

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Biologická aktivita přírodních a syntetických
oxysterolů na buněčné linii SH-SY5Y**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Iva Gřešková
Studijní program:	N1501 Experimentální 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	Iva Gřešková
Název práce	Biologická aktivita přírodních a syntetických oxysterolů na buněčné linii SH-SY5Y
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt

Oxysteroly jsou kyslíkaté deriváty cholesterolu vznikající jak enzymatickou, tak neenzymatickou cestou. Jsou zapojeny do mnoha fyziologických i patofyziologických procesů včetně neurodegenerativních onemocnění. Pomocí organické syntézy se podařilo nasyntetizovat 9 oxysterolů. U těchto a dalších vybraných přírodních oxysterolů byla testována biologická aktivita na neuroblastomové buněčné linii SH-SY5Y, u které byl navozen *in vitro* model neurodegenerace pomocí glutamátu. Neuroprotektivní účinky vykazovalo 5 syntetických oxysterolů a žádný přírodní. Bylo jednak pozorováno zvýšení viability buněk ovlivněných toxinem, ale i snižování míry oxidativního stresu nebo zvyšování membránového potenciálu mitochondrií a také potlačení aktivity kaspázy 3/7. Žádný z testovaných oxysterolů (přírodní či syntetické) nevykazoval cytotoxické účinky v použitých koncentracích.

Klíčová slova	Oxysteroly, neurodegenerativní onemocnění, syntéza, biologická aktivita, neuroprotektivní účinky.
Počet stran	64
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Iva Gřešková
Title of thesis	Biological activity of natural and synthetic oxysterols on SH-SY5Y cell line
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of growth regulators
Supervisor	RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D.
The year of presentation	2022

Abstract Oxysterols are oxidized derivatives of cholesterol synthesized via enzymatic or nonenzymatic pathways. They are involved in many physiological and pathophysiological processes including neurodegenerative diseases. Nine oxysterols were prepared via organic synthesis. Biological activity of synthetic and natural oxysterols was studied on neuroblastoma SH-SY5Y cell line with glutamate-induced neurodegeneration. Neuroprotective effects were observed for five synthetic oxysterols and none of natural. Synthetic oxysterols were able to increase viability, decrease oxidative stress or increase mitochondrial membrane potential, and were also able to inhibit caspase 3/7 activity of cells treated with glutamate. None of tested oxysterols (synthetic or natural) showed cytotoxic effect in the range of concentrations used.

Keywords	Oxysterols, neurodegenerative diseases, synthesis, biological activity, neuroprotective effects.
Number of pages	64
Number of attachment	0
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Bc. Iva Gřešková

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala svému školiteli RNDr. Miroslavu Kvasnicovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady a připomínky, ale také za vstřícný a lidský přístup v průběhu práce na mé diplomové práci. Dále bych chtěla poděkovat konzultantovi Mgr. Gabrielovi Gonzalezovi, Ph.D. za pomoc a dohled při práci na biologické části diplomové práce a při statistickém vyhodnocování. V neposlední řadě také Bc. Ditě Jordové a Janě Hrubéšové za asistenci v laboratořích. Děkuji, že tato práce mohla vzniknout za použití finančních prostředků z GAČR_20-15621-S.

Obsah

Seznam zkratek	8
1. Úvod.....	10
2. Teoretická část	11
2.1. Oxysteroly	11
2.1.1. Původ a metabolismus oxysterolů v organismu	11
2.1.2. Fyziologická role oxysterolů v organismu.....	14
2.1.3. Patofyziologická role oxysterolů v organismu	15
2.1.4. Zapojení oxysterolů v neurodegenerativních onemocněních	18
2.2. Neurodegenerativní onemocnění	19
2.2.1. Alzheimerova choroba.....	19
2.2.2. Parkinsonova choroba.....	21
2.2.3. Jiná neurodegenerativní onemocnění.....	23
3. Experimentální část.....	25
3.1. Chemická část	25
3.1.1. Materiál a metody	25
3.1.1.1. Chemikálie.....	25
3.1.1.2. Laboratorní přístroje a pomůcky	25
3.1.1.3. Obecný postup při syntéze oxysterolů.....	26
3.1.1.4. Syntéza látky IG1	27
3.1.1.5. Syntéza látek IG2A/IG2B.....	28
3.1.1.6. Syntéza látky IG3	29
3.1.1.7. Syntéza látky IG4 (7-KC).....	30
3.1.1.8. Syntéza látky IG5	31
3.1.1.9. Syntéza látky IG6	32
3.1.1.10. Syntéza látky IG8.....	33
3.1.1.11. Syntéza látky IG9	34

