly (Leonarduzzi, 2005).

Vliv na zánětlivou reakci má i 27-hydroxycholesterol, který skrze ER zvyšuje adhezi leukocytů k endoteliálním buňkám. Potvrdil to *in vivo* myší model studie Umetaniho a kol. (2014).

Joffre a kol. (2006) analyzovali účinky tří oxysterolů za pomoci primárních buněk pigmentového epitelu sítnice a potvrdili několikanásobný nárůst produkce ROS. Dále bylo zjištěno, že 25-hydroxycholesterol, 24-hydroxycholesterol a 7-ketocholesterol zvyšují produkci proteinu IL-8 (Joffre a kol., 2006).

4 OXYSTEROLY A NEURODEGENERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ

4.1 Neurodegenerativní onemocnění

Stavy, kdy dochází k pozvolnému zániku specifických skupin neuronů se označují jako neurodegenerace. Ve velké většině případů se jedná o věkově vázaná onemocnění, která manifestují v dospělém věku a s přibývajícím věkem jejich výskyt stoupá. Patologicky se projevují akumulací specifického proteinu do mozkové tkáně. Například u Parkinsonovy nemoci se jedná o akumulaci proteinu α -synukleinu. Patofyziologickou příčinou neurodegenerativních onemocnění je abnormální skládání proteinů, jinak správně syntetizovaných a fungujících, které se stávají toxické pro neurony a tím spouští celou kaskádu reakcí vedoucí k zániku postiženého neuronu. Mezi hlavní mechanismy neurodegenerace patří apoptóza a produkce volných kyslíkových radikálů v kombinaci s nahromaděnými proteinovými agregáty (Rusina, 2019). Genetické mutace zjištěné u familiárních i sporadických případů onemocnění vytváří mutované proteiny, které fibrilují daleko rychleji, což má za důsledek dřívější nástup nemoci u hereditárních typů (Forman, 2004). V současné době není zcela jasné, zda neurotoxicitu způsobuje akumulace abnormálního proteinu nebo ztráta jeho fyziologické funkce (Rusina, 2019).

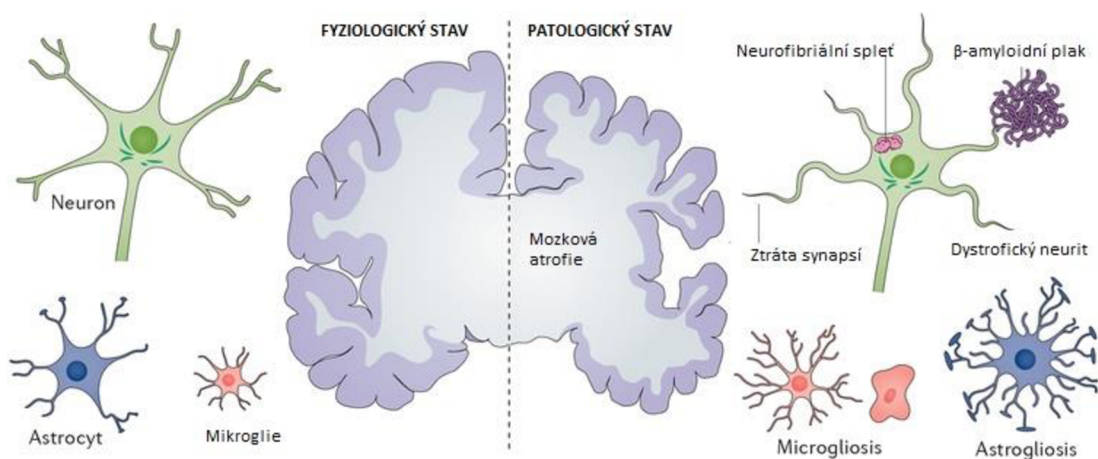
Klasifikace neurodegenerativních onemocnění je na základě patofyziologické podstaty členěna do 7 základních skupin. První skupinou je Alzheimerova choroba. Druhá skupina zahrnuje frontotemporální lalokové degenerace. Dále se jedná o synukleinopatie, kde se řadí Parkinsonova choroba či demence s Lewyho tělísky. Čtvrtá skupina zahrnuje onemocnění s opakováním tripletů jako je například Huntingtonova choroba. Následují prionová onemocnění způsobující kuru či Creutzfeld-Jakobovu nemoc. Předposlední skupina klasifikace se označuje jako onemocnění motorických neuronů a zahrnují primární laterální sklerózu. Do sedmé skupiny patří ostatní nezařazená neurodegenerativní onemocnění jako je nemoc s intranukleárními neuronálními inkluzemi. Stanovení diagnózy během života je mnohdy velmi obtížné a v celé řadě případů je klinická diagnóza stanovena chybně. Častokrát je diagnostikována Alzheimerova či Parkinsonova choroba, i když pacient trpí zcela odlišným onemocněním (Rusina, 2019).

4.2 Alzheimerova choroba

4.2.1 Charakteristika choroby

V roce 1907 německý psychiatr Alois Alzheimer popsal zvláštní typ demence u 51 leté ženy. Změnu jejích kognitivních a behaviorálních rysů spojoval s malými zánětlivými ložisky a neurofibrilárními změnami v mozkové kůře, které našel při pitvě (Alzheimer, 1907).

Alzheimerova choroba (ACH) je popisována jako progresivní degenerativní onemocnění centrálního nervového systému, které se projevuje se mozkovou atrofií (Obrázek 5). Dochází ke ztenčení mozkové kůry a rozšíření mozkových komor. Významná atrofie nastává rovněž v oblasti hippocampu (Pidrman, 2007). Patologicky se projevuje rozsáhlou ztrátou neuronů, hromaděním intracelulárních neurofibrilárních klubek a extracelulárních amyloidních plaků v mozku (Karch, 2015).



Obrázek 5: Patologické znaky u Alzheimerovy choroby. Převzato a upraveno dle Congdon, 2018.

Při diagnostice jsou viditelné mikroskopické extracelulární a intracelulární změny. Specifickou extracelulární změnou pro ACH je ukládání beta-amyloidu. Tento protein je vytvářen při štěpení amyloidního prekurzorového proteinu, který je ve zdravém mozku štěpen pomocí α -sekretázy na rozpustné fragmenty. Při patologickém štěpení je amyloidní prekurzorový protein štěpen pomocí sekretáz β a γ a vznikají nerozpustné fragmenty, jenž koagulují (Pidrman, 2007). Nerovnováha mezi produkcí a odbouráváním beta amyloidu vede

k jeho nahromadění a tvorbě plaků, které poté mohou vyvolat neurotoxicitu. Převládající formou v placích je beta-amyloid o délce 42 aminokyselin, vznikající štěpením pomocí sekretázy γ (Gamba, 2015).

Mezi nejzávažnější intracelulární patologickou změnou ACH patří degenerace tau-proteinu (Pidrman, 2007). Tau-protein je syntetizován a produkován všemi neurony a objevuje se i v neurogliích. Přírozenou funkcí tau-proteinu je vázat se na tubulin a stabilizovat tak mikrotubuly. V případě patologie u ACH je tau-protein hyperfosforylován. Hyperfosforylovaný tau-protein je z mikrotubulů disociován, což vede k jeho agregaci a vznikají tak neurofibrilární spleť v tělech neuronů a dystrofických neuritech. Neurofibrilární spleť pak mohou způsobit neuronální dysfunkci a následnou smrt neuronu (Holtzman, 2011).

V roce 2006 bylo celosvětově ACH postiženo 26,6 milionů lidí. Odhaduje se, že do roku 2050 se počet lidí s tímto onemocněním až čtyřnásobí (Brookmeyer, 2007).

4.2.2 Vliv genetiky

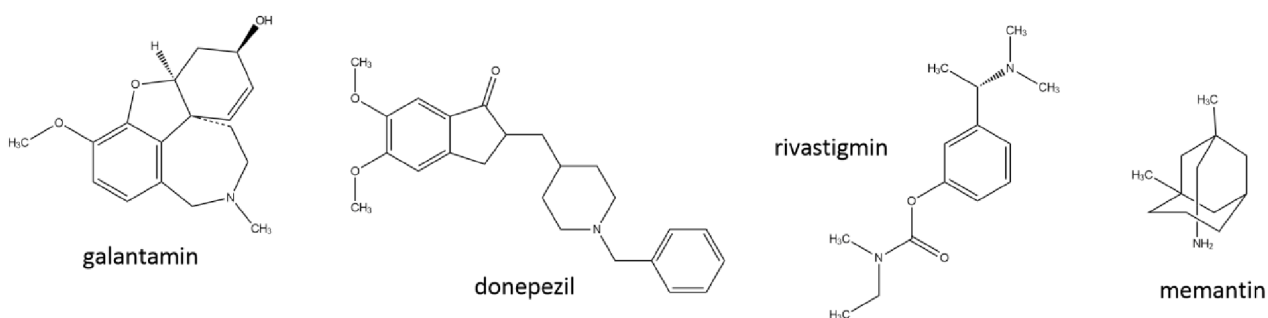
Autozomálně dominantní varianta ACH s projevem kolem 30. roku života je spjata s mutací v některém ze tří následujících genů. Mutace může nastat na chromozomu 21, kde je umístěn amyloidní prekurzorový protein, na chromozomu 14, kde je kódován presenilin 1, a na chromozomu 1, kde je kódován presenilin 2. Zmíněné mutace jsou však přítomny jen u malého procenta pacientů (Mayeux, 2003).

Spojitosť s ACH má také gen pro apolipoprotein E (APOE) na chromozomu 19. Gen pro APOE má 3 alely: APOE- ϵ 2, APOE- ϵ 3 a APOE- ϵ 4. Poslední zmíněná alela je spojována s vysokým rizikem pozdnějšího nástupu familiární a také sporadické formy ACH. Riziko pacientů s přítomností APOE- ϵ 4 se zvyšuje z 20 % až na 90 % a s počtem alel se snižuje také věk nástupu projevů pozdní formy ACH. APOE- ϵ 4 je považován za hlavní rizikový faktor pozdní formy ACH (Corder, 1993). Nižší rizikový faktor pozdní formy ACH a ochranné účinky jsou připisovány APOE- ϵ 2 (Corder, 1994).

4.2.3 Možnosti léčby

V současné době neexistuje lék, který byl zcela vyléčil ACH. Terapie se zaměřuje pouze na symptomatickou léčbu. Léky první volby jsou inhibitory cholinergních receptorů. Nejpoužívanější inhibitory jsou galantamin, donepezil a rivastigmin, vázající se na aktivní místo enzymu acetylcholinesterasy, aby nedocházelo k degradaci neurotransmiteru acetylcholinu, potřebného k přenosu nervového vzruchu (Obrázek 6). Celá řada klinických studií potvrdila příznivý vliv těchto inhibitorů na zmírnění neuropsychiatrických a behaviorálních poruch a zlepšení kvality každodenního života lidí s ACH (Farlow, 2002).

Další možností je předepsání memantinu (Obrázek 6). Jedná se o nízkoafinitního antagonistu N-methyl-D-asparátového glutamátového receptoru. Neurotransmitter L-glutamát je v centrální nervovém systému zapojen do procesu učení, paměti a přenosu nervového vzruchu (McShane a kol. 2019). Jeho aktivita je pro mozek důležitá, avšak nadměrná stimulace glutamátem vede k poškození neuronů čili k tzv. excitotoxicitě. Excitotoxicita vede k nadměrnému toku vápníku do neuronů přes N-methyl-D-asparátový receptor, který se podílí na paměťových procesech, demenci a patogenezi ACH (Reisberg, 2003). McShane a kol. (2019) ve své metaanalýze dokázali, že memantin vede ke zlepšení stavu pacientů se středně těžkou až těžkou formou ACH. U lidí s mírnou formou ACH memantin nepřináší žádný benefit (McShane a kol., 2019).



Obrázek 6: Struktury léčiv používaných pro léčbu Alzheimerovy choroby.

4.2.4 Vliv oxysterolů na patogenezi Alzheimerovy choroby

Aby se zabránilo přebytku hromadění cholesterolu v mozku, dochází k jeho transportu přes hematoencefalitickou bariéru do krevního oběhu. K transportu je nutná přeměna cholesterolu na oxysteroly. V neuronech se například cholesterol přeměňuje pomocí 24-hydroxylázy na 24-hydroxycholesterol (Gamba, 2015). Oxysteroly mohou fungovat jako biomarkery v diagnostice ACH, neboť změny jejich hladin korelují s jednotlivými fázemi choroby. U rané fáze ACH byla nalezena vyšší hladina 24-hydroxycholesterolu v periferním oběhu a mozkomíšním moku v porovnání se zdravými jedinci. Na druhou stranu nízké hladiny byly nalezeny u jedinců v pozdější fázi (Lütjohann a kol., 2000). Zvýšené hladiny 24-hydroxycholesterolu v rané fázi mohou být vysvětleny tím, že zrcadlí neurodegeneraci. Pozdější fáze je odrazem selektivní ztráty neuronových buněk a tím pádem nedostatkem enzymu cholesterol 24-hydroxylázy (Gamba, 2015).

Výzkumná skupina Heverin a kol. ve své studii zaznamenala zvýšené hladiny 27-hydroxycholesterolu ve všech vzorcích pacientů s ACH, který byl zvýšen ve všech oblastech mozku. Autoři tento fakt vysvětlují pravděpodobným narušením hematoencefalitické bariéry, neboť přítomnost enzymu 27-hydroxylázy je v mozku jen v malém množství, a proto je tedy pravděpodobné, že 27-hydroxyláza pochází z extracerebrálních zdrojů (Heverin a kol., 2004).

Vliv na patologii ACH může mít i 7β -hydroxycholesterol, který je neurotoxický již v nanomolárních koncentracích (Nelson, 2005). Studie Nelsona a kol. (2005) naznačuje, že vysoké hladiny 7β -hydroxycholesterolu přispívají u ACH k oxidativnímu stresu a ztrátě nervových buněk (Nelson, 2005).

Do neurodegenerace ve spojitosti s ACH je zapojen také 7α -hydroperoxycholesterol. Cytotoxický efekt 7α -hydroperoxycholesterolu byl zkoumán na buňkách SH-SY5Y. V závislosti na dávce způsobuje smrt neuronových buněk, kdy při $10\ \mu\text{M}$ způsobuje 50% buněčnou smrt a při $50\ \mu\text{M}$ se zvyšuje na 92 % (Kölsch, 2000).

V neuropatologických změnách u ACH, vedoucích k neuronální dysfunkci a buněčné smrti, mají zásadní vliv zánětlivé procesy. Aktivace a následná proliferace gliových buněk společně s up-regulací zánětlivých mediátorů a volných radikálů se podílí na zánětlivých

reakcích v mozku. Ukázalo se, že 24-hydroxycholesterol, 27-hydroxycholesterol a 7 β -hydroxycholesterol spouští expresi prozánětlivých mediátorů, jako je například interleukinu 8, v neuronálních buňkách SH-SY5Y (Testa, 2014).

Zvýšené hladiny oxysterolů byly také identifikovány *post mortem* v lidských mozcích s diagnostikovanou ACH (Hascalovici, 2009).

4.3 Parkinsonova choroba

4.3.1 Charakteristika a vznik

Po Alzheimerově chorobě se jedná o druhé nejčastější neurodegenerativní onemocnění. Parkinsonova choroba (PCH) byla popsána v roce 1817 Jamesem Parkinsonem, který toto neurologické onemocnění nazval „třesavou obrnu“ (Parkinson, 1817). Prevalence se vlivem stárnutí zvyšuje z 1 % populace starších 60 let na 4 % ve věku starších než 80 let. (Dexter, 2013; Lee, 2016) Odhady ukazují, že vlivem stárnutí se počet jedinců s tímto onemocněním v roce 2040 zvýší až na 12 milionů (Dorsey, 2018).

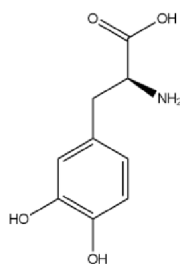
PCH je diagnostikována na základě sníženého množství dopaminových neuronů v oblasti *substantia nigra pars compacta* a přítomnosti tzv. Lewyho tělísek (Alexander, 2004), jejichž hlavní vláknitou složku tvoří protein α -synuklein (Spillantini, 1998). Přesná příčina zániku nervových buněk není zcela jasná. Zánik buněk je pravděpodobně způsoben v důsledku oxidačního stresu, což dokazují zvýšené hladiny vedlejších produktů lipidů, bílkovin a oxidace DNA (Lotharius, 2002). Ke studiu vlivu oxidačního stresu na úbytek dopaminergních neuronů se využívá 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), vyvolávající parkinsonismus. MPTP sám o sobě není pro buňky toxický a díky své vysoké lipofilitě se snadno dostává přes hematoencefalitickou bariéru v mozku. Po překročení hematoencefalitické bariéry je MPTP v nedopaminergních buňkách, jako jsou gliové buňky, přeměněn pomocí monoaminoxidázy B na 1-methyl-4-fenyl-2,3-dihydropyridinium a následně na toxický 1-methyl-4-fenylpyridin (MPP+). Z buněk je MPP+ uvolňován do extracelulárního prostoru, odkud se může prostřednictvím dopaminových transportérů koncentrovat v dopaminergních neuronech (Dauer, 2003). MPP+ je znám pro svou schopnost narušit oxidativní fosforylaci v mitochondriích tak, že inhibuje enzymatický

komplex I v elektronovém transportním řetězci mitochondrií (Nicklas, 1985). Inhibicí se sníží obsah ATP. V důsledku inhibice toku elektronů mitochondriálního komplexu I může docházet k vytváření reaktivních kyslíkových radikálů, zejména superoxidu. Mimo blokaci komplexu I se MPP+ váže na vezikulární monoaminové transportéry, čímž dochází k vyčerpání zásob ATP. Následkem je změna distribuce dopaminu, který je ve velkém množství uvolňován z vezikul do cytoplazmy a vyvolává tak oxidativní stres (Dauer, 2003).

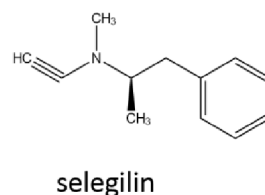
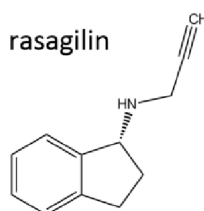
V současné době není k dispozici specifický diagnostický test pro PCH. Diagnostika je založená na neurologickém vyšetření a přítomností „parkinsonismu“, motorického postižení projevující se akinezií, klidovým třesem, ztuhlostí a poruchou chůze. Mimo motorické postižení má pacient také nemotorické příznaky jako jsou například poruchy spánku, psychiatrické obtíže, problémy s chováním a nesamostatností (Zmysłowski, 2019).