3.1.1.12.	Syntéza látky IG10	35
3.1.1.13.	Syntéza látky IG11	36
3.1.1.14.	Syntéza látky IG12	37
3.1.1.15.	Syntéza látky IG13	38
3.1.1.16.	Syntéza látky IG14	39
3.2.	Biologická část	40
3.2.1.	Materiál a metody	40
3.2.1.1.	Chemikálie	40
3.2.1.2.	Laboratorní přístroje a pomůcky	41
3.2.1.3.	Buněčná linie SH-SY5Y	41
3.2.1.4.	Stanovení buněčné smrti pomocí propidium jodidu (PI)	41
3.2.1.5.	Stanovení buněčné smrti pomocí laktát dehydrogenasy (LDH).....	42
3.2.1.6.	Měření oxidativního stresu pomocí dihydroethidia (DHE).....	42
3.2.1.7.	Měření aktivity kaspasy 3/7.....	42
3.2.1.8.	Měření mitochondriálního membránového potenciálu pomocí JC10	43
3.2.1.9.	Stanovení cytotoxicity pomocí propidium jodidu (PI) s tritonem X-100	43
4.	Výsledky a diskuze	44
4.1.	Syntéza látek	44
4.2.	Biologická aktivita	46
5.	Závěr	55
	Použitá literatura	56

Seznam zkratek

11 β -HSD1	11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza typu 1
22(R)-HC	22(R)-hydroxycholesterol
22(S)-HC	22(S)-hydroxycholesterol
24(S)-HC	24(S)-hydroxycholesterol
25-HC	25-hydroxycholesterol
27-HC	27-hydroxycholesterol
4 β -HC	4 β -hydroxycholesterol
7-KC	7-ketocholesterol
7-keto-25-HC	7-keto-25-hydroxycholesterol
7-OOHC	7-hydroperoxycholesterol
7 α / β -HC	7 α / β -hydroxycholesterol
7 α -27-dHC	7 α -27-dihydroxycholesterol
ABCA1	ATP-vazebný kazetový protein A1
ABCG1	ATP-vazebný kazetový protein G1
ACAT	Acyl-koenzym A cholesterol transferasa
AD	Alzheimerova choroba
ALS	Amyotrofická laterální skleróza
ATP	Adenosintrifosfát
ATRA	Kyselina all- <i>trans</i> retinová
A β ₁₋₄₂	Amyloidu β isoforma 1-42
Bcl-2	B-cell lymfoma 2
C9orf72	Otevřený čtecí rámec 72 na chromozomu 9
CAG	Cytosin-adenin-guanin
DHE	Dihydroethidium
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/směs živin F12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTT	Dithiotreitol
FBS	Fetální bovinní sérum
FUS	Gen fúzovaný v sarkomu
GBA1	β -glukocerebrosidasa-A

Glu	Glutamát
HD	Huntingtonova choroba
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A
CH25H	Cholesterol 25-hydroxylasa
INSIG	Insulin indukovaný gen
Ketodiol	6-keto-5 α -hydroxycholesterol
LCAT	Lecithin-cholesterol acyltransferasa
LDH	Laktát dehydrogenasa
LXR	Jaterní X receptor
MAPT	Tau protein asociovaný s mikrotubuly
MCF-7	Michigan cancer foundation 7, instituce, kde byla tato buněčná linie založena
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
MS	Hmotnostní spektrometrie
NFT	Neurofibrilární vlákna
NMDA	N-methyl-D-aspartát receptor
NMR	Nukleární magnetická rezonance
OSBP1	Protein 1 vázající oxysterol
PARK1-23	Lokus způsobující Parkinsonovu chorobu
PBS	Fosfátový pufr
PD	Parkinsonova choroba
PI	Propidium jodid
PINK1	PTEN-indukovaná kinasa 1
PMSF	Fenylmethylsulfonylfluorid
R-LA	Kyselina R-lipoová
ROS	Volné kyslíkaté radikály
Scap	SREBP protein aktivující štěpení
SOD1	Superoxid dismutasa 1
SREBP	Sterol regulující element vázající protein
SULT2B1b	Sulfottransferasa
TARDBP/TDB-43	Element trans-aktivační odezvy DNA-vazebný protein
TLC	Tenkvrstevná kapalinová chromatografie
TRIOL	Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol

1. Úvod

Oxysteroly jsou kyslíkaté deriváty cholesterolu. Vznikají jak enzymatickou, tak neenzymatickou cestou. Na enzymatické přeměně se nejčastěji podílejí enzymy z rodiny cytochromu P450, na neenzymatické pak volné kyslíkaté radikály. Oxysteroly jsou jednak metabolické meziprodukty (v metabolismu žlučových kyselin), ale také biologicky aktivní molekuly. Podílejí se na udržování homeostázy cholesterolu nebo slouží jako signální molekuly. V organismu zastávají také roli v patofyziologických procesech. V určitých koncentracích působí cytotoxicky, vyvolávají apoptózu nebo modulují zánětlivou reakci. Některé jsou zapojeny do patogeneze aterosklerózy, osteoporózy nebo do patogeneze neurodegenerativních onemocnění. V nižších koncentracích by však mohli neurony chránit před procesem neurodegenerace.

Mezi nejčastější neurodegenerativní onemocnění patří Alzheimerova, Parkinsonova nebo Huntingtonova choroba nebo amyotrofická laterální skleróza. Jsou charakterizovány ztrátou kognitivních schopností a/nebo poruchou motoriky. Onemocnění se manifestují nejčastěji v pokročilém věku. Dochází k agregaci špatně složených proteinů v buňkách a následně ke ztrátám určitých neuronových populací.

Cílem této práce bylo nasyntetizovat knihovnu oxysterolů. Následně zjistit, zda některý z přírodních či syntetických oxysterolů nemá biologickou aktivitu a potenciální neuroprotektivní účinky.

2. Teoretická část

2.1. Oxysteroly

Oxysteroly jsou kyslíkaté deriváty cholesterolu vznikající jeho enzymatickou nebo neenzymatickou oxidací. Podle počtu modifikací lze oxysteroly rozdělit na primární a sekundární. Primární mají modifikovaný postranní řetězec nebo jeden z kruhů. Sekundární jsou modifikovány dvěma a více hydroxy, epoxy, keto nebo hydroperoxy skupinami. Oxysteroly jsou považovány za metabolické meziprodukty, ale i biologicky aktivní molekuly zapojené do mnoha procesů včetně udržování homeostázy cholesterolu (Luu et al., 2016; Samadi et al., 2021).

2.1.1. Původ a metabolismus oxysterolů v organismu

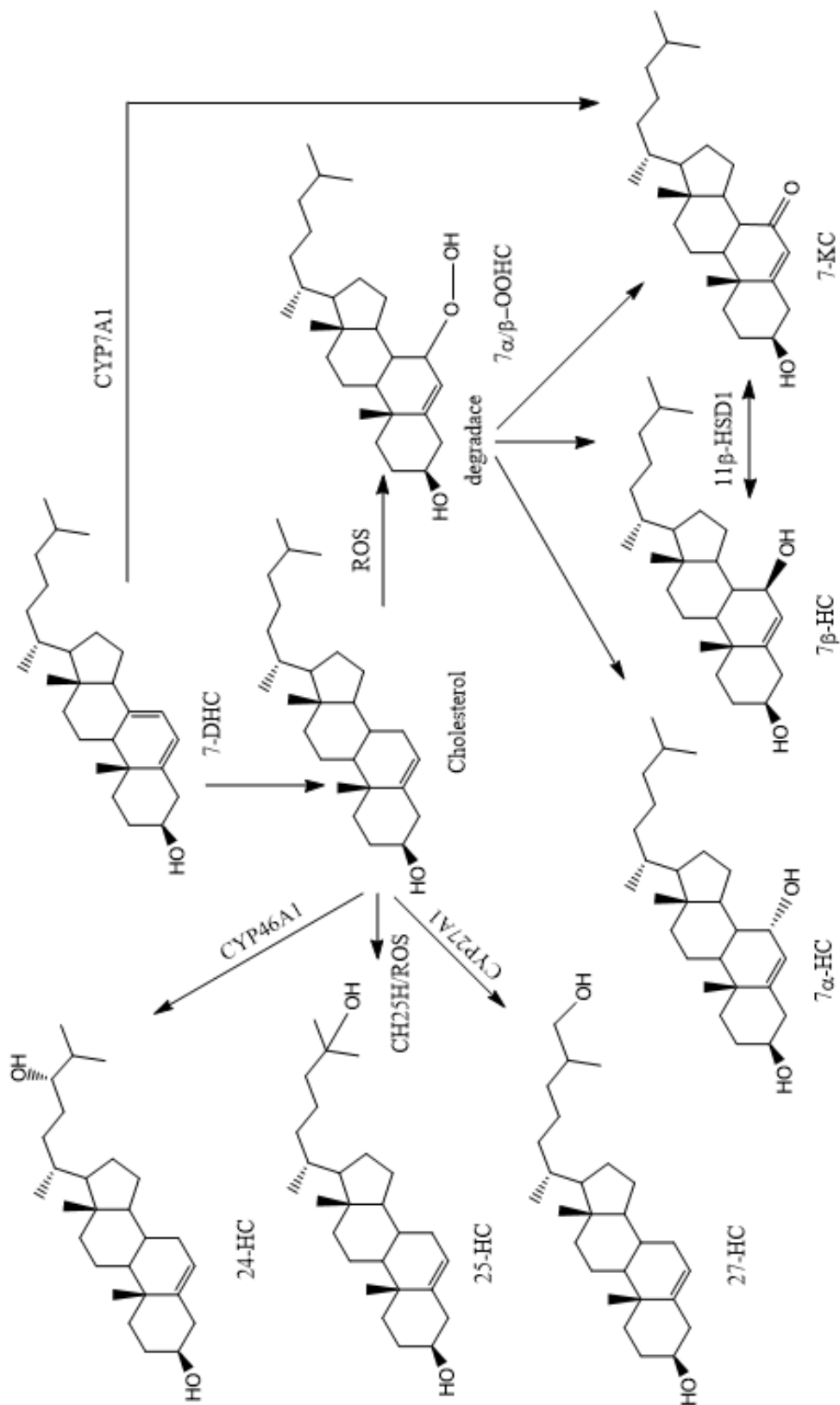
Oxysteroly v periferních tkáních mohou vznikat z cholesterolu v potravě (oxidací – napadením volným radikálem) nebo endogenně enzymatickou nebo neenzymatickou přeměnou cholesterolu (Vaya & Schipper, 2007). Obecně oxysteroly s modifikovaným kruhem vznikají neenzymaticky, zatímco oxysteroly s modifikovaným postranním řetězcem jsou syntetizovány enzymatickou cestou (Obrázek 1). Toto neplatí zcela přesně ve všech případech, například 25-hydroxycholesterol (25-HC), 7 α / β -hydroxycholesterol (7 α / β -HC) a 7-ketocholesterol (7-KC) vznikají jak enzymatickou, tak neenzymatickou cestou (Brown & Jessup, 2009).