4.3.2 Možnosti léčby

Stejně jako u ostatních neurodegenerativních onemocnění, je i u PCH léčba pouze symptomatická. Zlatým standardem pro léčbu PCH je použití prekurzoru dopaminu L-dihydroxyphenylalaninu (L-dopa), který působí jako agonista dopaminových receptorů (Obrázek 7). Preparáty obsahují společně s L-dopou také inhibitory dekarboxylázy, zlepšující absorpci L-dopy v tenkém střevě. Léčba s sebou přináší také komplikace do 5 let po vysazení L-dopy. U 50-60 % pacientů dochází k náhlému zhoršení parkinsonické symptomatiky a výskytu motorických obtíží, projevujících se dyskinezií. Vyskytovat se mohou i psychické obtíže. Další možností je použití inhibitorů monoaminoxidázy B, čímž dochází ke zvýšení množství synaptického dopaminu. V praxi se v časných stádiích nemoci předepisuje selegilin nebo novější a 10–15 krát účinnější lék rasagilin, vhodný i pro pozdní stadia (Obrázek 7). Kromě medikace je při léčení PCH důležitá i fyzioterapie, zahrnující i rehabilitace poruch chůze a nácvič řeči. Nedílnou součástí je adjuvantní terapie, zaměřující se na léčbu především psychických obtíží, spojených s PCH (Rektor, 2009).



L-dihydroxyphenylalanin



Obrázek 7: Struktura léčiv používaných pro léčbu Parkinsonovy choroby.

4.3.3 Genetická predispozice

Převážná většina diagnostikované PCH vzniká sporadicky. Pouze 10 % případů uvádí pozitivní rodinnou anamnézu. S monogenní genetickou predispozicí jsou spojovány mutace v šesti genech. Za autosomálně dominantní formy PCH jsou zodpovědné mutace v genu SNCA a LRRK2. Autosomálně recesivní varianty jsou spojovány s mutacemi ve čtyřech genech. Jedná se o mutace v genu Parkin, PINK1, DJ-1 a ATP13A2 (Klein, 2019).

Prvním objeveným genem spojeným s autosomálně dominantní variantou PCH byl v roce 1997 gen SNCA na chromozomu 4 (Polymeropoulos, 1997). U pacientů s touto mutací se PCH manifestuje v dřívějším věku (< 50 let) a zprvu dobře odpovídají na léčbu pomocí L-dopy. Poté je progresse velmi rychlá (Klein, 2019). Dalším genem souvisejícím s autosomálně dominantní formou PCH je LRRK2, způsobující pozdní formu PCH. Jedná se o velký gen, který kóduje 2527 aminokyselin cytoplazmatického proteinu bohatého na leucin repetitivní kinázu 2 (LRRK2). Jeho patologický efekt není zcela objasněn. Jelikož se jedná o velký protein, mutace v jeho struktuře mohou ovlivnit interakce s dalšími proteiny, což by mohlo způsobit například tvorbu komplexů (Klein, 2019).

Druhým objeveným genem souvisejícím s PCH a zároveň nejčastější mutací u autosomálně recesivní formy je mutace v genu Parkin. Jedná se o druhý nejdelší gen v lidském genomu, kódující protein s modulační aktivitou. Parkin protein se podílí na procesu posttranslačních modifikací tak, že funguje jako E3 ubikvitin ligáza v procesu ubikvitinizace proteinů (Klein, 2019). Druhou mutací u autosomálně recesivní formy je mutace v genu

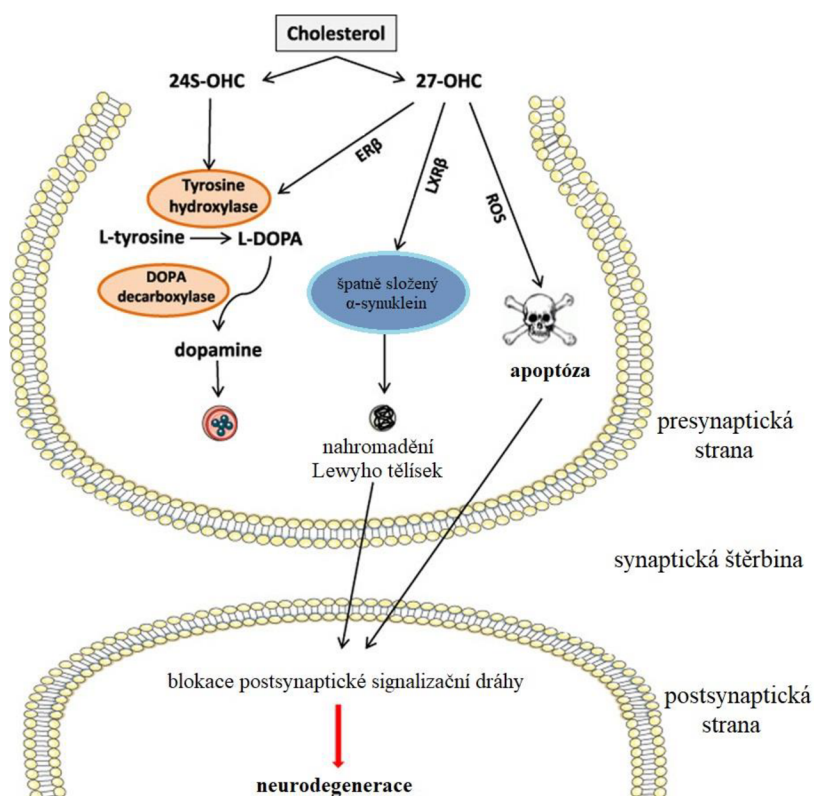
PINK 1. V důsledku mutací dochází k mitochondriálním funkčním defektům a zvyšuje se také citlivost na oxidativní stres, což naznačuje zapojení PINK1 při degradaci v oblasti nigrostriatální dráhy, která vede z oblasti *substantia nigra* do *striata* v mozku (Gautier, 2008). Dalším genem autosomálně recesivní formy je DJ-1, mutovaný pouze u malého procenta časných forem PCH (Pankratz, 2006). DJ-1 kóduje 189 aminokyselin dlouhý protein, fungující jako senzor buněčného stresu (Klein, 2019). Posledním genem, zodpovědným za autosomálně recesivní formu PCH je ATP13A2. Mutace tohoto genu způsobuje atypickou formu PCH označovanou jako Kufor-Rakebův syndrom s progresí v mladém věku (Ramirez, 2006).

4.3.4 Zapojení oxysterolů při patogenezi Parkinsonovy choroby

Jak již bylo dříve zmíněno, charakteristickým znakem PCH je nahromadění proteinu α -synukleinu a snížená hladina dopaminu v důsledku úbytku dopaminergních neuronů. Spojitost mezi oxysteroly a těmito znaky byla zaznamenána ve studii Bosco a kol. (2006). V mozku pacientů s Lewyho tělísky objevily zvýšené hladiny oxidovaných forem cholesterolu, které se podílí na urychlení agregace α -synukleinu a tím se zapojují do patologického procesu (Bosco a kol, 2006).

Rantham Prabhakara (2008) se ve své studii snažil objasnit účinek 24-hydroxycholesterolu a 27-hydroxycholesterolu na expresi α -synukleinu a enzymu tyrosinhydroxylázy, mající vliv na rychlost syntézy dopaminu. Pro studium zvolili buňky SH-SY5Y, které se obvykle používají ke studiu patofyziologie PCH. Výsledky ukázaly zvýšení hladiny tyrosinhydroxylázy vlivem 24-hydroxycholesterolu, zatímco 27-hydroxycholesterol zvyšoval hladiny proteinu α -synukleinu. Testy rovněž ukázaly vliv 27-hydroxycholesterolu na indukci apoptózy. Nejvyšší počet apoptických buněk byl zachycen u 27-hydroxycholesterolu (Rantham Prabhakara, 2008).

Oxysteroly ovlivňují regulaci proteinů, které se zapojují do rozvoje PCH. Molekulární mechanismus regulace zahrnuje dva typy nukleárních receptorů LXR a ER. Je známo, že 27-hydroxycholesterol působí jako endogenní ligand LXR (Doria, 2016). Byla zjištěna vazba 27-hydroxycholesterolu na ER typ β , což způsobuje sníženou expresi tyrosinhydroxylázy, zatímco vazba na LXR má za následek zvýšenou expresi proteinu α -synukleinu (Obrázek 8). Toto zjištění by mohlo v budoucnu představovat návrh terapeutických cílů ke zlepšení progrese PCH (Marwarha, 2011).



Obrázek 8: Vliv 24-hydroxycholesterolu a 27-hydroxycholesterolu na neuronální úrovni.

Převzato z Doria, 2016.

Neurotoxicita je vyvolána i 24-hydroxycholesterolem, který indukující apoptoticky vyvolanou fragmentaci DNA aktivací kaspázy 3 a zvýšením mitochondriálního membránového potenciálu (Kölsch 2001).

Vědci se neustále snaží nalézt specifický biomarker pro PCH, který by pomohl při její diagnostice. Jednou z cest by mohlo být měření oxidovaných lipidů, což by mohlo vést

k objasnění dynamiky oxidačního stresu, který souvisí s rozvojem PCH a řadou jiných onemocnění (Lee a kol., 2009). Lee a kol. (2009) zkoumali hladiny cholesterolu a jeho oxidovaných produktů v plazmě pacientů s potvrzenou diagnózou PCH. V plazmě pacientů našli zvýšené hladiny 7 β -hydroxycholesterolu, 7-ketocholesterolu a 27-hydroxycholesterolu v porovnání se zdravými jedinci (Lee a kol., 2009).

Vědecká skupina Björkhem a kol. (2013) zjišťovala hladiny oxysterolů 24-hydroxycholesterolu a 27-hydroxycholesterolu v mozkomíšním moku a v plazmě. Hladiny zkoumaných oxysterolů byly v obou případech zvýšeny v mozkomíšním moku v porovnání s kontrolní skupinou. 24-hydroxycholesterol by mohl sloužit jako potencionální biomarker pro diagnostiku PCH. Jak i sami autoři zmiňují, je nutné tuto teorii ověřit na početnějším vzorku pacientů. Autoři ovšem nepotvrdili zvýšení hladin oxysterolů v plazmě, jak tomu bylo u studie Lea a kol. (2009).

4.4 Glutamát jako model studia neurodegenerace

Důležitým synaptickým neurotransmiterem v centrálním nervovém systému je glutamát, který je součástí až 40 % všech mozkových synapsí (Blandini, 1996). Podílí se na přenosu nervového vzruchu mezi dvěma nervovými buňkami. Glutamát interaguje skrze celou řadu membránových receptorů, lokalizovaných na postsynaptických neuronech. Z farmakologického hlediska se dělí na N-methyl-D-asparátové receptory (NMDA), receptory kyseliny kainové a receptory α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionové kyseliny. Nejlépe je popsána interakce s NMDA receptorem, který je napojen na membránové kanály vysoce propustné pro Na⁺, K⁺ a Ca²⁺, otevírajících se v závislosti na napětí na membráně (Coyle, 1993).

Glutamátem vyvolaná neurotoxicita prostřednictvím vazby na NMDA receptor je vyvolána masivním vtokem extracelulárních Ca²⁺ do buněk (Meldrum, 1990). V cytoplazmě dochází ke zvýšení Ca²⁺, které aktivují řadu Ca²⁺ dependentních enzymů jako je fosfolipáza A₂, proteinkináza C a dalších. Aktivace enzymů zapojených do katabolismu proteinů, fosfolipidů, nukleových kyselin, může navodit buněčnou smrt několika odlišnými cestami. Zvýšené hladiny Ca²⁺ iontů vedou k aktivaci neuronální syntázy oxidu dusnatého, což vede

k produkci toxických hladin NO vedoucí k mitochondriální dysfunkci nebo poškození endoplazmatického retikula (Kritis, 2015). Mitochondriální dysfunkce je jednou z příčin patologie PCH. Ukázalo se, že oxidativní stres a deficit v elektrotransportním komplexu I v mitochondriích jsou úzce propojeny. Inhibice tohoto komplexu má za důsledek zvýšenou produkci ROS, čímž současně dochází k inhibici komplexu I. Již částečná inhibice komplexu I generuje v mitochondriích zvýšenou produkci ROS a jejich hromadění vyvolává nadměrný oxidativní stres, který způsobuje buněčnou smrt dopaminergních neuronů (Tretter, 2004). Ústřední roli v apoptóze buněk hrají mitochondrie. Vnější mitochondriální membrána se stává propustná vlivem aktivace apoptických molekul jako jsou BAX nebo cytochrom c, které se následně uvolňují do cytosolu, což vede k aktivaci kaspáz a následně k apoptóze. Aktivace apoptické cesty se děje rovněž v důsledku oxidačního stresu nebo při inhibici elektronového transportního řetězce, vedoucí ke kolapsu mitochondriálního membránového potenciálu (Henchcliffe, 2008). U PCH bylo zjištěno, že aktivace kaspázy 3, jako signální molekuly pro apoptózu, způsobuje apoptózu dopaminergních neuronů v oblasti *substantia nigra pars compacta* (Tatton, 2003).

Pro studium cytotoxicity indukované glutamátem se využívá lidské neuroblastomové buněčné linie SH-SY5Y, pocházející z kostní dřeně. SH-SY5Y jsou schopny syntetizovat dopamin a noradrenalin a exprimovat dopaminový transportér jako dopaminergní neurony. Těchto vlastností se využívá při výzkumu PCH, kde SH-SY5Y slouží jako neuronální model (Kritis, 2015).

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Materiál a přístroje

Biologický materiál

Buněčná linie karcinomu děložního čípku Hela, buněčná linie epitelových buněk sítnice oka RPE-1, buněčná linie lidského neuroblastomu SH-SY5Y. Všechny linie pochází z ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures)

Chemikálie

MK 238, MK 238.7, MK 608, steroid 2840/A, steroid A, steroid CH7, heterocyklické oxysteroly 13, 14, 15, 16, 17 (knihovna steroidů - LRR), aceton, benzen, cyklohexan, dichlormethan, ethanol, kyselina octová, methanol, octan sodný, trichlormethan (Penta), ethylformiát, hydroxylamin hydrochlorid, hydrazin hydrát, hydrid sodný, kyselina tetrahydrofuranová, N-methylmorfolin-N-oxid, semikarbazid, thiosemikarbazid, trifluoracetanhydrid (Sigma-Aldrich), silikagel pro kolonovou chromatografii 40 -60 μm (Lach-ner), cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol (Avanti), Dulbeccoho modifikované Eagleho médium (DMEM), dihydroethidium, glutamát, mitochondriální membránový potenciál JC 10 kit, propidium jodid (PI), resazurin, substrát pro kaspázy Ac-DEVD-AFC, kaspázový pufr, ditriothreitol (DTT), fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSP) (Sigma-Aldrich), Calcein AM (ThermoFisher), kit detekce cytotoxicity (LDH) (Roche).

Pomůcky a přístroje

Analytické váhy (Sartorius), automatické pipety (Eppendorf), centrifuga (Holm&Halby), hliníkové TLC destičky potažené silikagelem (Merck), fluorescenční destičkový reader (Labsystem), hmotnostní spektrometr (Agilent Technologies), horkovzdušná pistole (Steinel), inkubátor (Sanyo), laminární box (ThermoFisher Scientific), lyofilizátor (Gregor instruments), magnetická míchačka s ohřevem (IKA), mikrodestičkový reader Infinite M200 Pro (Tecan), NMR spektrometr (JEOL), rotační vakuová odparka (Heidolph), ultrazvuková lázeň (Kraintek), UV lampa s komorou (Spectroline®).

5.2 Metody

5.2.1 Obecný postup při syntéze oxysterolů

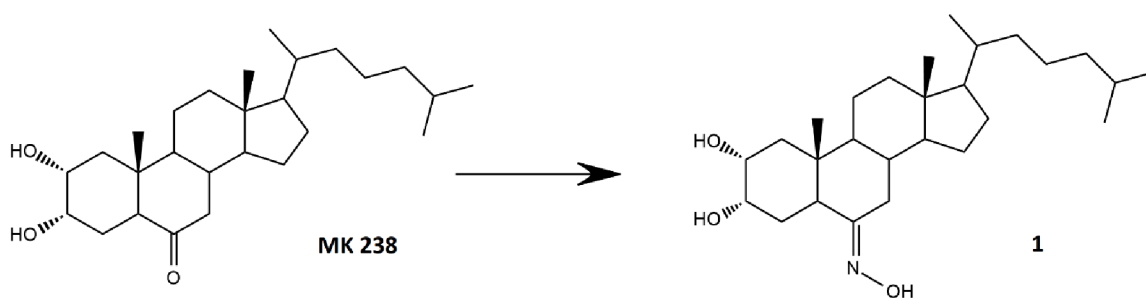
Ke sledování průběhu reakce, čistoty produktu a zjištění mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii byla použita chromatografie na tenké vrstvě. Analýza destiček proběhla ponořením do roztoku obsahujícího 10% kyselinu sírovou v ethanolu a zahřátím pomocí horkovzdušné pistole na 400 °C. Reakce byla následně odpařena na rotační vakuové odparce a přečištěna extrakcí mezi ethylacetátem a vodou. Pro vyčištění produktu byla použita sloupcová chromatografie na silikagelu v mobilní fázi uvedené v konkrétním postupu. Látky byly lyofilizovány v *t* - butanolu. Identifikace získaných látek byla provedena pomocí NMR a MS spektroskopie.

Příprava trifluorperoxyoctové kyseliny:

Do roztoku trifluoracetanhydridu (2,14 ml) v dichloromethanu (20 ml) byl přidán 30% roztok peroxidu vodíku (0,5 ml). Směs byla protřepávána až do vymizení kapek vody v dichlormethanu. Takto připravený roztok trifluorperoxyoctové kyseliny byl hned použit pro přípravu laktonů.

5.2.1.1 Příprava látky 1

Ke směsi steroidu **MK 238** (30 mg; 0,072 mmol) a hydroxylaminu hydrochloridu (10 mg; 0,072 mmol) v ethanolu (10 ml) byl přidán octan sodný (25 mg; 0,20 mmol). Reakční směs byla míchána 18 hodin při pokojové teplotě. Směs byla přečištěna extrakcí mezi ethylacetátem a vodou. Po odpaření organické fáze na rotační vakuové odparce bylo získáno 30 mg (96 %) bílé látky ve formě prášku.

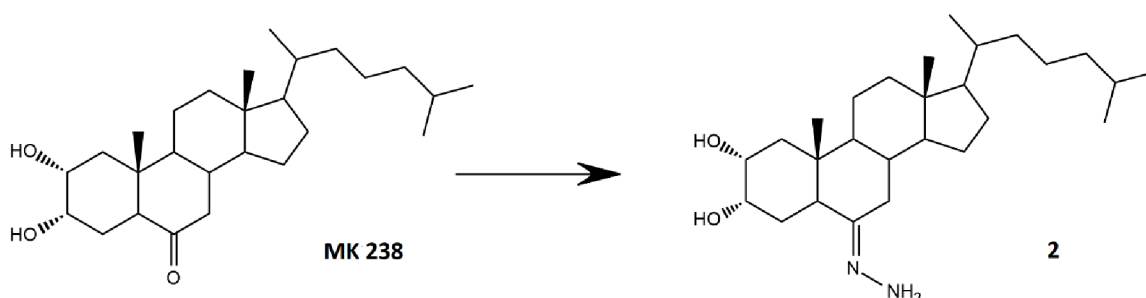


Obrázek 9: Schéma přípravy látky 1.