Neenzymaticky vznikají oxysteroly působením volných kyslíkatých radikálů (ROS) na cholesterol pocházející buď z potravy, nebo z endogenních zdrojů – v lipoproteinech nebo buněčných membránách. Díky přítomnosti dvojně vazby mezi 5. a 6. uhlíkem B-kruhu dojde při reakci s ROS k odtržení vodíku na 7. uhlíku. Tento uhlík dále reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku 7-hydroperoxycholesterolu (7-OOHC, α i β isomeru) (Brown & Jessup, 2009; Luu et al., 2016). 7-OOHC je nejčastějším oxysterolem vznikajícím v raných fázích neenzymatické oxidace (Brown et al., 1997). Produkty jeho degradace jsou 7-KC (nejpoužívanější marker neenzymatické oxidace cholesterolu), 7 α -hydroxycholesterol (7 α -HC) a 7 β -hydroxycholesterol (7 β -HC) (Luu et al., 2016). 7-KC může kromě neenzymatické degradace vznikat i enzymaticky, a to ze 7-dehydrocholesterolu pomocí cytochromu P450 (CYP), přesněji pomocí CYP7A1 (Shinkyō et al., 2011), nebo při konverzi

ze 7 β -HC pomocí 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázy typu 1 (11 β -HSD1/CYP11 β) (Larsson et al., 2007), což přispívá k udržování rovnováhy mezi 7-KC a 7 β -HC (Mitić et al., 2013). Stejně jako 7-KC a 7 β -HC může i 7 α -HC vznikat enzymaticky, a to jako meziprodukt v metabolismu žlučových kyselin pomocí CYP7A1 (Russell, 2003).

Enzymatickou hydroxylací vedlejšího řetězce cholesterolu vznikají 24-, 25-, a 27-hydroxycholesterol (24-HC, 25-HC a 27-HC), každý pomocí jiného enzymu (Russell, 2000). 24-HC je produkován cholesterol 24-hydroxylázou (CYP46A1), jež se nachází v endoplazmatickém retikulu (Lund et al., 1999) a nejvíce je exprimována v neuronálních buňkách mozku, přičemž mozek je hlavním zdrojem tohoto oxysterolu v krevním oběhu (Björkhem et al., 1998). Cholesterol 25-hydroxyláza (CH25H) nacházející se v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu produkuje 25-HC v nízkých koncentracích v mnoha tkáních. Jedná se o malý hydrofobní protein patřící do malé rodiny nehemových železo obsahujících proteinů (Lund et al., 1998). Stejně jako 24-HC je i 27-HC produkován enzymem z rodiny CYP, a to sterol 27-hydroxylásou (CYP27A1). CYP27A1 je mitochondriální enzym nacházející se v mnoha tkáních, především pak v játrech. Tento enzym katalyzuje první krok v alternativní cestě pro syntézu žlučových kyselin (adici hydroxylové skupiny na vedlejší řetězec cholesterolu a příbuzných sterolů) (Brown & Jessup, 2009; Cali & Russell, 1991).