(6E)-2 α ,3 α -Dihydroxy-5 α -cholestan-6-on oxim (1): ^1H NMR ($\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$) δ 0,60 (s, 3H, CH_3); 0,69 (s, 3H, CH_3); 0,81 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,82 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,86 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 1,66-1,71 (m, 2H); 1,77-1,87 (m, 2H); 1,97 (m, 1H); 2,37 (dd, 1H, $J = 12,8$, $J' = 2,8$ Hz); 3,26 (dd, 1H, $J = 13,4$, $J' = 4,3$ Hz); 3,66 (m, 1H, H-2 β); 3,95 (bs, 1H, H-3 β). ^{13}C NMR δ 11,91; 12,76; 18,48; 20,99; 22,40; 23,67; 23,91; 27,65; 27,88; 28,01; 29,68; 35,36; 35,39; 35,96; 39,34; 39,44; 39,51; 40,35; 42,75; 43,16; 53,97; 55,94; 56,41; 57,83; 68,14; 68,29; 161,42. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{NO}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 434,3634; nalezeno 434,3636.

5.2.1.2 Příprava látky 2

Směs steroidu **MK 238** (30 mg; 0,072 mmol), 80 % hydrazinu hydrátu (30 μ l; 0,093 mmol) a kyseliny octové (40 μ l) byla rozpuštěna v ethanolu (10 ml). Reakční směs byla míchána 18 hodin při pokojové teplotě. Směs byla následně přečištěna extrakcí mezi ethylacetátem a vodou. Po odpaření organické fáze na rotační vakuové odparce bylo získáno 30 mg (96 %) látky v podobě bílého prášku.

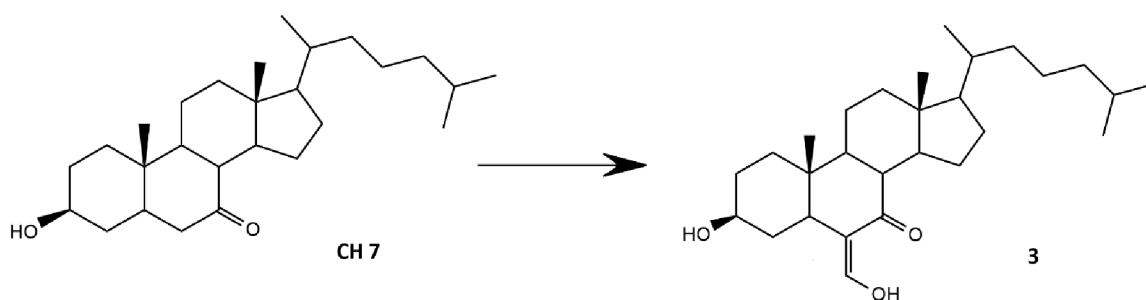


Obrázek 10: Schéma přípravy látky 2.

(6E)-6-Hydrazono-5 α -cholestan-2 α ,3 α -diol (2): ¹H NMR (CDCl₃) δ 0,63 (s, 3H, CH₃); 0,77 (s, 3H, CH₃); 0,85 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 0,86 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 0,90 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 1,75 (m, 1H); 1,84 (m, 1H); 2,01 (m, 1H); 2,45 (dd, 1H, J = 12,5, J' = 3,1 Hz); 2,89 (dd, 1H, J = 13,3, J' = 4,4 Hz); 3,66 (m, 1H, H-2 β); 3,95 (bs, 1H, H-3 β). ¹³C NMR δ 12,05; 13,09; 18,60; 21,14; 22,52; 22,78; 23,78; 23,96; 27,96; 28,07; 28,21; 33,14; 35,70; 35,88; 36,06; 39,43; 39,57; 40,18; 40,88; 42,86; 44,75; 54,21; 56,05; 56,58; 68,52; 68,80; 164,37. HRMS (API+) vypočítáno pro C₂₇H₄₉N₂O₂ ([M+H]⁺) 433.3794; nalezeno 433,3790.

5.2.1.3 Příprava látky 3

Směs steroidu **CH 7** (50 mg; 0,124 mmol), ethylformiátu (0,5 ml; 0,007 mmol), hydridu sodného (30 mg; 1,25 mmol) byla rozpuštěna v benzenu (3 ml). Reakční směs byla míchána při pokojové teplotě 3 dny. Následně byla přečištěna extrakcí mezi ethylacetátem a vodou. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit 30-40% ethylacetát v cyklohexanu. Po vyčištění bylo získáno 26 mg (49 %) v podobě bílého prášku.

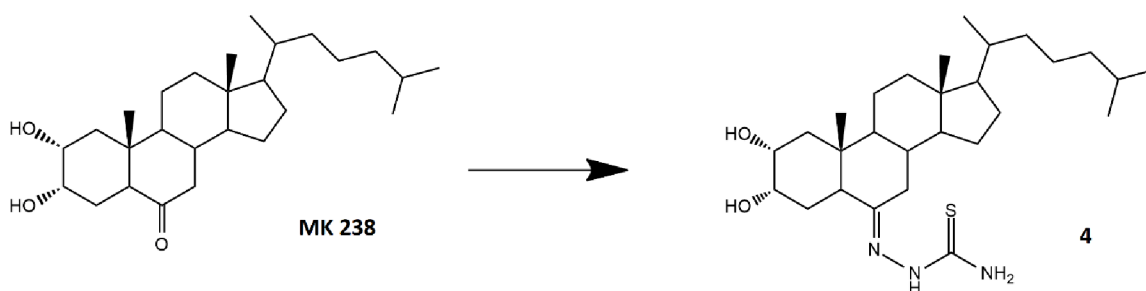


Obrázek 11: Schéma přípravy látky 3.

(6E)-3 β -Hydroxy-6-hydroxymethylen-5 α -cholestan-7-on (3): ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,73 (s, 3H, CH_3); 0,77 (s, 3H, CH_3); 0,86 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,87 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,92 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 1,81-1,91 (m, 2H); 1,98 (m, 1H); 2,04 (dt, 1H, $J = 12,5$, $J' = 3,4$ Hz); 2,08 (m, 1H); 2,21-2,28 (m, 2H, H-5 α , H-8 β); 3,68 (m, 1H, H-3 α); 7,91 (d, 1H, $J = 6,1$ Hz, H_{methylene}). ^{13}C NMR δ 11,31; 12,29; 18,77; 21,69; 22,53; 22,80; 23,85; 26,04; 27,98; 28,50; 30,81; 32,93; 34,09; 34,65; 35,84; 36,12; 39,43; 39,73; 42,97; 44,54; 44,86; 52,09; 52,80; 55,18; 70,78; 111,82; 173,83; 199,63. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 431,3525; nalezeno 431,3528.

5.2.1.4 Příprava látky 4

Směs steroidu **MK 238** (50 mg; 0,12 mmol) a thiosemikarbazidu (20 mg; 0,073 mmol) byla rozpuštěna v ethanolu (10 ml) a byl přidán 1 ml kyseliny octové. Reakční směs byla míchána při 70 °C 18 hodin. Následně byla přečištěna extrakcí mezi ethylacetátem a vodou s 10 % hydrogenuhličitanem sodným. Po odpaření organické fáze byl produkt vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit 4-6% methanol v chloroformu. Bylo získáno 32 mg (54 %) produktu v podobě bílého prášku.

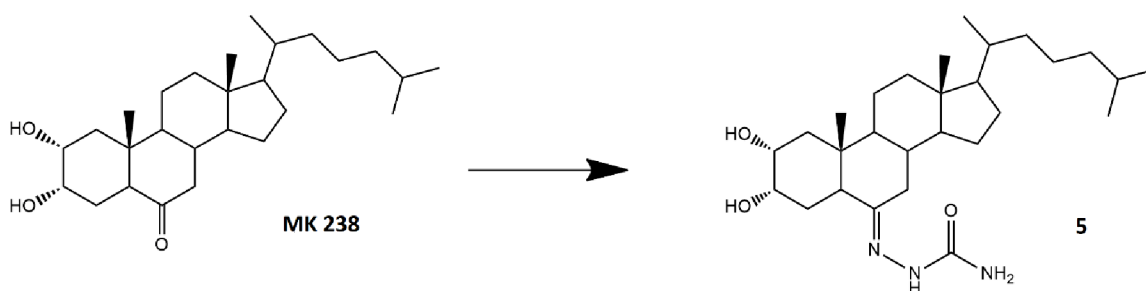


Obrázek 12: Schéma přípravy látky 4.

(6E)-2-(2 α ,3 α -Dihydroxy-5 α -cholestan-6-ylidene)hydrazinekarbothioamid (4): ¹H NMR (CDCl₃+CD₃OD) δ 0,62 (s, 3H, CH₃); 0,67 (s, 3H, CH₃); 0,83 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH₃); 0,84 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH₃); 0,88 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH₃); 1,69-1,75 (m, 2H); 1,80-1,92 (m, 2H); 1,99 (m, 1H); 2,44 (dd, 1H, $J = 12,5$, $J' = 2,8$ Hz); 2,69 (m, 1H, překryt signálem H₂O); 3,68 (m, 1H, H-2 β); 3,97 (m, 1H, H-3 β). ¹³C NMR δ 11,91; 12,91; 18,51; 21,03; 22,44; 22,70; 23,67; 24,00; 27,90; 27,96; 28,00; 31,65; 35,56; 35,59; 35,96; 39,35; 39,65; 40,90; 42,92; 44,80; 46,68; 53,95; 55,92; 56,24; 68,14; 68,33; 156,90; 1 \times C nenalezen. HRMS (API+) vypočítáno pro C₂₈H₅₀N₃O₂S ([M+H]⁺) 492,3624; nalezeno 492,3629.

5.2.1.5 Příprava látky 5

Směs steroidu **MK 238** (50 mg; 0,12 mmol), semikarbazidu (20 mg, 0,03 mmol) a octanu sodného trihydrátu (15 mg; 0,11 mmol) byla rozpuštěna v ethanolu (10 ml). Reakční směs byla míchána při 70 °C 18 hodin. Následně byla přečištěna extrakcí mezi ethylacetátem a vodou. Po odpaření organické fáze byl produkt vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit 5-7% methanol v chloroformu. Bylo získáno 50 mg (88 %) produktu v podobě bílého prášku.

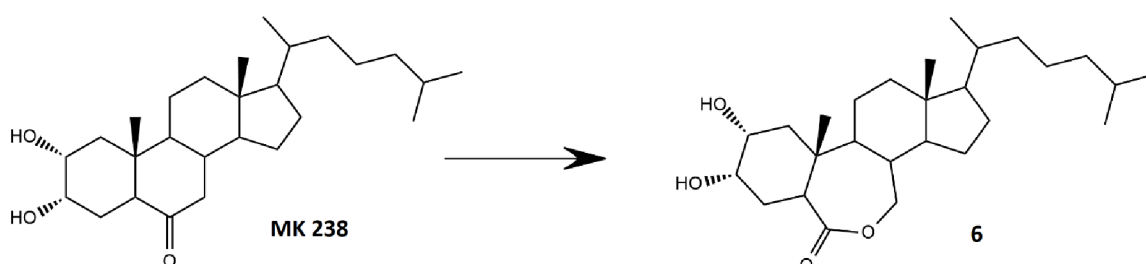


Obrázek 13: Schéma přípravy látky 5.

(6E)-2-(2 α ,3 α -Dihydroxy-5 α -cholestan-6-ylidene)hydrazinekarboamid (5): ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 0,607 (s, 3H, CH₃); 0,611 (s, 3H, CH₃); 0,84 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 0,85 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 0,89 (d, 3H, J = 6,5 Hz, CH₃); 1,76-1,82 (m, 1H); 1,95 (d, 1H, J = 11,6 Hz); 2,27 (dd, 1H, J = 11,6, J' = 3,4 Hz); 2,90 (dd, 1H, J = 13,8, J' = 3,7 Hz); 3,47 (m, 1H, H-2 β); 3,77 (bs, 1H, H-3 β); 4,10 (d, 1H, J = 2,1 Hz, OH); 4,26 (d, 1H, J = 6,1 Hz, OH); 6,08 (vb s, 2H, NH₂). ^{13}C NMR δ 11,91; 12,94; 18,54; 20,81; 22,45; 22,71; 23,22; 23,75; 27,43; 27,79; 28,71; 31,67; 35,22 (2 \times C); 35,65; 38,96; 38,98; 39,07; 42,47; 44,47; 53,74; 55,57; 56,08; 67,44; 67,99; 152,56; 157,92; 1 \times C nenalezen. HRMS (API+) vypočítáno pro C₂₈H₅₀N₃O₃ ([M+H]⁺) 476,3852; nalezeno 476,3854.

5.2.1.6 Příprava látky 6

Do roztoku steroidu **MK 238** (50 mg; 0,12 mmol) v dichlormetanu (4 ml) byla přidána trifluorperoxyoctová kyselina v CH_2Cl_2 (10 ml). Reakční směs byla míchána 1 hodinu při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidáním 7 ml nasyceného roztoku siřičitanu sodného. Následně byla přečištěna extrakcí mezi ethylacetátem a vodou s přidavkem nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Po odpaření organické fáze byl produkt vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit 80% ethylacetát v cyklohexanu. Bylo získáno 30 mg (58 %) produktu v podobě bílého prášku.

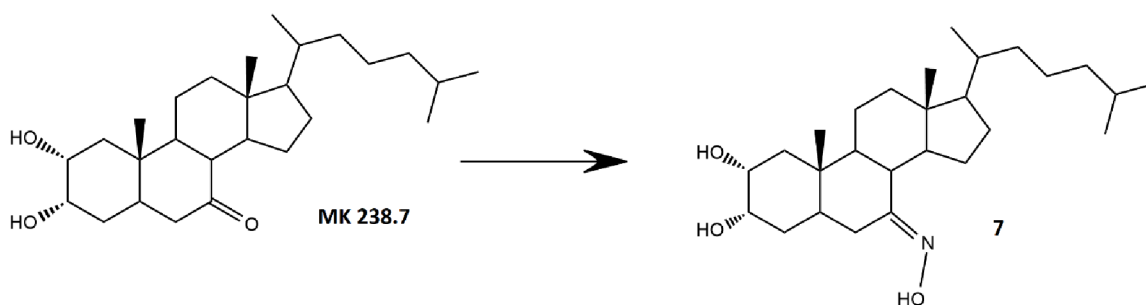


Obrázek 14: Schéma přípravy látky 6.

2 α ,3 α -Dihydroxy-7 α -homo-7-oxa-5 α -cholestan-6-on (6): ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,68 (s, 3H, CH_3); 0,85 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,86 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,89 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 0,90 (s, 3H, CH_3); 1,81-1,87 (m, 2H); 1,92 (td, 1H, $J = 15,4$, $J' = 4,1$ Hz); 1,99 (td, 1H, $J = 12,8$, $J' = 3,1$ Hz); 2,11 (ddd, 1H, $J = 15,1$, $J' = 12,6$, $J'' = 2,0$ Hz); 3,11 (dd, 1H, $J = 12,2$, $J' = 4,6$ Hz); 3,69 (m, 1H, H-2 β); 4,00 (m, 1H, H-3 β); 4,04-4,11 (m, 2H, 2 \times C7 α -H). ^{13}C NMR δ 11,73; 15,42; 18,50; 22,14; 22,50; 22,76; 23,75; 24,78; 27,90; 27,93; 31,01; 35,66; 35,92; 38,24; 39,03; 39,37; 39,52; 40,51; 40,90; 41,30; 42,53; 51,25; 55,97; 58,11; 68,02; 70,60; 176,69. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 435,3474; nalezeno 435,3476.

5.2.1.7 Příprava látky 7

Ke směsi steroidu **MK 238.7** (30 mg; 0,072 mmol) a hydroxylaminu hydrochloridu (10 mg; 0,072 mmol) v ethanolu (10 ml) byl přidán octan sodný (25 mg; 0,20 mmol). Reakční směs byla míchána 24 hodin při pokojové teplotě. Směs byla přečištěna extrakcí mezi ethylacetátem a vodou. Po odpaření organické fáze na rotační vakuové odparce bylo získáno 30 mg (96 %) podobě bílého prášku.

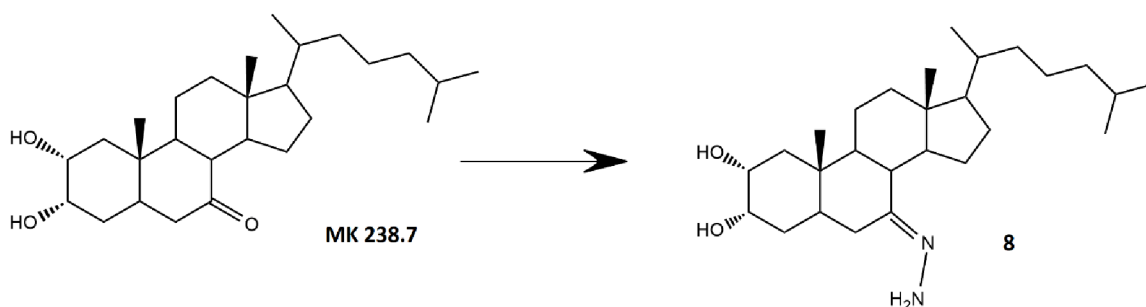


Obrázek 15: Schéma přípravy látky 7.

(7E)-2 α ,3 α -Dihydroxy-5 α -cholestan-7-on oxim (7): ^1H NMR ($\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$) δ 0,60 (s, 3H, CH_3); 0,78 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,79 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,84 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 0,89 (s, 3H, CH_3); 1,78 (m, 1H); 1,94 (m, 1H); 2,05-2,12 (m, 2H); 3,01 (dd, 1H, $J = 12,8$, $J' = 3,1$ Hz); 3,65 (m, 1H, H-2 β); 3,86 (m, 1H, H-3 β). ^{13}C NMR δ 11,76; 11,81; 18,59; 20,71; 22,32; 22,56; 23,62; 25,27; 27,12; 27,80; 28,06; 33,94; 35,50; 35,95; 37,29; 38,58; 39,14; 39,28; 40,00; 41,54; 42,52; 48,95; 54,91; 55,17; 68,43; 68,70; 163,34. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{NO}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 434,3634; nalezeno 434,3642.

5.2.1.8 Příprava látky 8

Směs steroidu **MK 238.7** (30 mg; 0,072 mmol) a 80 % hydrazinu hydrátu (30 μ l; 0,093 mmol) byla rozpuštěna v 7 ml ethanolu. Reakce byla míchána při 70 °C 18 hodin. Produkt byl extrahován mezi ethylacetátem a vodou. Po odpaření organické fáze na rotační vakuové odparce bylo získáno 25 mg (81 %) bílé látky.

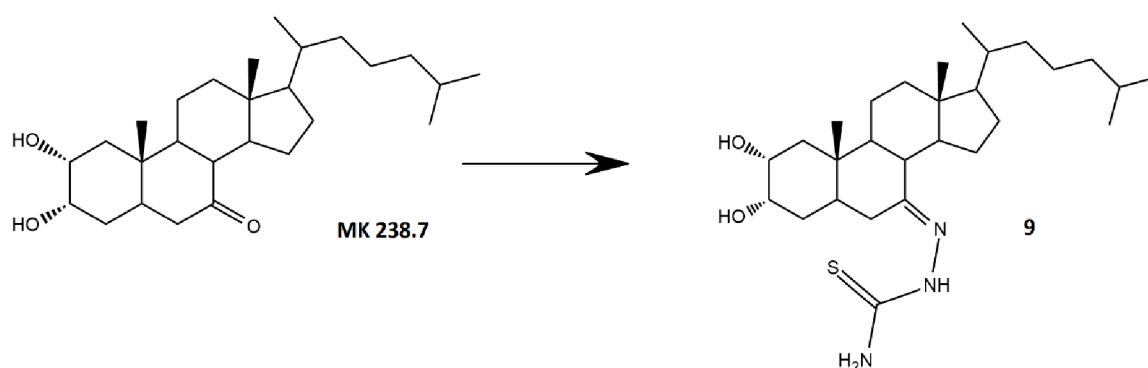


Obrázek 16: Schéma přípravy látky 8.

(7E)-7-Hydrazono-5 α -cholestan-2 α ,3 α -diol (8): ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,68 (s, 3H, CH_3); 0,86 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,87 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,92 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 0,96 (s, 3H, CH_3); 1,75 (m, 1H); 1,87 (m, 1H); 2,02 (m, 1H); 2,17 (t, 1H, $J = 10,9$ Hz); 2,24 (m, 1H); 2,58 (bd, 1H, $J = 11,0$ Hz); 3,74 (m, 1H, H-2 β); 3,91 (m, 1H, H-3 β). ^{13}C NMR δ 12,01; 12,26; 18,88; 21,01; 22,54; 22,80; 23,72; 25,33; 27,99; 28,27; 29,68; 30,46; 34,89; 35,61; 36,13; 37,49; 38,88; 39,47; 40,10; 40,95; 42,46; 43,49; 49,34; 55,07; 56,79; 68,83; 69,50; 163,68. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 433.3794; nalezeno 433.3794.

5.2.1.9 Příprava látky 9

Směs steroidu **MK 238.7** (50 mg; 0,12 mmol) a thiosemikarbazidu (20 mg; 0,21 mmol) byla rozpuštěna v ethanolu (10 ml) a byl přidán 1 ml kyseliny octové. Reakční směs byla míchána při 70 °C 2 dny. Následně byla reakce přečištěna extrakcí mezi ethylacetátem a vodou s 10 % hydrogenuhličitanem sodným. Po odpaření byl produkt vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit 2-3% methanol v chloroformu. Bylo získáno 40 mg (70 %) produktu podobě bílého prášku.

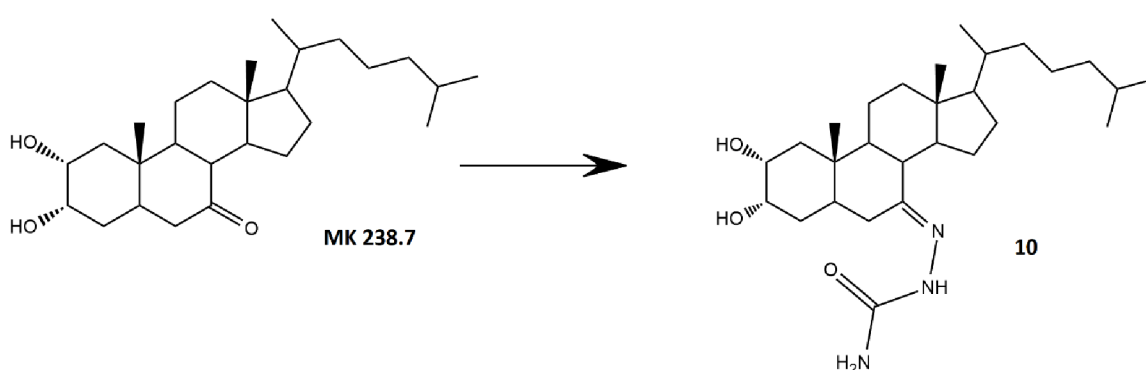


Obrázek 17: Schéma přípravy látky 9.

((7E)-2-(2 α ,3 α -Dihydroxy-5 α -cholestan-7-ylidene)hydrazinekarbothioamid (9): ¹H NMR (CDCl₃+CD₃OD) δ 0,64 (s, 3H, CH₃); 0,82 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 0,83 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 0,89 (d, 3H, J = 6,5 Hz, CH₃); 0,94 (s, 3H, CH₃); 1,78-1,88 (m, 2H); 1,94-2,05 (m, 2H); 2,19 (t, 1H, J = 10,8 Hz); 2,39 (d, 1H, J = 10,8 Hz); 3,68 (m, 1H, H-2 β); 3,91 (m, 1H, H-3 β). ¹³C NMR δ 11,87; 11,96; 18,64; 20,87; 22,37; 22,63; 23,66; 25,58; 27,87; 28,09; 29,76; 29,77; 33,95; 35,43; 35,98; 37,48; 38,43; 39,33; 39,85; 42,58; 43,58; 49,05; 54,91; 55,65; 68,33; 68,52; 159,56; 1 \times C nenalezen. HRMS (API+) vypočítáno pro C₂₈H₅₀N₃O₂S ([M+H]⁺) 492,3624; nalezeno 492.3631.

5.2.1.10 Příprava látky 10

Směs steroidu **MK 238.7** (50 mg; 0,12 mmol), semikarbazidu (20 mg; 0,03 mmol) a octanu sodného trihydrátu (15 mg; 0,11 mmol) byla rozpuštěna v ethanolu (10 ml). Reakční směs byla míchána při 70 °C 2 dny. Následně byla reakce přečištěna extrakcí mezi ethylacetátem a vodou. Po odpaření byl produkt vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit 5-9% methanol v chloroformu. Bylo získáno 50 mg (88 %) produktu podobě bílého prášku.

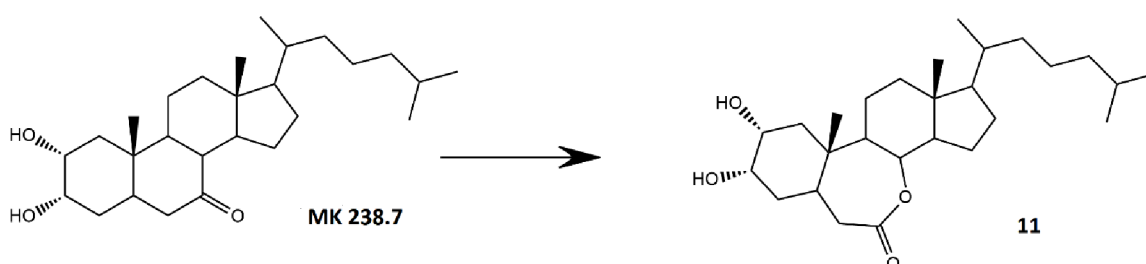


Obrázek 18: Schéma přípravy látky 10.

(7E)-2-(2 α ,3 α -Dihydroxy-5 α -cholestan-7-ylidene)hydrazinekarboamid (10): ¹H NMR (CDCl₃+CD₃OD) δ 0,63 (s, 3H, CH₃); 0,81 (d, 3H, *J* = 6,7 Hz, CH₃); 0,82 (d, 3H, *J* = 6,7 Hz, CH₃); 0,88 (d, 3H, *J* = 6,5 Hz, CH₃); 0,93 (s, 3H, CH₃); 1,82 (m, 1H); 1,96 (m, 1H); 2,05 (m, 1H); 2,13 (t, 1H, *J* = 11,0 Hz); 2,34 (d, 1H, *J* = 12,2 Hz); 3,68 (m, 1H, H-2 β); 3,92 (m, 1H, H-3 β). ¹³C NMR δ 11,87; 12,03; 18,67; 20,84; 22,40; 22,66; 23,74; 25,56; 27,89; 28,15; 29,26; 33,88; 35,52; 36,03; 37,49; 38,57; 39,35; 39,54; 40,22; 42,58; 43,34; 49,22; 55,00; 55,62; 68,56; 68,82; 156,72; 159,13. HRMS (API+) vypočítáno pro C₂₈H₅₀N₃O₃ ([M+H]⁺) 476,3852; nalezeno 476,3852.

5.2.1.11 Příprava látky 11

Ke směsi steroidu **MK 238.7** (50 mg; 0,12 mmol) a dichlormetanu (4 ml) byla přidána trifluorperoxyoctová kyselina (10 ml). Reakční směs byla míchána 1 hodinu při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidáním 7 ml nasyceného roztoku siřičitanu sodného. Následně byla přečištěna extrakcí mezi ethylacetátem a vodou s 10% hydrogenuhličitanem sodným. Po odpaření organické fáze byl produkt vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit 5% methanol v chloroformu. Bylo získáno 50 mg (96 %) produktu v podobě bílého prášku.

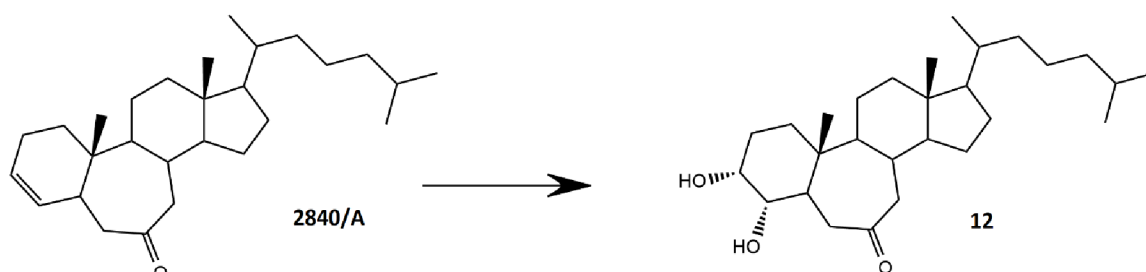


Obrázek 19: Schéma přípravy látky 11.

2 α ,3 α -Dihydroxy-7 α -homo-7 α -oxa-5 α -cholestan-7-on (11): $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 0,66 (s, 3H, CH_3); 0,85 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,86 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,90 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 0,98 (s, 3H, CH_3); 1,65 (m, 1H); 1,73 (m, 1H); 1,81 (dd, $J = 12,4$, $J' = 4,4$ Hz); 1,85-2,02 (m, 6H); 2,09 (m, 1H); 2,69 (dd, 1H, $J = 14,4$, $J' = 11,0$ Hz); 3,63 (m, 1H, H-2 β); 3,93 (m, 1H, H-3 β); 4,17 (dd, 1H, $J = 10,4$, $J' = 8,3$ Hz, H-8 β). $^{13}\text{C NMR}$ δ 11,51; 12,92; 18,56; 22,34; 22,49; 22,75; 23,95; 25,02; 27,86; 27,91; 35,01; 35,50; 35,96; 36,42; 36,62; 38,30; 39,34; 39,60; 40,34; 43,10; 52,15; 54,27; 56,16; 68,00; 68,57; 79,58; 175,92. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 435,3474; nalezeno 435,3475.

5.2.1.12 Příprava látky 12

Ke směsi steroidu **2840/A** (50 mg; 0,14 mmol) a N-methylmorpholin-N-oxidu (55 mg; 0,47 mmol) byl přidán tetrahydrofuran (4 ml), aceton (4 ml), voda (1,5 ml) a oxid osmičelý v *t*-butanolu (0,1 ml). Reakční směs byla míchána 18 hodin při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidáním 7 ml nasyceného roztoku siřičitanu sodného a byla míchána po dobu 10 minut. Následně byla reakce přečištěna extrakcí mezi ethylacetátem a vodou. Po odpaření organické fáze byl produkt vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit 70-80% ethylacetát v cyklohexanu. Bylo získáno 16 mg (26 %) produktu v podobě bílého prášku.



Obrázek 20: Schéma přípravy látky 12.

3 α ,4 α -Dihydroxy-7 α -homo-5 α -cholestan-7-on (12): $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 0,66 (s, 3H, CH_3); 0,81 (s, 3H, CH_3); 0,86 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,87 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,89 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 1,77-1,85 (m, 3H); 2,02 (m, 1H); 2,29-2,39 (m, 2H); 2,49 (t, 1H, $J = 11,5$ Hz); 3,00 (bd, 1H, $J = 17,1$ Hz); 3,30 (m, 1H, H-4 β); 3,95 (bs, 1H, H-3 β). $^{13}\text{C NMR}$ δ 11,73; 14,27; 18,50; 22,53; 22,79; 23,03; 23,78; 25,85; 26,51; 27,58; 27,98; 32,39; 35,75; 35,92; 36,31; 39,44; 39,95; 40,57; 42,29; 42,69; 44,63; 47,73; 56,08; 56,39; 58,66; 68,59; 73,39; 215,08. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{28}\text{H}_{49}\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 433,3682; nalezeno 433,3679.

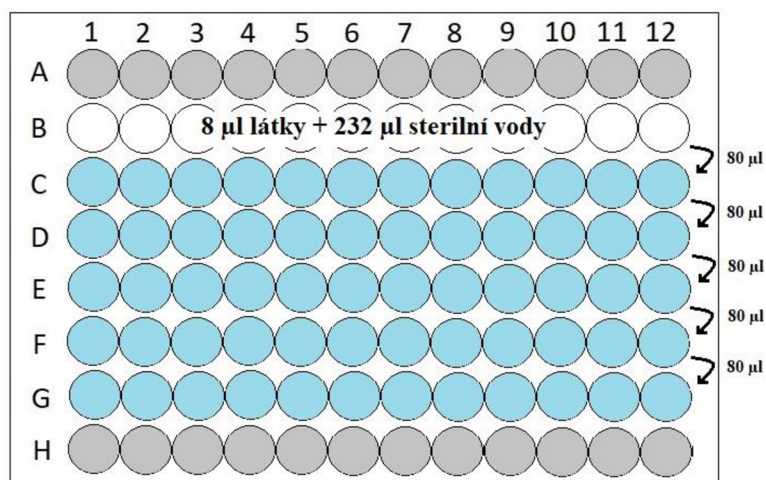
5.2.2 Testování cytotoxické aktivity na nádorových a nenádorových buňkách

Cytotoxická aktivita připravených oxysterolů byla testována na nádorové linii buněk HeLa, odvozené od karcinomu děložního čípku, a nenádorové linii epitelových buněk sítnice oka RPE-1.

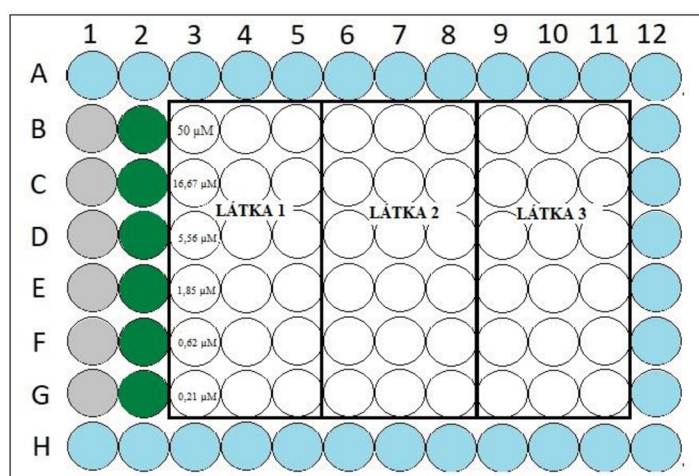
Den před aplikací látek byla připravena 96 jamková mikrotitrační destička, obsahující 5000 buněk v jedné jamce. Sloupec 1 (řádky B–G) obsahoval 100 μ l média 10% DMEM, sloužícího jako blank pro závěrečné měření. Jako kontrola bylo použito 100 μ l buněk v 10% médiu DMEM, nacházejícího se ve sloupci 2 (řádky B–G). Do zbylých jamek (sloupec 12 a řada A, H) bylo pipetováno 130 μ l sterilní vody, která plnila funkci ochrany před vyschnutím jamek s buňkami. Ve sloupcích 3–11 (řádky B–G) bylo pipetováno 80 μ l buněk v 10% DMEM médiu.

Připravené látky byly rozpuštěny v DMSO tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 7,5 mM. Následně byla v laminárním boxu připravena koncentrační řada v 96-jamkové mikrotitrační destičce. Do jednotlivých jamek v řádku B bylo pipetováno 8 μ l připravené látky o koncentraci 7,5 mM a 232 μ l sterilní vody. Do jamek (řádky C–G) bylo pipetováno 160 μ l sterilní vody. Koncentrační řada byla vytvořena tzv. trojkovou řadou, kdy po promíchání bylo z řádku B přeneseno 80 μ l naředěného roztoku do řádku C. Stejný postup byl opakován, až po řádek G (Obrázek 21). Následně bylo přeneseno 20 μ l zředěných látek do destičky s buňkami. Výsledná koncentrační řada látek v jamkách s buňkami byla 50–16,67–5,56–1,85–0,62–0,21 μ M. Na jednu mikrotitrační destičku mohly být umístěny nejvýše 3 testované látky v triplicátech (Obrázek 22). Destičky s buňkami a látkami byly inkubovány v inkubátoru po dobu 72 hodin při 37 °C a 5 % CO₂.

Po skončení inkubační doby bylo do sloupců 1–11 (řádky B–G) pipetováno 20 μ l barviva resazurinu o koncentraci 125 μ g/ml, sloužícího jako indikátor životaschopnosti buněk. Destičky byly po aplikaci barviva inkubovány při 37 °C a 5 % CO₂ po dobu 3 hodin. Po uplynutí doby inkubace byla změřena fluorescence na fluorescenčním destičkovém readeru při hodnotách excitace/emise 544/590 nm. Ze získaných hodnot byla stanovena hodnota IC₅₀. Jedná se o inhibiční koncentraci látek, kdy se životaschopnost buněk sníží na 50 % v porovnání s kontrolou.



Obrázek 21: Schéma ředění testovaných oxysterolů. Každá látka měla svůj vlastní sloupec. Do řádku B bylo pipetováno 8 µl připravené látky o koncentraci 7,5 mM a 232 µl sterilní vody. Do jamek řádků C–G bylo nanášeno 160 µl sterilní vody. Po promíchání bylo z řádku B přeneseno 80 µl naředěného roztoku do řádku C. Postup se opakoval až po řádek G. Řádky A a H (vyznačeny šedě) byly prázdné.



Obrázek 22: Schéma destičky pro testování připravených oxysterolů. Šedou barvou jsou označeny jamky, obsahující pouze 10 % DMEM médium, které slouží jako blank při závěrečném měření. Zelenou barvou je znázorněna kontrola v podobě 100 µl buněk v 10% médiu DMEM. Modrou barvou je znázorněno 130 µl sterilní vody, které plní ochranou funkci při vyschnutím jamek. Na jedné destičce bylo možno testovat pouze 3 látky v triplikátu. Ve sloupci 3 jsou uvedeny výsledné koncentrace testovaných látek, které jsou u všech látek totožné.