Většina enzymatických drah pro metabolismus cholesterolu je také schopná metabolizovat oxysteroly. Například acyl-CoA cholesterol transferasa (ACAT) nebo lecithin-cholesterol acyltransferasa (LCAT) jsou schopny esterifikovat oxysteroly v buňkách nebo v plazmě (Brown & Jessup, 2009). Další metabolickou dráhou je oxidace pomocí CYP27A1, která mimo tvorby 27-HC z cholesterolu je také schopná metabolizovat 7-KC na 7-keto-27-hydroxycholesterol, jež je meziproduktem v tvorbě ve vodě rozpustných produktů v metabolismu 7-KC (Lyons & Brown, 2001). Redukcí 7-KC vzniká 7 β -HC za působení 11 β -HSD1, jež je nejvíce známa pro svou roli v metabolismu glukokortikoidů (Jessup & Brown, 2005). Další metabolickou dráhou je sulfatace. Sulfottransferása SULT2B1b, jejímiž substráty jsou především steroly/steroidy, je také schopna sulfatovat oxysteroly jako 7-KC, což se jeví jako významná cesta eliminace tohoto oxysterolu, který jinak může působit toxicky na buňku (Fuda et al., 2007).



Obrázek 1 Vznik oxysterolů enzymatickou nebo enzymatickou cestou z cholesterolu.. ROS – reaktivní kyslíkové radikály, CH25H – cholesterol 25-hydroxyláza, 7 α/β -OOHC – 7 α/β -hydroperoxycholesterol, 7 α -HC – 7 α -hydroxycholesterol, 7 β -HC – 7 β -hydroxycholesterol, 7-KC – 7-ketocholesterol, 7-DHC – 7-dehydrocholesterol, 24-HC – 24-hydroxycholesterol, 25-HC – 25-hydroxycholesterol, 27-HC – 27-hydroxycholesterol.

2.1.2. Fyziologická role oxysterolů v organismu

Oxysteroly jsou zapojeny do vybraných fyziologických procesů, ve kterých hrají roli například jako regulátory homeostázy cholesterolu, jako signální molekuly, jako regulátory transkripce metabolismu nebo jako metabolické meziprodukty (Samadi et al., 2021).

V mozku se nachází zhruba 25 % z celkového cholesterolu v těle, především v neesterifikované podobě. Cholesterol jako takový nemůže přecházet hematoencefalickou bariérou (Samadi et al., 2021). Pro udržení stálých hladin cholesterolu si buňky vyvinuly nejméně čtyři různé strategie, které limitují jeho akumulaci (snižují jeho tvorbu a příjem), stimulují jeho vylučování z buňky a zvyšují jeho ukládání v podobě jeho esterů (Brown & Jessup, 2009).

Na tvorbě cholesterolu se podílí 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) reductáza, která katalyzuje redukce HMG-CoA na mevalonát. Vybrané oxysteroly jsou však schopny zvyšovat posttranslační degradaci HMG-CoA reductázy pomocí ubiquitinizace a následného rozložení proteazomem, čímž snižují tvorbu nového cholesterolu při jeho nadbytku (DeBose-Boyd, 2008).

Sterol regulující element vázající protein (SREBP) je produkován jako neaktivní prekurzor v endoplazmatickém retikulu vázaný na SREBP protein aktivující štěpení (Scap), který funguje jako sensor hladiny cholesterolu v membráně endoplazmatického retikula (Goldstein et al., 2006). Když hladina cholesterolu klesne pod kritickou hranici SREBP, společně se Scap jsou transportovány do Golgiho aparátu, kde dochází k aktivaci biosyntézy cholesterolu. Jakmile je hladina cholesterolu obnovena nebo je vyšší, SREBP/Scap komplex je transportován zpět do endoplazmatického retikula, a to pomocí insulin indukovaného genu (INSIG). Bylo zjištěno, že cholesterol se váže pouze na Scap, zatímco oxysteroly pouze na INSIG (Radhakrishnan et al., 2007).

Na zvýšeném vylučování cholesterolu z buňky se podílí jaterní X receptor (LXR). Jedná se o jaderný receptor, jehož přirozenými ligandy jsou vybrané oxysteroly. Má na starosti expresi genů kódujících proteiny transportující cholesterol z buněk jako ATP-vazebné kazetové proteiny (ABCA1 a ABCG1) (Wong et al., 2004).

Při překročení určité hladiny buněčného cholesterolu dochází k jeho ukládání ve formě cholesterylesterů, což umožňuje ACAT v endoplazmatickém retikulu (Xu & Tabas, 1991). Aktivátorem ACAT a následné esterifikace je z oxysterolů například 25-HC (Cheng et al., 1995).