5.2.3 Příprava buněk SH-SY5Y pro testování

Před testováním byly připraveny 96-jamkové mikrotitrační destičky s buňkami obsahující 7000 nebo 20 000 buněk SH-SY5Y v jedné jamce ve sloupcích 2-12 (řádky B–G), dle typu testu. Buňky byly inkubovány v DMEM/F12 médiu s 10% obsahem fetálního bovinního séra (FBS) a 1% přídatkem antibiotika penicilinu a streptomycinu. Řada A a H a sloupec 1 obsahovaly 100 μ l média 1% DMEM, které plnilo funkci ochrany před vyschnutím jamek s buňkami. Po 24 hodinové inkubaci při 37 °C a 5 % CO₂ byly buňky diferencovány za pomoci *all-trans* retinové kyseliny o koncentraci 10 μ M v 1% FBS DMEM/F12. Proces diferenciaci SH-SY5Y do neuronálního fenotypu vyžadoval 48 hodinovou inkubaci při 37 °C a 5 % CO₂.

5.2.4 Příprava koncentrační řady syntetizovaných látek

Před každým testováním byla vytvořena koncentrační řada syntetizovaných oxysterolů. Připravené látky byly rozpuštěny v DMSO tak, aby výsledná koncentrace v mikrozkuhavce byla 10 μ M. Koncentrační řada byla následně připravena v 96-jamkové mikrotitrační destičce v laminárním boxu. Do zkuhavky typu eppendorf bylo pipetováno 499 μ l média obsahující glutamát o koncentraci 160 mM a 0,5 μ l syntetizované látky. Po promíchání na vortexu bylo 360 μ l zředěné látky v mikrozkuhavce přeneseno do řádku A mikrotitrační destičky. Do řady mikrotitrační destičky B a C bylo pipetováno 315 μ l média obsahující glutamát o koncentraci 160 mM. Koncentrační řada byla vytvořena tak, že z řádku A bylo přeneseno 35 μ l naředěného roztoku do řádku B. Stejný postup byl opakován i s řadou B. Další koncentrační řady dalších látek vznikaly obdobným postupem v řadě D–F. Následně bylo přeneseno 100 μ l naředěných roztoků látek do destičky s diferencovanými buňkami. Výsledná koncentrační řada látek v jamkách s buňkami byla 10–1–0,1 μ M.

5.2.5 Testování cytotoxicity na buňkách SH-SY5Y

Cytotoxicita připravených oxysterolů byla zkoumána na buňkách SH-SY5Y. Na tento test byly připraveny 96-jamkové mikrotitrační destičky, obsahující 7000 buněk v jamce. Prvním krokem bylo odsátí média, v jednotlivých jamkách (řádky B–G) bez narušení buněk, usedlých

na dně jamky. Odsáty byly nejprve sloupce 1–5. K buňkám ve sloupcích 3–5 bylo následně pipetováno 100 μ l naředěných roztoků látek připravených postupem zaznamenaných v podkapitole 5.2.4 s tím rozdílem, že látky byly rozpuštěny v 1% DMEM/F12 namísto média obsahujícího glutamát o koncentraci 160 mM. Po aplikaci látek v triplikátu byla odsáta zbylá část desky a postup byl opakován. Do sloupce 1 bylo pipetováno 100 μ l DMEM/F12, sloužícího jako blank. Jako kontrola byly použity buňky ve sloupci 2 se 100 μ l 1% DMEM/F12 s DMSO (0.1% v/v). Mikrotitrační destička byla inkubována po dobu 24 hodin při 37 °C a 5 % CO₂. Po uplynutí doby inkubace bylo k buňkám s látkami přidáno 100 μ l 0,75 μ M roztoku Calceinu v PBS a ponecháno inkubovat po dobu 50 minut v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂. Počet životaschopných buněk byl vyhodnocen na základě dat získaných z mikrodestičkového readeru při vlnové délce excitace/emise 495/517 nm.

5.2.6 Test buněčné smrti

Cytotoxická aktivita připravených látek byla zkoumána pomocí modelu glutamátem indukované buněčné smrti na diferencovaných buňkách SH-SY5Y. Na tento test byly připraveny 96-jamkové mikrotitrační destičky, obsahující 20 000 buněk v jedné jamce. Prvním krokem bylo odsátí média, v jednotlivých jamkách (řádky B–G) bez narušení buněk, usedlých na dně jamky. Odsáty byly nejprve sloupce 1–5. K buňkám ve sloupcích 3–5 bylo následně pipetováno 100 μ l naředěných roztoků látek, připravených postupem zaznamenaným v podkapitole 5.2.4. Po aplikaci látek v triplikátu byla odsáta zbylá část desky a postup byl opakován. Do sloupce 1 bylo pipetováno 100 μ l 1% DMEM/F12, sloužícího jako blank. Jako pozitivní kontrola byly použity buňky se 100 μ l 1% DMEM/F12 s DMSO (0.1% v/v). Naopak jako negativní kontrola byly použity buňky se 100 μ l média obsahující glutamát o koncentraci 160 mM. Kontroly byly umístěny dle schématu (Obrázek 23). Mikrotitrační destička byla inkubována po dobu 24 hodin při 37 °C a 5 % CO₂. Po inkubaci buněk s látkami v glutamátovém médiu bylo přidáno 100 μ l roztoku obsahující propidium jodid v PBS o celkové koncentraci 1 μ g/mL. Měření fluorescence proběhlo po 15 minutové inkubaci ve tmě za pokojové teploty na mikrodestičkovém readeru při hodnotách excitace/emise 535/617 nm.

Další z testů použitým testem buněčné smrti byl zaměřený na měření enzymu laktát dehydrogenázy (LDH) s využitím komerčního testu Cytotoxicity Detection Kit (LDH). Postupováno bylo dle pokynů výrobce. Na tento test byly připraveny 96-jamkové mikrotitrační destičky, obsahující 20 000 buněk v jamce. Prvním krokem bylo odsátí média, v jednotlivých jamkách (řádky B–G) bez narušení buněk, usedlých na dně jamky. Odsáty byly nejprve sloupce 1–5. K buňkám ve sloupcích 3–5 bylo následně pipetováno 100 μ l naředěných roztoků látek, připravených postupem zaznamenaných v podkapitole 5.2.4. Po aplikaci látek v triplicátu byla odsáta zbylá část desky a postup byl opakován. Do sloupce 1 bylo pipetováno 100 μ l 1% média DMEM/F12, sloužícího jako blank. Jako zdravá kontrola byly použity buňky se 100 μ l 1% média DMEM/F12 s DMSO (0.1% v/v). Naopak jako pozitivní kontrola byly použity buňky se 100 μ l glutamátového média. Kontroly byly umístěny dle schématu (Obrázek 23). Po 24 hodinové inkubaci buněk s připravenými látkami popsaným postupem v podkapitole 5.2.5 při 37 °C a 5 % CO₂ bylo z kultivačního média odpipetováno 50 μ l média a přeneseno do nové 96 jamkové mikrotitrační destičky. K odpipetovanému médiu bylo přidáno 50 μ l roztoku LDH realease loading roztok a bylo inkubováno 30 minut ve tmě za pokojové teploty. Po inkubaci bylo následně přidáno 50 μ l roztoku LDH STOP solution a následně bylo měřeno množství uvolněného LDH do média jakožto absorbance při vlnové délce 490 nm.

5.2.7 Měření oxidativního stresu pomocí dihydroethidia

Měřena byla produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), které jsou známkou oxidativního stresu. Produkce ROS byla detekována pomocí dihydroethidia (DHE), které sloužilo jako fluorescenční značka pro stanovení množství superoxidových radikálů. Byly připraveny 96-jamkové mikrotitrační destičky, obsahující 20 000 buněk v jamce. Prvním krokem bylo odsátí média, v jednotlivých jamkách (řádky B–G) bez narušení buněk, usedlých na dně jamky. Odsáty byly nejprve sloupce 1–5. K buňkám ve sloupcích 3–5 bylo následně pipetováno 100 μ l naředěných roztoků látek, připravených postupem zaznamenaných v podkapitole 5.2.4. Po aplikaci látek v triplicátu byla odsáta zbylá část desky a postup byl opakován. Do sloupce 1 bylo pipetováno 100 μ l 1% DMEM/F12, sloužícího jako blank. Jako

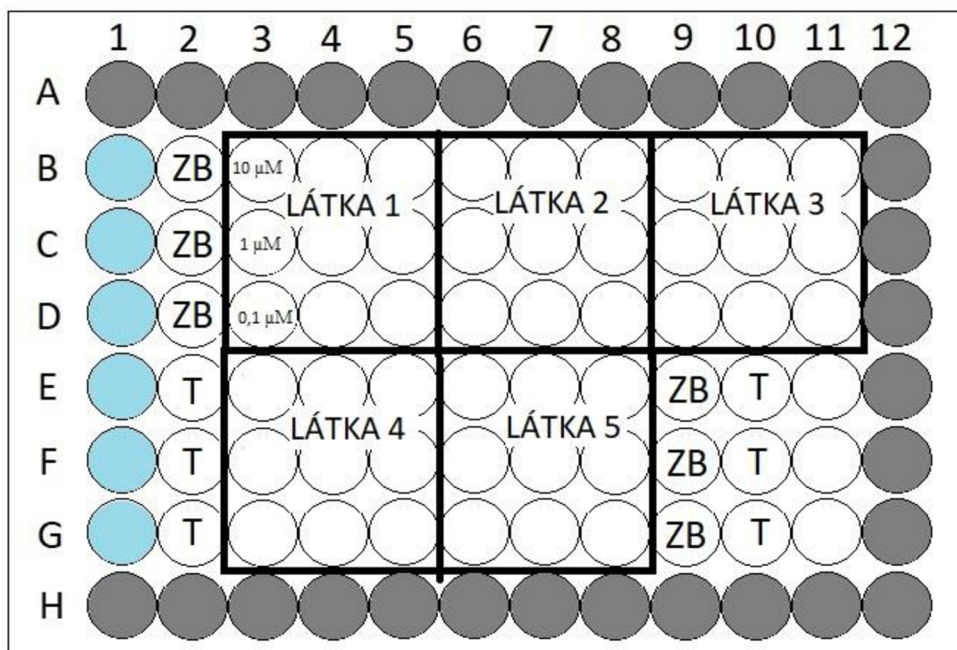
zdravá kontrola byly použity buňky se 100 μ l 1% DMEM/F12 s DMSO (0.1% v/v). Naopak jako pozitivní kontrola byly použity buňky se 100 μ l média obsahujícího glutamát o koncentraci 160 mM. Kontroly byly umístěny dle schématu (Obrázek 23). Po 4 hodinové inkubaci buněk se zředěnými látkami, připravených postupem v podkapitole 5.2.4, při 37 °C a 5 % CO₂ byla 96 jamková mikrotitrační deska centrifugována po dobu 5 minut a 30 sekund při 500 g. Kultivační médium v mikrotitrační destičce bylo nahrazeno 100 μ l roztoku DHE v PBS o celkové koncentraci 10 μ M. Po následné inkubaci po dobu 30 minut ve tmě za pokojové teploty byla změřena fluorescence DHE při vlnových délkách excitace/emise 500/580 nm na mikrodestičkovém readeru.

5.2.8 Měření aktivity kaspázy 3, 7

Na tento test byly připraveny 96-jamkové mikrotitrační destičky, obsahující 20 000 buněk v jamce. Prvním krokem bylo opatrné odsátí média, v jednotlivých jamkách (řádky B–G) bez narušení buněk usedlých na dně jamky. Odsáty byly nejprve sloupce 1–5. K buňkám ve sloupcích 3–5 bylo následně pipetováno 100 μ l naředěných roztoků látek připravených postupem zaznamenaných v podkapitole 5.2.4. Po aplikaci látek v triplicátu byla odsáta zbylá část desky a postup byl opakován. Do sloupce 1 bylo pipetováno 100 μ l 1% DMEM/F12, sloužícího jako blank. Jako zdravá kontrola byly použity buňky se 100 μ l 1% DMEM/F12 s DMSO (0.1% v/v). Naopak jako pozitivní kontrola byly použity buňky se 100 μ l glutamátového média. V rámci otravy byla použita i speciální pozitivní kontrola, inhibitor kaspáz 3, 7 – tetrapeptid Ac-DEVD-CHO v koncentraci 0,5 μ M. Kontroly byly umístěny dle schématu (Obrázek 23). Aktivita kaspázy 3 a 7 jako signalizačních molekul apoptózy byla detekována po 1 hodinové inkubaci buněk s připravenými látkami v glutamátovém médiu postupem zaznamenaným v podkapitole 5.2.4. K buňkám bylo přidáno 50 μ l reakční směsi, obsahují 3543,5 μ l kaspázového pufru, 114 μ l DTT, 114 μ l PMSP a 28,5 μ l substrátu Ac-DEVD-AFC. Následně po 2 hodinové inkubaci při 37 °C a 5 % CO₂ byla měřena fluorescence na mikrodestičkovém readeru při hodnotách excitace /emise 400/505 nm.

5.2.9 Měření mitochondriálního membránového potenciálu

Dále byl proveden test mitochondriálního membránového potenciálu pomocí komerčního kitu mitochondriálního membránového potenciálu od firmy Sigma Aldrich. Postupováno bylo dle pokynů výrobce. Na tento test byly připraveny 96-jamkové mikrotitrační destičky, obsahující 20 000 buněk v jamce. Prvním krokem bylo opatrné odsátí média, v jednotlivých jamkách (řádky B–G) bez narušení buněk usedlých na dně jamky. Odsáty byly nejprve sloupce 1–5. K buňkám ve sloupcích 3–5 bylo následně pipetováno 50 μ l naředěných roztoků látek připravených postupem zaznamenaných v podkapitole 5.2.4. Po aplikaci látek v triplicátu byla odsáta zbylá část desky a postup byl opakován. Do sloupce 1 bylo pipetováno 50 μ l 1% DMEM/F12 sloužícího jako blank. Jako zdravá kontrola byly použity buňky se 50 μ l 1% DMEM/F12 s DMSO (0,1 % v/v). Naopak jako pozitivní kontrola byly použity buňky s 50 μ l glutamátového média. Kontroly byly umístěny dle schématu (Obrázek 23). Takto připravená destička byla inkubována po dobu 1 hodiny při 37 °C a 5 % CO₂. Poté bylo k buňkám s látkami přidáno 25 μ l roztoku, obsahující 2 ml reakčního pufru A a 20 μ l barvičky JC-10. Následovala 30 minutová inkubace při 37 °C a 5 % CO₂. Po inkubaci bylo přidáno 25 μ l kontrastního pufru B a ihned poté proběhlo měření na mikrodestičkovém readeru při vlnových délkách excitace/emise 490/525nm a 540/590 nm.



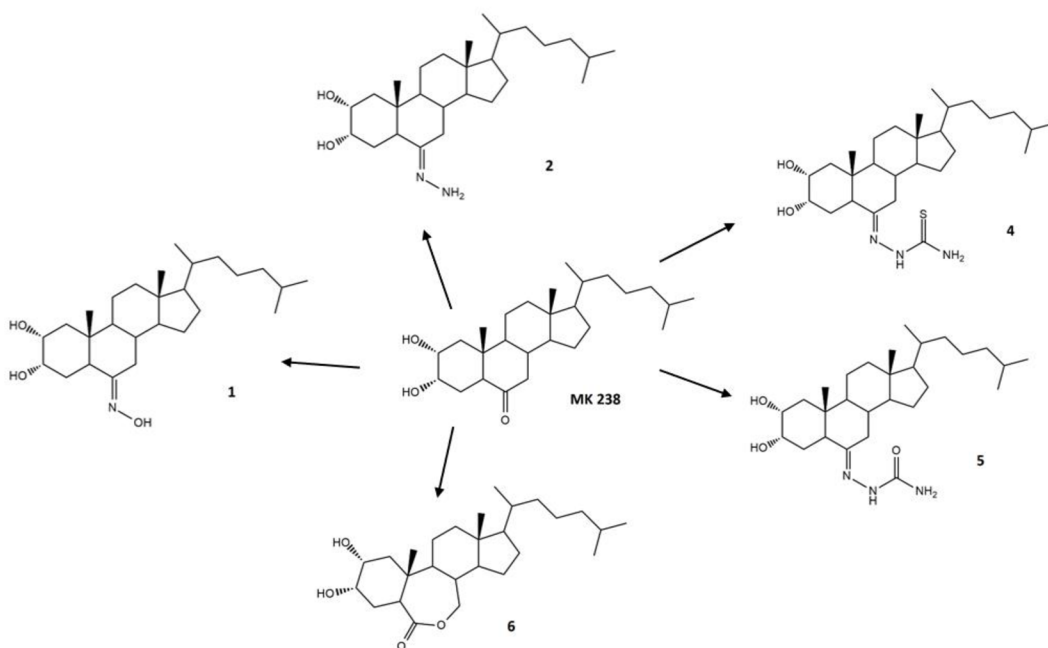
Obrázek 23: Schéma destičky s buňkami SH-SY5Y pro testování připravených oxysterolů. Šedou barvou jsou označeny jamky, obsahující pouze médium DMEM bez buněk. Modrou barvou je znázorněno médium, které slouží jako blank při závěrečném měření. ZB = zdravé buňky: 10% DMEM/F12 s buňkami; T = toxin: 10% DMEM/F12 s glutamátem a buňkami. Na jedné destičce bylo možno testovat pouze 5 látek. Ve sloupci 3 jsou uvedeny výsledné koncentrace testovaných látek, které jsou u všech látek totožné.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

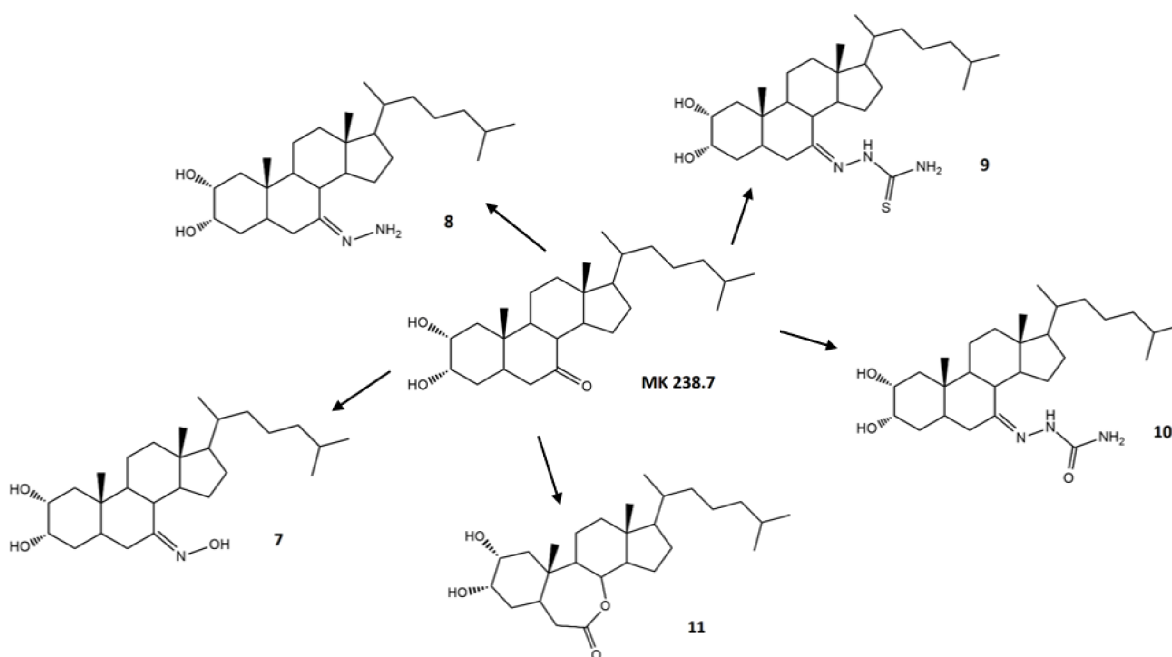
6.1 Syntéza látek

Jednostupňovou syntézou bylo připraveno 12 látek. Výchozí sloučeninou pro látky **1, 2, 4, 5** a **6** byl steroid **MK 238** s ketoskupinou na pozici C6 (Obrázek 24). Látku **1** připravila i skupina Richmonda a kol. (2014) podobným způsobem, jako byl použit v diplomové práci. Pro látky **7, 8, 9, 10, 11** byla výchozí látka **MK 238.7** s ketoskupinou umístěnou na pozici C7 (Obrázek 25). Pro syntézu hydroxymethylenketonů **3** a **18** nebo **19**, tj. látek nutných pro následnou syntézu heterocyklických derivátů, se jako stěžejní ukázala přítomnost ketonu v pozici C7 (**CH7**). V tomto případě se podařilo připravit hydroxymethylenketon **3** v dostatečném výtěžku (Obrázek 27). V případě 6-keto derivátů (**MK-608** a **A**) k zavedení hydroxymethylenové skupiny na pozici C7 nedošlo (Obrázek 26). Rozdíl v reaktivitě je možné vysvětlit sterickými vlivy. Toto potvrzuje ve své syntéze pyrazolových derivátů i Pelc (1971). Hydroxymethylenketon **3** byl klíčový při přípravě steroidů s navázaným heterocyklem na B kruhu (látky **13, 14, 15, 16**, a **17**). Pro látku **12** byla výchozí sloučeninou nenasycený keton **2840/A** s osmičlenným B kruhem (Obrázek 28).

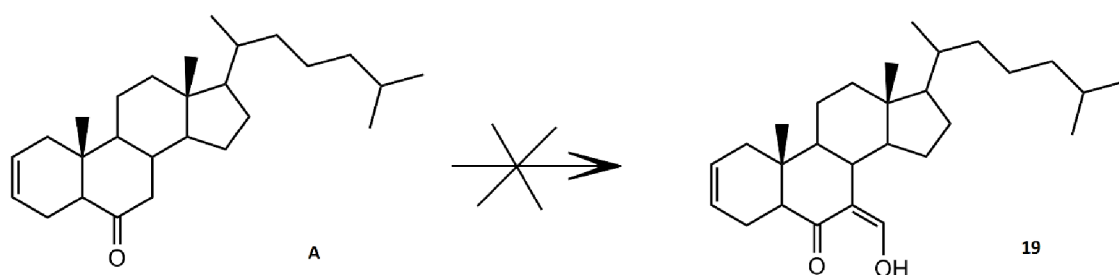
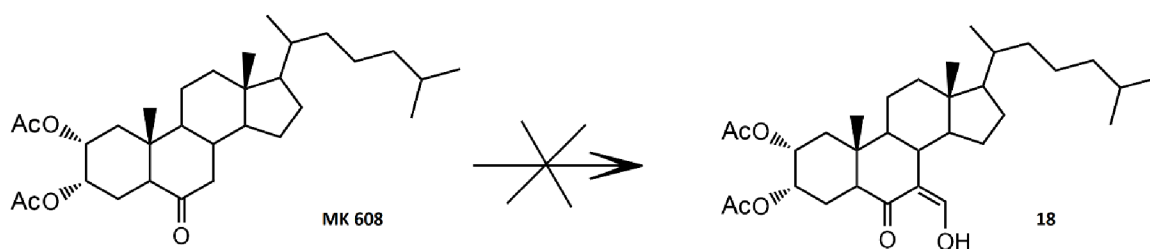
Dvoustupňovou syntézou, přes hydroxymethylenketon **3**, bylo připraveno 5 oxysterolů s heterocykly na B kruhu (Obrázek 29). Heterocyklické oxysteroly byly připraveny RNDr. Miroslavem Kvasnicou, Ph.D.



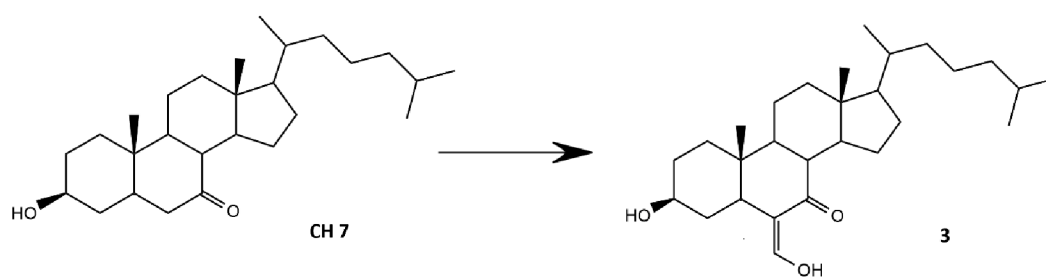
Obrázek 24: Jednostupňová syntéza látek **1, 2, 4, 5** a **6** vycházející z **MK 238**.



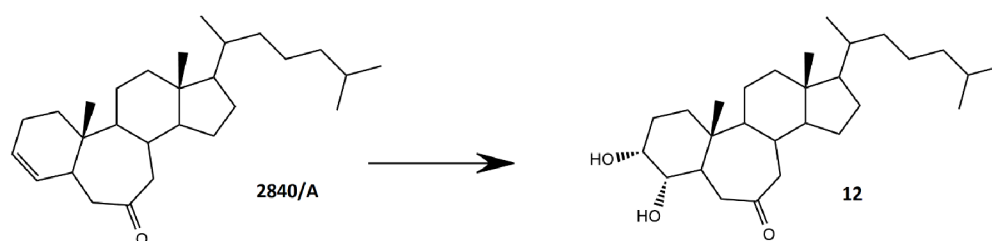
Obrázek 25: Jednostupňová syntéza látek **7, 8, 9, 10** a **11** vycházející z **MK 238.7**.



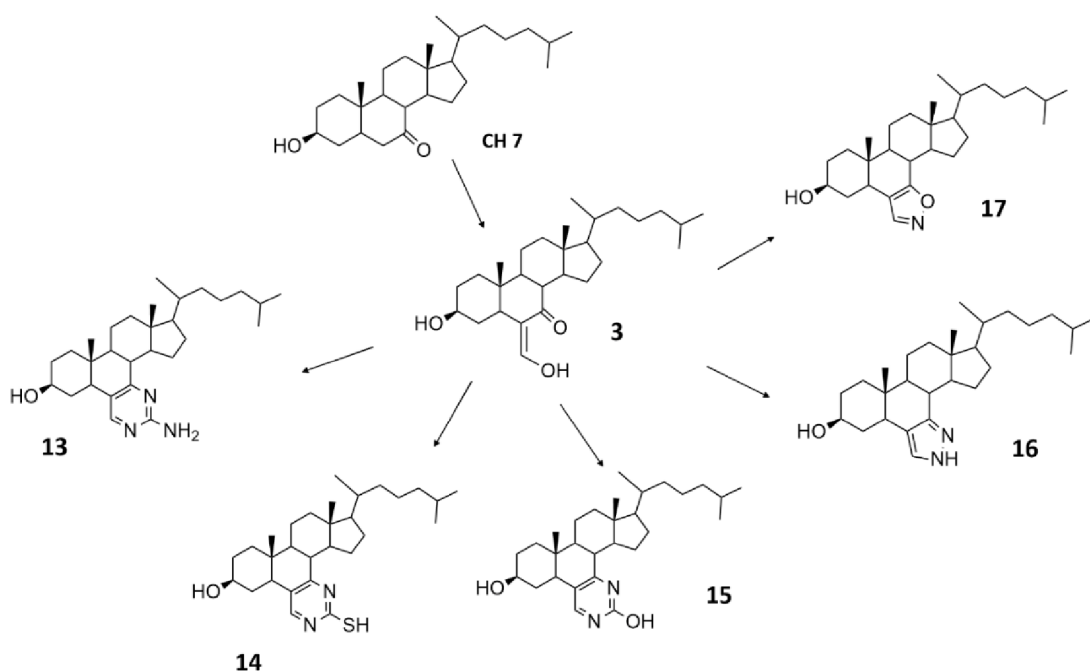
Obrázek 26: Nezdářilé pokusy o syntézu látku **18** a **19** s ketoskupinou na pozici C6.



Obrázek 27: Jednostupňová syntéza látky **3** vycházející ze steroidu **CH7**.



Obrázek 28: Jednostupňová syntéza látky **12** s osmičlenným B kruhem.



Obrázek 29: Dvoustupňová syntéza heterocyklických oxysterolů na B kruhu.

6.2 Testování cytotoxické aktivity na nádorových a nenádorových buňkách

Cytotoxická aktivita 17 syntetizovaných látek byla testována na nádorové linii HeLa a nenádorové linii RPE-1. Z důvodu špatné rozpustnosti byla u látek **3** a **15** snížena koncentrace ze 7,5 mM na 5 mM. Pouze heterocyklické látky **13**, **14** a **17** byly netoxické pro obě linie v testované koncentraci. (Tabulka 1). Nejzajímavější výsledky vykazoval připravený oxysterol s navázaným hydrazinem **8**, který byl toxický pro nádorovou linii a pro linii RPE-1 byla tato látka netoxická. Na nádorové buňky byla nejvíce toxická látka **16** s hodnotou IC_{50} $6,4 \pm 3,2 \mu M$. Cytotoxické byly také látky **1**, **5** a **11** s hodnotou IC_{50} 12,0; 9,5 a 9,9 μM . Látka **5** byla rovněž vysoce toxická i pro linii RPE-1 s hodnotou IC_{50} 8,3 μM . Ostatní látky vykazovaly střední toxicitu pro linii HeLa v rozmezí 18,3 – 34,6 μM . U linie RPE-1 se toxicita pohybovala v rozmezí 16,1 – 39,8 μM . Výsledky ukázaly, že připravené heterocyklické oxysteroly nejsou pro testované linie toxické s výjimkou látky **16**, která byla toxická pro linii HeLa ($IC_{50} = 6,4 \mu M$) a středně toxická linii RPE-1 ($IC_{50} = 16,1 \mu M$).

Rárová a kol. (2016) ve své studii zkoumali cytotoxický efekt cholestanový derivátů včetně výchozích látek pro syntézu modifikovaných oxysterolů **MK238**, **MK238.7** a **CH7** na

několika nádorových linií. Hodnota IC_{50} u nádorové linie MCF7 u látky **MK 238** vykazovala hodnotu $43.1 \pm 9.8 \mu\text{M}$. Syntetizované oxysteroly (**1**, **2**, **4**, **5** a **6**), odvozené od **MK 238**, vykazovaly vyšší cytotoxicitu než jejich výchozí látka. Látky **1** a **5** byly ve srovnání s výchozí látkou více toxické. Opačný efekt byl zaznamenán ve srovnání steroidu **CH7** a látky **3**, kdy výchozí látka byla pro linii MCF7 toxická ($IC_{50} = 8.9 \pm 1.6 \mu\text{M}$) a látka **3** vykazovala na linii HeLa pouze střední toxicitu ($IC_{50} = 34,5 \pm 2,5 \mu\text{M}$). U steroidu **MK238.7** byla hodnota $IC_{50} = 18,2 \pm 1.5 \mu\text{M}$. Velmi podobné hodnoty byly naměřeny u látek **9** a **10**, které vycházely ze steroidu **MK238.7**. Ostatní připravené oxysteroly (látky **7** a **8**) vykazovaly nižší toxicitu než výchozí steroid. Avšak látka **11** byla ve srovnání s výchozí látkou více toxická. Její hodnota IC_{50} byla $9,9 \pm 2,7 \mu\text{M}$. Rozdíl cytotoxicity může být v použití odlišných nádorových linií. V diplomové práci byla použita nádorová linie HeLa, kdežto ve studii Rárové a kol. (2016) byla použita linie nádorová MCF7.

K podobným cytotoxickým výsledkům pro látku **1** jako v diplomové práci ($IC_{50} 12,0 \pm 3,5 \mu\text{M}$) dospěla i studie Richmonda a kol. (2014), kteří cytotoxický efekt zkoumali na nádorových buňkách prostaty PC-3, kde stanovili hodnotu IC_{50} na $10,8 \pm 2,6 \mu\text{M}$.

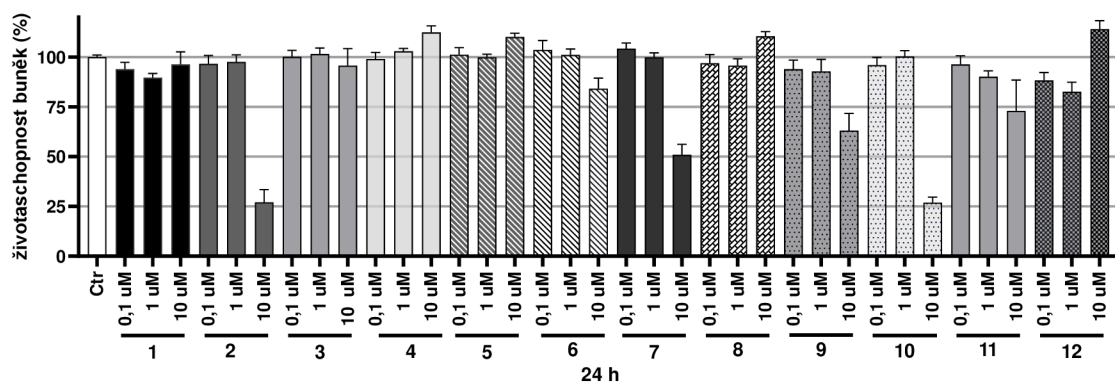
Tabulka 1: Hodnoty IC₅₀ (μM) testovaných látek na nádorové (HeLa) a nenádorové buňky (RPE-1) po 72 hodinové inkubaci.

Látka	Buněčná linie (IC ₅₀ ; μM)	
	HeLa	RPE-1
1	12,0 ± 3,5	35,6 ± 1,7
2	30,7 ± 3,3	39,8 ± 2,9
3	34,5 ± 2,5	35,5 ± 1,9
4	26,4 ± 1,9	34,5 ± 1,2
5	9,5 ± 2,8	8,3 ± 2,7
6	31,9 ± 4,4	37,0 ± 1,8
7	32,1 ± 3,8	34,6 ± 0,7
8	34,6 ± 0,6	>50
9	18,7 ± 1,3	23,6 ± 3,8
10	18,3 ± 6,0	17,7 ± 1,4
11	9,9 ± 2,7	38,1 ± 1,2
12	18,0 ± 7,2	24,2 ± 4,4
13	>50	>50
14	>50	>50
15	29,3 ± 3,3	36,6 ± 1,9
16	6,4 ± 3,2	16,1 ± 7,4
17	>50	>50

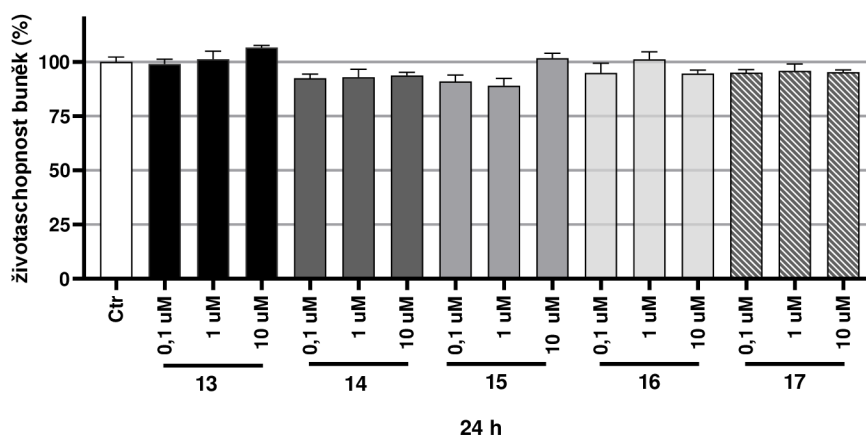
6.3 Testování cytotoxicity na buňkách SH-SY5Y

Cytotoxická aktivita byla zkoumána také na neuronálních buňkách SH-SY5Y. Buňky byly vizualizovány pomocí barviva Calcein AM, které se v živých buňkách přeměňuje na zeleně fluorescenční barvivo calcein. Největší cytotoxický efekt byl zjištěn u látek **2** a **10** s koncentrací 10 μM, kdy viabilita byla 27 %. Toxicita byla změřena rovněž u látky **7**, kdy při koncentraci 10 μM došlo k poklesu viability na 50 %. Snížená viabilita u koncentrace 10 μM byla také zaznamenána u látky **9**, kde byla 63 %. U zbylých látek byla viabilita téměř 100 %.

Připravené heterocyklické oxysteroly nebyly pro neuronální buňky SH-SY5Y toxické v žádné testované koncentraci. Životaschopnost buněk byla téměř 100 % u všech heterocyklů. (Graf 2).



Graf 1: Cytotoxická aktivita syntetizovaných derivátů oxysterolu na buňkách SH-SY5Y po 24 hodinové inkubaci. Látky byly testovány v koncentraci 0,1-1-10 μM. Sloupcový graf znázorňuje průměrné hodnoty s ± standardní chybou průměru (SEM) ze dvou nezávislých experimentů provedených v triplikátu. Naměřené hodnoty jsou vztaženy k pozitivní kontrole (Ctr), médium DMEN (100 %).