Role oxysterolů jako signálních molekul je známá například v Hedgehog signální dráze, která je evolučně konzervována u obratlovců a hraje velkou roli při embryonálním vývoji. Aberantní Hedgehog signální dráha je zapojena při vzniku vývojových/kongenitálních vad a u mnoha druhů rakovin (Briscoe & Théron, 2013). Hedgehog je produkován jako proteinový prekurzor, který podléhá proteolýze a různým modifikacím vedoucím ke vzniku kovalentní vazby s cholesterolem, což umožňuje Hedgehog proteinu těsnou vazbu na buněčný povrch. V buněčné membráně se komplex cholesterol-Hedgehog protein váží na příslušný receptor Patched, ten uvolňuje Smoothened, což vede k aktivaci transkripce cílených vývojových genů pomocí rodiny transkripčních faktorů Gli (Luu et al., 2016). Oxysteroly byly poprvé spojeny s Hedgehog signální dráhou, když 25-HC (ne však 7 β -HC) byl schopen aktivovat transkripci Hedgehog cílových genů v meduloblastomu (Corcoran & Scott, 2006) a v pluripotentních mezenchymálních buňkách (Dwyer et al., 2007). Oxysteroly aktivují Hedgehog signální dráhu ne pomocí úpravy vlastností membrány, ale pomocí sterol-proteinové interakce, což indikuje stereoselektivní efekt oxysterolů a jejich vazbu do alostericky aktivovaného Smoothened (Nachtergaele et al., 2012).

Oxysteroly jako 20(S)-hydroxycholesterol, 22(S)- nebo 22(R)-hydroxycholesterol jsou v osteogenezi silnými modulátory signální dráhy schopné předejít osteoporóze. Ať už 20(S)-hydroxycholesterol samotný nebo asociovaný s 22(S)- nebo 22(R)-hydroxycholesterolem je silným induktorem osteogenní diferenciace, která je zprostředkována vlivem oxysterolů na cyklooxygenázu/fosfolipázu A₂ nebo na mechanismus závislý na mitogenem aktivované protein kinase (Kha et al., 2004).

2.1.3. Patofyziologická role oxysterolů v organismu

U oxysterolů byla zjištěna cytotoxicita, apoptopický a zánětlivý efekt a jsou také spojovány s chronickými onemocněními včetně aterosklerózy a neurodegenerativními procesy (Samadi et al., 2021).

Co se cytotoxicity týče, mluví se o jejich schopnosti narušit hladiny vnitrobuněčného vápníku, nadprodukovat ROS uvnitř buňky, modifikovat mitochondriální a lyzozomální membránu, nebo schopnosti porušit metabolismus polyaminů (Otaegui-Arrazola et al., 2010; Poli et al., 2009).

U vybraných oxysterolů je v *in vitro* studiích popsán apoptopický efekt, který může být způsoben, stejně jako cytotoxicity, schopností oxysterolů zvyšovat hladiny ROS uvnitř buňky. Oxysteroly také mohou indukovat modifikace buněčných proteinů nebo může docházet k úpravám různých signálních drah a genových expresí. K indukcii apoptózy dochází pomocí dvou hlavních drah, a to buď skrz receptory smrti, nebo přes poškození mitochondrií. Oxysteroly jsou schopny apoptózu indukovat skrz obě dvě dráhy, přičemž se navzájem liší v mechanismu, a proto zatím nelze popsat univerzální mechanismus oxysterolů pro indukcii apoptózy (Lordan et al., 2009; Morrissey & Kiely, 2006).

Studované oxysteroly v patofyziologických procesech (např. 7 α -HC, 7 β -HC, 7-KC, 24-HC nebo 27-HC) jsou považovány za silné zesilovače zánětlivých reakcí pomocí vyvolání exprese prozánětlivých cytokinů, mezi které patří tumor nekrotizující faktor α , interleukin-1 β a 6, chemokinů jako interleukin 8 nebo monocytárního chemotaktického proteinu 1 a monocytárního zánětlivého proteinu 1 β . Tyto a další prozánětlivé modulátory jsou závislé na aktivitě jaderného faktoru κ B, u kterého bylo zjištěno, že je silně nadregulován oxysteroly skrz aktivaci protein kinázy C (Poli et al., 2013).