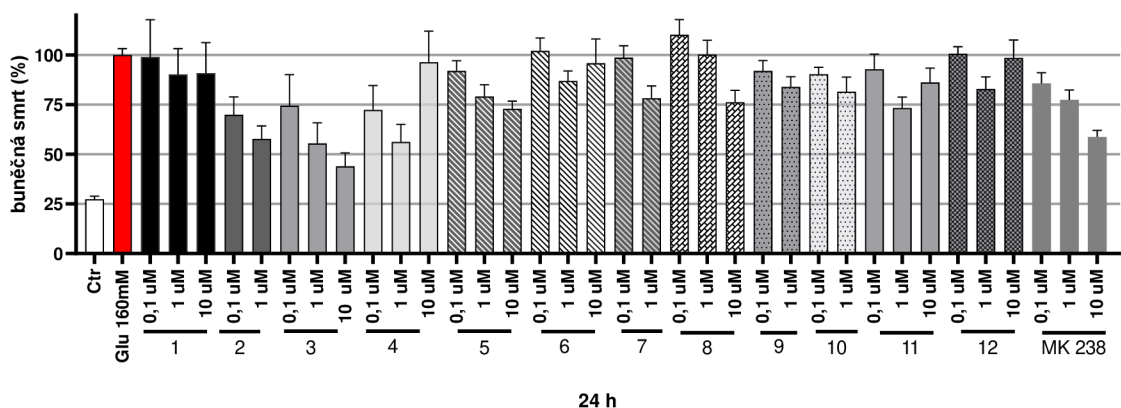


Graf 2: Cytotoxická aktivita heterocyklických oxysterolů na buňkách SH-SY5Y po 24 hodinové inkubaci. Látky byly testovány v koncentraci 0,1-1-10 μM. Sloupcový graf znázorňuje průměrné hodnoty s ± standardní chybou průměru (SEM) ze dvou nezávislých experimentů provedených v triplikátu. Naměřené hodnoty jsou vztaženy k pozitivní kontrole (Ctr), médium DMEN (100 %).

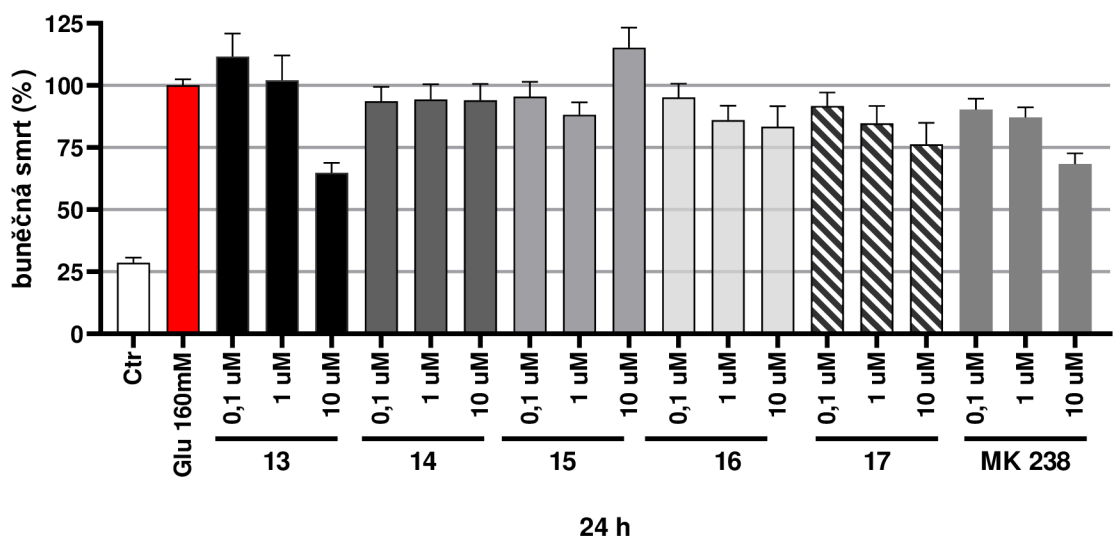
6.4 Test buněčné smrti

Dále byl proveden test buněčné smrti s využitím glutamátového modelu a vizualizace pomocí barviva PI. Glutamát o koncentraci 160 mM byl považován za vyvolání 100% buněčné smrti. V tomto testu byl studován vliv syntetizovaných látek v koncentraci 0,1-1-10 μM na snížení buněčné smrti indukované glutamátem. Na základě cytotoxické aktivity byly u látky **2**, **7**, **9** a **10** vyřazeny toxické koncentrace 10 μM . Nejvýraznější efekt byl zaznamenán u dvou látek (**3** a **5**), který se podobal aktivitě neuroprotektivní látky **MK 238**, u níž bylo zaznamenáno snížení na 85 % při koncentraci 0,1 μM , na 77 % při koncentraci 1 μM a na 58 % v koncentraci 10 μM . (Graf 3). Neuroprotektivní aktivitu látky **MK 238** ve své bakalářské práci potvrdila Bc. Veronika Górová (Górová, 2019). U látky **3** bylo zaznamenáno snížení na 74 % při koncentraci 0,1 μM , na 55 % při koncentraci 1 μM a na 43 % v koncentraci 10 μM . U látky **5** bylo zaznamenáno snížení na 79 % při koncentraci 1 μM a na 72 % v koncentraci 10 μM . Heterocyklické oxysteroly nevykazovaly žádnou významnou protekční aktivitu s výjimkou látky **13** (Graf 4). U látky **13** bylo zaznamenáno snížení na 65 % při koncentraci 10 μM .

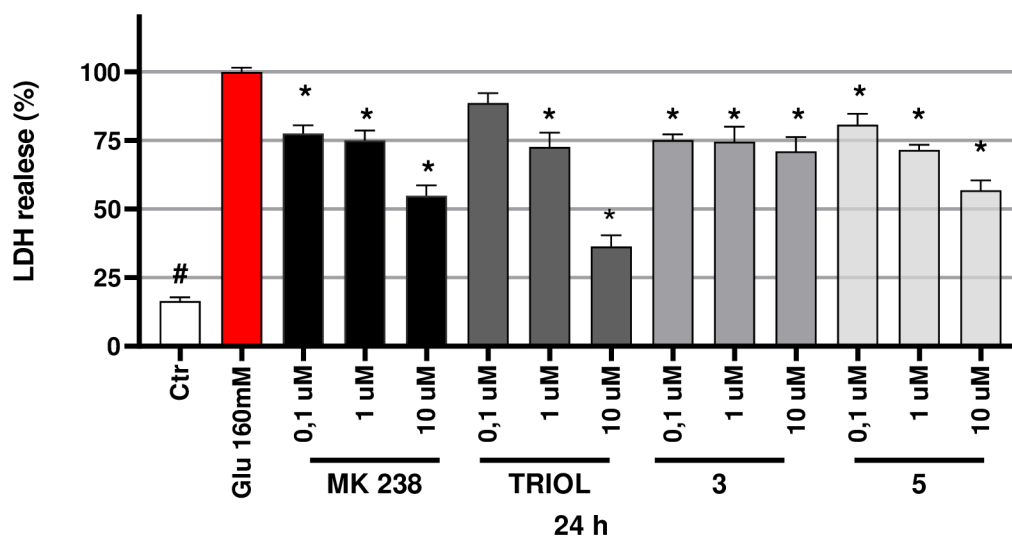
Na základě výsledků byly uvedené 2 látky podrobeny detailnějším testům jejich biologické aktivity. Neuroprotektivní aktivita látek **3** a **5** byla potvrzena pomocí kitu detekce cytotoxicity, využívající k detekci enzym laktát dehydrogenázu, který se uvolňuje při poškození buněk do média (Graf 5). Účinek syntetizovaných látek byl porovnán s cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triolem (triole), kterého byla zaznamenána neuroprotektivní aktivita. Bylo zjištěno, že triole vykazuje *in vitro* i *in vivo* neuroprotektivní účinky na modelu glutamátem indukované buněčné smrti prostřednictvím negativní modulační NMDA receptorů (Hu a kol., 2014).



Graf 3: Neurotoxická aktivita syntetizovaných oxysterolů na buňky SH-SY5Y po 24 hodinové inkubaci. Látky byly testovány v koncentraci 0,1-1-10 μM. Sloupcový graf znázorňuje průměrné hodnoty s ± standardní chybou průměru (SEM) ze tří nezávislých experimentů provedených v triplikátu. Naměřené hodnoty signálu jsou vztahované ke glutamátu (Glu 160) o koncentraci 160 mM (100 %).



Graf 4: Neurotoxická aktivita heterocyklických oxysterolů na buňky SH-SY5Y po 24 hodinové inkubaci. Látky byly testovány v koncentraci 0,1-1-10 μM. Sloupcový graf znázorňuje průměrné hodnoty s ± standardní chybou průměru (SEM) ze tří nezávislých experimentů provedených v triplikátu. Naměřené hodnoty signálu jsou vztahované ke glutamátu (Glu 160) o koncentraci 160 mM (100 %).

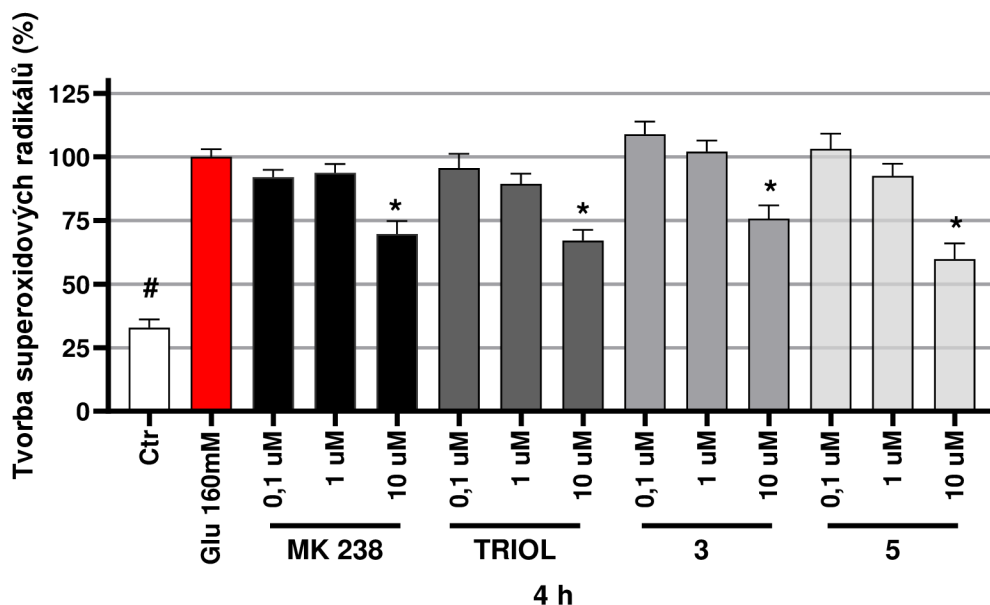


Graf 5: Měření uvolněného enzymu laktát dehydrogenáza (LDH) do média při poškození buněk SH-SY5Y po 24 hodinové inkubaci. Látky byly testovány v koncentraci 0,1-1-10 μM . Sloupcový graf znázorňuje průměrné hodnoty s \pm standardní chybou průměru (SEM) ze čtyř nezávislých experimentů provedených v triplikátu. Naměřené hodnoty signálu jsou vztažené ke glutamátu (Glu 160) o koncentraci 160 mM (100 %). Analýza byla provedena pomocí Kruskal-Wallis, Mann-Whitney post hoc test (Bonferonniho sekvenční korekce p-hodnot). # značí statistickou významnost mezi kontrolou (Ctrl) a glutamátem o koncentraci 160 mM (Glu 160 mM). * statisticky významný rozdíl pro látku v určité koncentraci v porovnání s glutamátem o koncentraci 160 mM (Glu 160).

6.5 Měření oxidativního stresu

Oxidativní stres je významná příčina patologie Parkinsonovy choroby, která vede ke ztrátě dopaminergních neuronů. Je známo, že glutamát indukuje cytotoxicitu v buněčné linii SH-SY5Y skrze oxidativní stres prostřednictvím cystein/glutamátového antiporteru, což vede k buněčné smrti (Kritis, 2015). Proto byla zkoumána schopnost vybraných látek **3** a **5** snížit tvorbu ROS indukovanou glutamátem. Výsledky ukázaly, že zkoumané látky v koncentraci 10 μM snižují oxidativní stres vyvolaný glutamátem, který byl považován za 100 % (Graf 6). U látky **5** byl při koncentraci 10 μM zaznamenán největší efekt, a to snížení na 60 %. U látky

3 bylo snížení oxidativního stresu vyvolaným glutamátem na 75 %. Látka **5** snižovala oxidativní stres lépe než neuroprotektivní látky **MK 238** (69 %) a **triol** (67 %). Zdá se, že látky **3** a **5** chrání buňky skrze snížení oxidativního stresu vyvolaným glutamátem.

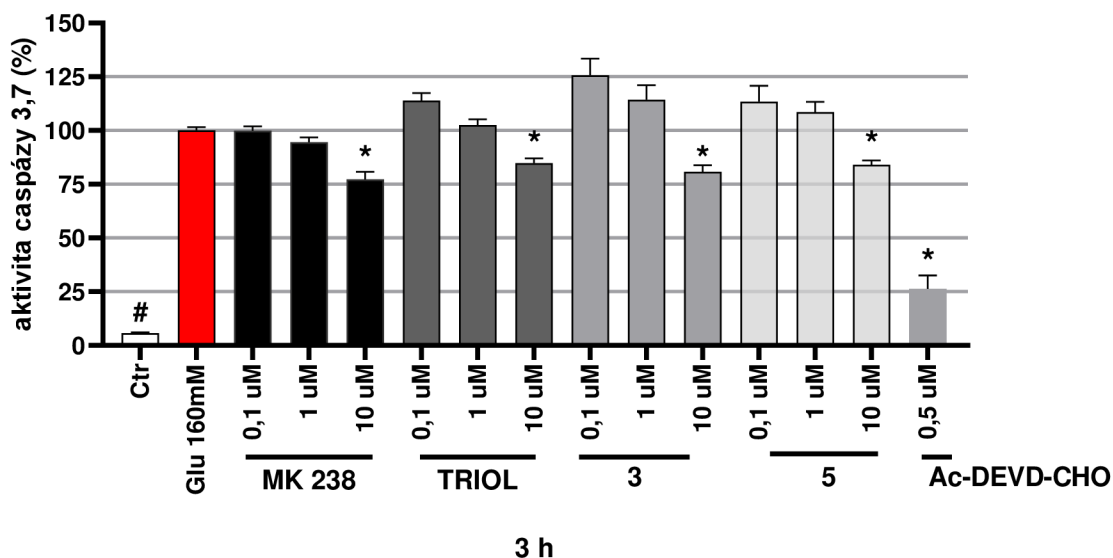


Graf 6: Tvorba superoxidových radikálů v buňkách SH-SY5Y po 4 hodinové inkubaci. Látky byly testovány v koncentraci 0,1-1-10 μM . Sloupcový graf znázorňuje průměrné hodnoty s \pm standardní chybou průměru (SEM) z pěti nezávislých experimentů provedených v triplicátu. Naměřené hodnoty signálu jsou vztaženy ke glutamátu (Glu 160) o koncentraci 160 mM (100 %). Analýza rozptylu (ANOVA), Tukey post hoc test. # značí statistickou významnost mezi kontrolou (Ctr) a glutamátem o koncentraci 160 mM (Glu 160 mM). * statisticky významný rozdíl pro látku v určité koncentraci v porovnání s glutamátem o koncentraci 160 mM (Glu 160).

6.6 Měření aktivity kaspázy 3,7

Studie posledních let naznačují, že ochranný účinek látek by mohl působit skrze snížení aktivity kaspáz 3,7, které se účastní apoptického procesu (Gonzalez, 2021; Zhu, 2016). V případě měření aktivity kaspáz nebyl zaznamenán příliš významný efekt v porovnání s inhibítorem kaspázy 3,7 Ac-DEVD-CHO o koncentraci 0,5 μM , který snížil aktivitu kaspáz na

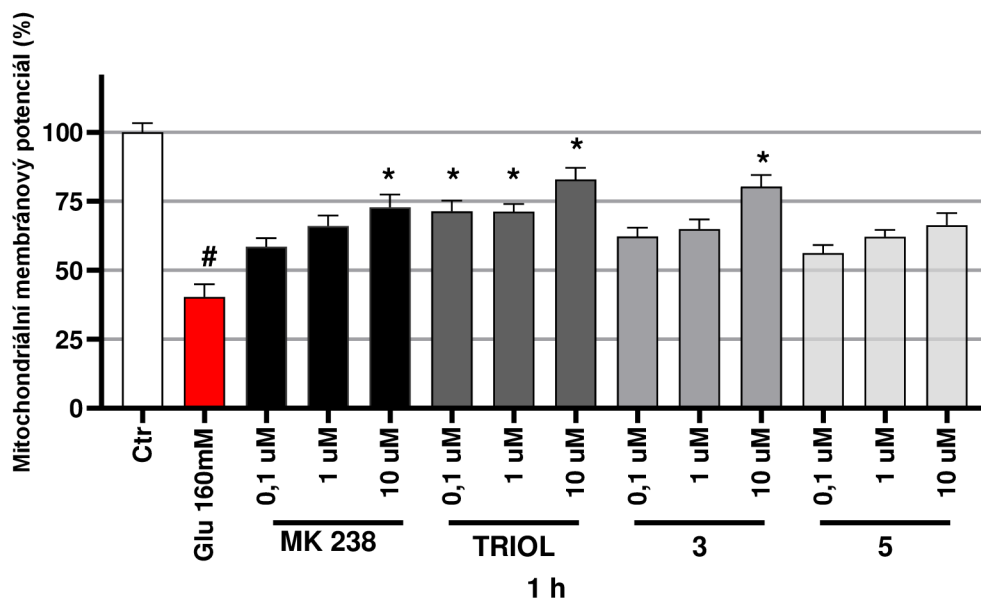
26 %. U všech látek bylo zjištěno snížení se středním až nízkým efektem při koncentraci 10 μ M (Graf 7).



Graf 7: Měření aktivity kaspázy 3,7 na buňkách SH-SY5Y po 3 hodinové inkubaci. Látky byly testovány v koncentraci 0,1-1-10 μ M. Sloupcový graf znázorňuje průměrné hodnoty s \pm standardní chybou průměru (SEM) z pěti nezávislých experimentů provedených v triplicátu. Naměřené hodnoty signálu jsou vztaženy ke glutamátu (Glu 160) o koncentraci 160 mM (100 %). Analýza byla provedena pomocí Kruskal-Wallis, Mann-Whitney post hoc testu (Bonferonniho sekvenční korekce p-hodnot). # značí statistickou významnost mezi kontrolou (Ctr) a glutamátem o koncentraci 160 mM (Glu 160 mM). * statisticky významný rozdíl pro látku v určité koncentraci v porovnání s glutamátem o koncentraci 160 mM (Glu 160).

6.7 Měření mitochondriálního membránového potenciálu

Měření mitochondriálního membránového potenciálu ukázalo, že testované látky jsou celkově schopny obnovit membránový potenciál mitochondrií po expozici toxickým glutamátem (Graf 8). Nejlepší schopnost má látka **3** při koncentraci 10 μ M (80 %).



Graf 8: Stanovení mitochondriálního membránového potenciálu na buňkách SH-SY5Y po 1 hodinové inkubaci. Látky byly testovány v koncentraci 0,1-1-10 μM . Sloupcový graf znázorňuje průměrné hodnoty s \pm standardní chybou průměru (SEM) ze tří nezávislých experimentů provedených v triplikátu. Naměřené hodnoty jsou vztaženy ke kontrole (Ctrl), médium DMEN (100 %). Analýza byla provedena pomocí Kruskal-Wallis, Mann-Whitney post hoc testu (Bonferonniho sekvenční korekce p-hodnot). # značí statistickou významnost mezi kontrolou (Ctrl) a glutamátem o koncentraci 160 mM (Glu 160 mM). * statisticky významný rozdíl pro látku v určité koncentraci v porovnání s glutamátem o koncentraci 160 mM (Glu 160).