V mnoha studiích bylo ukázáno, že oxysteroly jsou jedny z hlavních sloučenin, které jsou schopné podporovat rozvoj aterosklerózy v různých stádiích tohoto onemocnění (Shibata & Glass, 2010; Vejux & Lizard, 2009). V pokročilých aterosklerotických lézích je nejvíce zastoupen 27-HC, dalším v pořadí je 7-KC, následují pak 7 β -HC a 7 α -HC, dohromady tvoří přibližně 75-85 % všech oxysterolů přítomných v lézích (Khatib & Vaya, 2014). Půjdeme-li však od začátku, tak ještě před rozvojem aterosklerotického plátu, oxysteroly mohou přispívat k inhibici relaxace cév, což vede ke zvýšení krevního tlaku. Například u 7-KC bylo prokázáno, že inhibuje relaxaci cév závislou na endoteliích pomocí snížení uvolňování oxidu dusnatého, který je hlavním faktorem dané relaxace (Deckert et al., 2002). Dále 7-KC ale i 7 β -HC a 7 α -HC mohou vyvolat zánět v endoteliálních buňkách a zvýšit expresi adhezivních molekul (Lemaire et al., 1998). 7-KC může přispívat k formaci tukových pruhů v prvním kroku k tvorbě aterosklerotického plátu, což je charakterizováno akumulací monocytů v subendoteliálním prostoru a následnou akumulací lipidů v těchto monocytech, a tím ke vzniku pěnových buněk (Vejux & Lizard, 2009). 7-KC může také mít částečně pod kontrolou progresi aterosklerotického plátu (Zarrouk et al., 2014). Ke konci aterosklerózy, tedy v pokročilých aterosklerotických plátech, přispívají některé oxysteroly k erozi a k protržení plátu. Například u cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triolu (TRIOLEOL) bylo prokázáno, že přispívá ke kalcifikaci buněk hladkého svalstva cév, což oslabuje cévní stěnu (Liu et al., 2004).

U starších lidí přispívá hypercholesterolemie ke zvýšení produkce oxysterolů, jež se mohou podílet na vzniku diabetu mellitu druhého typu. Narušení redoxní homeostázy u diabetických pacientů je podporováno zvýšenými hladinami 7-KC, 7 β -HC a 7 α -HC, které by mohly představovat vhodné biomarkery oxidačního stresu u diabetu (Astiasarán, 2011). Teorii o zapojení oxysterolů do vzniku diabetu druhého typu podporuje fakt, že profilin-1, jež je ve větší míře v diabetickém endoteliu, je up-regulovaný 7-KC prostřednictvím proteinu 1 vázajícího oxysterol (OSBP1) (Romeo & Kazlauskas, 2008).

Na rozdíl od 20(S)-hydroxycholesterolu a 22(S)- nebo 22(R)-hydroxycholesterolu, které přispívají k prevenci osteoporózy (Kha et al., 2004), TRIOL může inhibovat osteogenní diferenciaci a podněcovat apoptózu u krysích kmenových buněk (Liu et al., 2005), což naznačuje, že některé oxysteroly mohou přispívat k osteoporóze. K této teorii přispívá fakt, že zvýšení hladin 27-HC pomocí injekčního podání nebo genetickým narušením lokusu CYP7B1 $^{-/-}$ (enzym odpovídající za katabolismus 27-HC) vede k výraznému zmenšení hutné i houbovitě kostní tkáně (DuSell et al., 2010).

V mnoha studiích bylo naznačeno, že oxysteroly jsou zapojeny do patofyziologie různých druhů rakovin, například rakoviny tlustého střeva, kůže, plic, prsů nebo rakoviny žlučových (Samadi et al., 2021). Vzhledem ke známým faktům je možné, že oxysteroly ovlivňují riziko vzniku a průběh rakoviny různými způsoby, a to díky odlišnému chování a působení oxysterolů v různých buněčných liniích. Může to být způsobeno schopností oxysterolů modulovat zánět nebo signální dráhy (Hedgehog) nebo prostřednictvím interakcí s proteiny vázajícími oxysteroly (Kloudova et al., 2017). U rakoviny prsu bylo zjištěno, že 27-HC stimuluje růst MCF-7 buněk (Brooks et al., 1973) u xenograftních myší. Zároveň bylo prokázáno, že u rakovin prsů s přítomností estrogenových receptorů na povrchu nádorových buněk je zvýšená hladina 27-HC ve zdravých tkáních prsů ve srovnání s kontrolami bez rakoviny. Zároveň je také zvýšena hladina 27-HC v samotném nádoru. Dále bylo dokázáno, že zvýšené hladiny 27-HC nejsou ovlivněny hladinami cirkulujícího 27-HC, ale jsou způsobeny sníženou expresí CYP7B1, který metabolizuje 27-HC. Z těchto zjištění lze vyvodit, že 27-HC je nearomatizovaným ligandem estrogenových receptorů, který podporuje růst rakoviny prsu s přítomností estrogenových receptorů na povrch nádorových buněk (Q. Wu et al., 2013).

2.1.4. Zapojení oxysterolů v neurodegenerativních onemocněních

Hypercholesterolemie je dlouho považována za rizikový faktor pro vznik Alzheimerovy (AD) a Parkinsonovy choroby (PD). Navíc se ukázalo, že narušená distribuce a metabolismus cholesterolu v mozku se podílí na patogenezi neurodegenerativních onemocnění (Poli et al., 2013). Narozdíl od cholesterolu mohou oxysteroly přecházet hematoencefalitickou bariéru, což může znamenat jejich zapojení do patofyziologických procesů v mozku (Lütjohann et al., 1996). Schopnost oxysterolů prostupovat bariéru znamená, že mozek může jejich nadbytečné množství eliminovat transportem do tělního oběhu, ale může také docházet k opačnému dění, kdy se toxické množství oxysterolů z tělního oběhu může akumulovat v mozku, což bylo potvrzeno u 27-HC (Heverin et al., 2004).