7 ZÁVĚR

V rámci diplomové práce se podařilo jednostupňovou syntézou připravit 12 oxysterolů s modifikovaným B kruhem. Výchozími sloučeninami byly steroidy **MK 238**, **MK238.7**, **CH7** a **2840/A** pocházející z knihovny LRR. Pro biologické testování byly použity navíc i heterocyklické deriváty z knihovny steroidů LRR. Všechny oxysteroly s navázaným heterocyklem na B kruhu byly připraveny dvoustupňovou syntézou přes syntetizovanou látku **3**.

U heterocyklických oxysterolů nebyla zaznamenána žádná významná biologická aktivita až na výjimky, kdy látka **13** vykazovala v koncentraci 10 μ M neuroprotektivní aktivitu na buňky SH-SY5Y a látka **16** s navázaným pyrazolem na B kruhu vykazovala cytotoxický efekt na nádorovou i normální buněčnou linii. Cytotoxický efekt na nádorovou linii HeLa rovněž vykazovaly dvě připravené látky (**3** a **5**). Zbylé testované látky působily středním cytotoxickým efektem na obě zkoumané linie.

U oxysterolů bylo zkoumáno také to, zda jsou schopny snížit buněčnou smrt neuronálních buněk SH-SY5Y vyvolanou glutamátem. Výsledky ukázaly, že dvě látky (**3** a **5**) významně chrání buňky před glutamátem snížením jeho toxicity. Detailnější testy zjistily, že látka **3** a **5** chrání buňky tím, že snižují oxidativní stres. Překvapivě jsou všechny vybrané látky schopny obnovit mitochondriální membránový potenciál.

POUŽITÁ LITERATURA

- Alexander** GE. Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues Clin Neurosci*. 2004; 6(3):259-280.
- Alzheimer** A. 1907 Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und phychisch-Gerichtliche Medizin*. 1907; 64:146-148.
- Aupeix** K, Weltin D, Mejia JE, Christ M, Marchal J, Freyssinet JM, Bischoff P. Oxysterol-induced apoptosis in human monocytic cell lines. *Immunobiology*. 1995; 194(4-5):415-428.
- Biasi** F, Mascia C, Astegiano M, Chiarpotto E, Nano M, Vizio B, Leonarduzzi G, Poli G. Pro-oxidant and proapoptotic effects of cholesterol oxidation products on human colonic epithelial cells: a potential mechanism of inflammatory bowel disease progression. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47(12):1731-1741.
- Björkhem** I, Eggertsen G. Genes involved in initial steps of bile acid synthesis. *Curr Opin Lipidol*. 2001; 12(2):97-103.
- Björkhem** I. Rediscovery of cerebrosterol. *Lipids*. 2007; 42(1):5-14.
- Björkhem** I, Lövgren-Sandblom A, Leoni V, Meaney S, Brodin L, Salvesson L, Winge K, Pålhagen S, Svenningsson P. Oxysterols and Parkinson's disease: evidence that levels of 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid correlates with the duration of the disease. *Neurosci Lett*. 2013; 555:102-105.
- Blandini** F, Porter RH, Greenamyre JT. Glutamate and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol*. 1996; 12(1):73-94.
- Bosco** DA, Fowler DM, Zhang Q, Nieva J, Powers ET, Wentworth P Jr, Lerner RA, Kelly JW. Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate alpha-synuclein fibrilization. *Nat Chem Biol*. 2006; 2(5):249-523.
- Briggs** MR, Yokoyama C, Wang X, Brown MS, Goldstein JL. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J Biol Chem*. 1993; 268(19):14490-14496.
- Brookmeyer** R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2007; 3(3):186-91.
- Brown** AJ, Jessup W. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis, *Molecular Aspects of Medicine*, 2009; 30(3): 111-122.
- Carvalho** JF, Silva MM, Moreira JN, Simões S, Sá e Melo ML. Sterols as anticancer agents: synthesis of ring-B oxygenated steroids, cytotoxic profile, and comprehensive SAR analysis. *J Med Chem*. 2010; 53(21):7632-7638.
- Cases** S, Novak S, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, Welch CB, Lusic AJ, Spencer TA, Krause BR, Erickson SK, Farese RV Jr. ACAT-2, a second mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. Its cloning, expression, and characterization. *J Biol Chem*. 1998; 273(41):26755-26764.
- Chang** TY, Chang CC, Ohgami N, Yamauchi Y. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006; 22:129-157.
- Congdon** EE, Sigurdsson EM. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(7):399-415.
- Corder** EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993; 261(5123):921-923.

- Corder** EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* 1994; 7(2):180-184.
- Coyle** JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* 1993; 262(5134):689-695.
- Dauer** W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003; 39(6):889-909.
- Dexter** DT, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med.* 2013; 62:132-144.
- Doria** M, Maugest L, Moreau T, Lizard G, Vejux A. Contribution of cholesterol and oxysterols to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med.* 2016; 101:393-400.
- Dorsey** ER, Sherer T, Okun MS, Bloem BR. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. *J Parkinsons Dis.* 2018; 8(s1):3-8.
- DuSell** CD, Umetani M, Shaul PW, Mangelsdorf DJ, McDonnell DP. 27-hydroxycholesterol is an endogenous selective estrogen receptor modulator. *Mol Endocrinol.* 2008; 22(1):65-77.
- Farlow** M. A clinical overview of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr.* 2002; 14(1):93-126.
- Forman** MS, Trojanowski JQ, Lee VM. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med.* 2004; 10(10):1055-1063.
- Gamba** P, Testa G, Gargiulo S, Staurengi E, Poli G, Leonarduzzi G. Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2015; 7:119.
- Gautier** CA, Kitada T, Shen J. Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(32):11364-11369.
- Gill** S, Chow R, Brown AJ. Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised. *Prog Lipid Res.* 2008; 47(6):391-404.
- Goldstein** JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell.* 2006; 124(1):35-46.
- Gonzalez** G, Hodoň J, Kazakova A, D'Acunto CW, Kaňovský P, Urban M, Strnad M. Novel pentacyclic triterpenes exhibiting strong neuroprotective activity in SH-SY5Y cells in salsolinol- and glutamate-induced neurodegeneration models. *Eur J Med Chem.* 2021; 213:113168.
- Górová** V. Studium biologické aktivity přírodních a syntetických derivátů polyfenolů a brassinosteroidů na glutamátem-indukovaném modelu excitotoxicity. Olomouc, 2019. Bakalářská práce. 67 str. Univerzita Palackého v Olomouci, Katedra organické chemie.
- Hascalovici** JR, Vaya J, Khatib S, Holcroft CA, Zukor H, Song W, Arvanitakis Z, Bennett DA, Schipper HM. Brain sterol dysregulation in sporadic AD and MCI: relationship to heme oxygenase-1. *J Neurochem.* 2009; 110(4):1241-1253.
- Henchcliffe** C, Beal MF. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat Clin Pract Neurol.* 2008; 4(11):600-609.
- Heverin** M, Bogdanovic N, Lütjohann D, Bayer T, Pikuleva I, Bretillon L, Diczfalusy U, Winblad B, Björkhem I. Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J Lipid Res.* 2004; 45(1):186-193.
- Holtzman** DM, Morris JC, Goate AM. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med.* 2011; 3(77):77sr1.

- Hu H**, Zhou Y, Leng T, Liu A, Wang Y, You X, Chen J, Tang L, Chen W, Qiu P, Yin W, Huang Y, Zhang J, Wang L, Sang H, Yan G. The major cholesterol metabolite cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol functions as an endogenous neuroprotectant. *J Neurosci*. 2014; 34(34):11426-11438.
- Iuliana L**, Micheletta F, Natoli S, Ginanni Corradini S, Iappelli M, Elisei W, et al. Measurement of oxysterols and α -tocopherol in plasma and tissue samples as indices of oxidant stress status. *Anal Biochem* 2003; 312:217–223.
- Janowski BA**, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α *Nature*. 1996; 383:728–731.
- Janowski BA**, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, Mangelsdorf DJ. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXR α and LXR β *Proc Natl Acad Sci*. 1999; 96:266–271.
- Joffre C**, Leclère L, Buteau B, Martine L, Cabaret S, Malvitte L, Acar N, Lizard G, Bron A, Creuzot-Garcher C, Bretillon L. Oxysterols induced inflammation and oxidation in primary porcine retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res*. 2007; 32(3):271-280.
- Karch CM**, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry*. 2015; 77(1):43-51.
- Kandutsch AA**, Chen HW. Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by 7 α -hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol, and 7-ketocholesterol. *J Biol Chem*. 1973; 248(24):8408-8417.
- Kandutsch AA**, Chen HW, Heiniger HJ. Biological activity of some oxygenated sterols. *Science*. 1978; 201(4355):498-501.
- Klein C**, Westenberger A. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(1): a008888.
- Kludova A**, Guengerich FP, Soucek P. The Role of Oxysterols in Human Cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 2017; 28(7):485-496.
- Kölsch H**, Ludwig M, Lütjohann D, Prange W, Rao ML. 7 α -Hydroperoxycholesterol causes CNS neuronal cell death. *Neurochem Int*. 2000; 36(6):507-512.
- Kölsch H**, Ludwig M, Lütjohann D, Rao ML. Neurotoxicity of 24-hydroxycholesterol, an important cholesterol elimination product of the brain, may be prevented by vitamin E and estradiol-17 β . *J Neural Transm (Vienna)*. 2001;108(4):475-88.
- Kritis AA**, Stamoula EG, Paniskaki KA, Vavilis TD. Researching glutamate - induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Front Cell Neurosci*. 2015; 9:91.
- Lee A**, Gilbert RM. Epidemiology of Parkinson Disease. *Neurol Clin*. 2016; 34(4):955-965.
- Lee CY**, Seet RC, Huang SH, Long LH, Halliwell B. Different patterns of oxidized lipid products in plasma and urine of dengue fever, stroke, and Parkinson's disease patients: cautions in the use of biomarkers of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11(3):407-420.
- Lemaire-Ewing S**, Prunet C, Montange T, Vejux A, Berthier A, Bessède G, Corcos L, Gamber P, Néel D, Lizard G. Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol Toxicol*. 2005; 21(2):97-114.
- Leonarduzzi G**, Gamba P, Sottero B, Kadl A, Robbesyn F, Calogero RA, Biasi F, Chiarotto E, Leitinger N, Sevanian A, Poli G. Oxysterol-induced up-regulation of MCP-1 expression and synthesis in macrophage cells. *Free Radic Biol Med*. 2005; 39(9):1152-1161.
- Lin CY**, Morel DW. Esterification of oxysterols in human serum: effects on distribution and cellular uptake. *J Lipid Res*. 1996; 37(1):168-178.
- Lotharius J**, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci*. 2002; 3(12):932-942.

- Lütjohann D**, Papassotiropoulos A, Björkhem I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD, Schlegel U, Jessen F, Rao ML, von Bergmann K, Heun R. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J Lipid Res.* 2000; 41(2):195-198.
- Luu W**, Sharpe LJ, Capell-Hattam I, Gelissen IC, Brown AJ. Oxysterols: Old Tale, New Twists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2016; 56:447-467.
- Mast N**, Lin JB, Pikuleva IA. Marketed Drugs Can Inhibit Cytochrome P450 27A1, a Potential New Target for Breast Cancer Adjuvant Therapy. *Mol Pharmacol.* 2015; 88(3):428-436.
- Marwarha G**, Rhen T, Schommer T, Ghribi O. The oxysterol 27-hydroxycholesterol regulates α -synuclein and tyrosine hydroxylase expression levels in human neuroblastoma cells through modulation of liver X receptors and estrogen receptors--relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2011; 119(5):1119-1136.
- Mayeux R**. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci.* 2003; 26:81-104.
- McShane R**, Westby MJ, Roberts E, Minakaran N, Schneider L, Farrimond LE, Maayan N, Ware J, Debarros J. Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019; 3(3):CD003154.
- Meldrum B**, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1990; 11(9):379-387.
- Nelson ER**, Wardell SE, Jasper JS, Park S, Suchindran S, Howe MK, Carver NJ, Pillai RV, Sullivan PM, Sondhi V, Umetani M, Geradts J, McDonnell DP. 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science.* 2013; 342(6162):1094-1098.
- Nelson TJ**, Alkon DL. Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and beta-amyloid peptide. *J Biol Chem.* 2005; 280(8):7377-7387.
- Nicklas WJ**, Vyas I, Heikkila RE. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 1985; 36(26):2503-2508.
- Olkkonen VM**, Béaslas O, Nissilä E. Oxysterols and their cellular effectors. *Biomolecules.* 2012; 2(1):76-103.
- Pankratz N**, Pauculo MW, Elsaesser VE, Marek DK, Halter CA, Wojcieszek J, Rudolph A, Shults CW, Foroud T, Nichols WC; Parkinson Study Group - PROGENI Investigators. Mutations in DJ-1 are rare in familial Parkinson disease. *Neurosci Lett.* 2006; 408(3):209-213.
- Parkinson J**. An Essay on the Shaking Palsy. London: Whittingham and Rowland Sherwood, Neely and Jones; 1817.
- Pelc B**. 5 α - C holestano[7,6-c] pyrazole Derivatives. *J. Chem. SOC,* 1971; 3914-3916.
- Pidman V**. Demence. Vyd. 1. Praha: Grada, 2007. Psyché. str.42 ISBN 9788024714905.
- Poli G**, Biasi F, Leonarduzzi G. Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. *Redox Biol.* 2013; 1(1):125-130.
- Polymeropoulos MH**, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 1997; 276(5321):2045-2047.
- Prunet C**, Montange T, Vélux A, Laubriet A, Rohmer JF, Riedinger JM, Athias A, Lemaire-Ewing S, Néel D, Petit JM, Steinmetz E, Brenot R, Gambert P, Lizard G. Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients. *Cytometry A.* 2006; 69(5):359-373.

- Radhakrishnan A**, Ikeda Y, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(16):6511-6518.
- Ramirez A**, Heimbach A, Gründemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat AL, Roeper J, Al-Din A, Hillmer AM, Karsak M, Liss B, Woods CG, Behrens MI, Kubisch C. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet*. 2006; 38(10):1184-1191.
- Rantham Prabhakara JP**, Feist G, Thomasson S, Thompson A, Schommer E, Ghribi O. Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on tyrosine hydroxylase and alpha-synuclein in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem*. 2008; 107(6):1722-1729.
- Rárová L**, Steigerová J, Kvasnica M, Bartůněk P, Křížová K, Choudounská H, Kolář Z, Sedlák D, Oklestkova J, Strnad M. Structure activity relationship studies on cytotoxicity and the effects on steroid receptors of AB-functionalized cholestanes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016; 159:154-169.
- Reisberg B**, Doody R, Stöffler A, Schmitt F, Ferris S, Möbius HJ; Memantine Study Group. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2003; 348(14):1333-1341.
- Rektor I**. Léčba Parkinsonovy nemoci. *Neurologie pro praxi*. 2009; 6:340-346. dostupné online: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2009/06/04.pdf> [staženo 19.3.2022]
- Richmond V**, Careaga VP, Sacca P, Calvo JC, Maier MS. Synthesis and cytotoxic evaluation of four new 6E-hydroximinosteroids. *Steroids*. 2014; 84:7-10.
- Roussi S**, Winter A, Gosse F, Werner D, Zhang X, Marchioni E, Geoffroy P, Miesch M, Raul F. Different apoptotic mechanisms are involved in the antiproliferative effects of 7beta-hydroxysitosterol and 7beta-hydroxycholesterol in human colon cancer cells. *Cell Death Differ*. 2005; 12(2):128-135.
- Rusina R**, Matěj R. Neurodegenerativní onemocnění: 2. přepracované a doplněné vydání, Praha: Mladá fronta, 2019, str. 27, 32-35. ISBN 978-80-204-5123-1.
- Samadi A**, Sabuncuoglu S, Samadi M, Isikhan SY, Chirumbolo S, Peana M, Lay I, Yalcinkaya A, Bjørklund G. A Comprehensive Review on Oxysterols and Related Diseases. *Curr Med Chem*. 2021; 28(1):110-136.
- Sever N**, Yang T, Brown MS, Goldstein JL, DeBose-Boyd RA. Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Mol Cell*. 2003; 11(1):25-33.
- Song BL**, DeBose-Boyd RA. Ubiquitination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in permeabilized cells mediated by cytosolic E1 and a putative membrane-bound ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2004; 279: 28798-28806.
- Spillantini MG**, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(11):6469-6473.
- Swan R**, Alnabulsi A, Cash B, Alnabulsi A, Murray GI. Characterisation of the oxysterol metabolising enzyme pathway in mismatch repair proficient and deficient colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016; 7:46509–46527.
- Tatton WG**, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N. Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol*. 2003; 53(3):61-70.

- Testa G**, Gamba P, Badilli U, Gargiulo S, Maina M, Guina T, Calfapietra S, Biasi F, Cavalli R, Poli G, Leonarduzzi G. Loading into nanoparticles improves quercetin's efficacy in preventing neuroinflammation induced by oxysterols. *PLoS One*. 2014; 9(5):e96795.
- Tretter L**, Sipos I, Adam-Vizi V. Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochem Res*. 2004; 29(3):569-77.
- Umetani M**, Domoto H, Gormley AK, Yuhanna IS, Cummins CL, Javitt NB, Korach KS, Shaul PW, Mangelsdorf DJ. 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen. *Nat Med*. 2007; 13(10):1185-1192.
- Umetani M**, Ghosh P, Ishikawa T, Umetani J, Ahmed M, Mineo C, Shaul PW. The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol promotes atherosclerosis via proinflammatory processes mediated by estrogen receptor alpha. *Cell Metab*. 2014; 20(1):172-182.
- Vejux A**, Lizard G. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol Aspects Med*. 2009; 30(3):153-170.
- Weber-Boyvot M**, Zhong W, Yan D, Olkkonen VM. Oxysterol-binding proteins: functions in cell regulation beyond lipid metabolism. *Biochem Pharmacol*. 2013; 86(1):89-95.
- Wu Q**, Ishikawa T, Sirianni R, Tang H, McDonald JG, Yuhanna IS, Thompson B, Girard L, Mineo C, Brekken RA, Umetani M, Euhus DM, Xie Y, et al. 27-Hydroxycholesterol promotes cell-autonomous, ER-positive breast cancer growth. *Cell Rep*. 2013; 5:637-645.
- Yan D**, Olkkonen VM. Characteristics of oxysterol binding proteins. *Int Rev Cytol*. 2008; 265:253-285.
- Zhu X**, Wang K, Zhang K, Lin X, Zhu L, Zhou F. Puerarin Protects Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells against Glutamate-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. *J Biochem Mol Toxicol*. 2016; 30(1):22-28.
- Zmysłowski A**, Szterk A. Oxysterols as a biomarker in diseases. *Clin Chim Acta*. 2019; 491:103-113.