Oxysteroly, o kterých se nejvíce uvažuje, že jsou zapojeny do patogeneze neurodegenerativních onemocnění, jsou 24-HC a 27-HC (Sottero et al., 2009). Na jednu stranu se má za to, že 24-HC má protektivní účinek na centrální nervovou soustavu díky eliminaci přebytečného cholesterolu z mozku do krve (Björkhem et al., 2009). Na stranu druhou bylo prokázáno, že silně zesiluje proapoptické a pronekrotizující účinky amyloidu β isoformy 1-42 ($A\beta_{1-42}$) na dvou různých lidských neuronálních buněčných liniích (Gamba et al., 2011). Akumulace 27-HC v mozku, ať už z krevního oběhu u hypercholesterolemie, nebo syntézou přímo v mozku, je považována za toxickou a spojována s AD (Shafaati et al., 2011). 27-HC vykazuje nižší neurotoxicitu než 24-HC, avšak opravdový toxický efekt abnormální akumulace obou oxysterolů závisí na více faktorech – na přesné lokalizaci v mozku, na přítomnosti redoxní nerovnováhy, akumulaci železa, relativním vyčerpání antioxidantů a dalších (Gamba et al., 2011; Poli et al., 2013).

V lipidomické analýze mozků pacientů s Parkinsonovou chorobou byla zjištěna vyšší hladina oxysterolů selektivně lokalizovaná ve zřetivě kůře. Kromě zvýšených hladin 24-HC a 27-HC byly také zvýšeny hladiny 7α -HC, 7β -HC, 7-KC a $5\beta,6\beta$ -epoxycholesterolu, a to dvakrát v mozku postiženém Parkinsonovou chorobou oproti kontrolnímu zdravému mozku (Cheng et al., 2011).

2.2. Neurodegenerativní onemocnění

Neurodegenerativní onemocnění, mezi které patří například AD, PD, Huntingtonova choroba (HD) nebo amyotrofická laterální skleróza (ALS), jsou chronické neurologické stavy charakterizované poruchou kognitivních funkcí (progresivní ztrátou paměti) a/nebo poruchou motoriky. Nejčastěji se neurodegenerativní onemocnění objevují u pacientů s vyšším věkem, což může znamenat, že jsou tato onemocnění spojena s procesem stárnutí. Mimo to patří k mechanismům neurodegenerativních onemocnění také poškození DNA, zánět a dysregulace autofagie (Mao & Zhang, 2021).

U výše zmíněných onemocnění dochází k agregaci špatně složených proteinů a ke ztrátám určitých neuronových populací. Právě proteinové agregáty jsou často spojovány s odpovídajícími patologickými abnormalitami daných neurodegenerativních onemocnění. K odstranění agregovaných proteinů buňky využívají autofagii, která je jedním z hlavních intracelulárních mechanismů vedoucích k eliminaci těchto proteinů (Guo et al., 2018).

2.2.1. Alzheimerova choroba

Celosvětově kolem 55 milionů lidí trpí demencí, z toho asi 60-70 % tvoří AD, což z tohoto onemocnění dělá nejčastější formu demence (World Health Organization, 2017). AD se projevuje ztrátou krátkodobé paměti a poklesem kognitivních funkcí, což narušuje schopnost normálně a samostatně fungovat v každodenním životě. Většinou se jedná o sporadické onemocnění, malé procento pak tvoří familiární AD s Mendelovskou dědičností (autozomálně dominantní) (Sheppard & Coleman, 2020). Největším rizikovým faktorem je věk – zhruba 3 % případů AD připadají na skupinu lidí pod 65 let. Pravděpodobnost výskytu AD v 65 letech je asi 3 %. Okolo 85 let však pravděpodobnost stoupá až na 30 % (Association, 2019). Mezi další rizikové faktory patří fyzická neaktivita, obezita, špatné stravovací návyky, kouření, alkoholismus, stres, cukrovka, zvýšený krevní tlak, varianty v určitých genech (apolipoprotein E, prekurzorový protein pro amyloid β ($A\beta$), presenelin 1 a 2 a další) nebo znečištění ovzduší (Sheppard & Coleman, 2020; World Health Organization, 2017).

AD je charakterizována ztrátou synapsí a atrofii neuronů v celé mozkové kůře a hipokampu, přičemž dochází ke vzniku agregátů špatně poskládaných proteinů, jakými

jsou A β tvořící amyloidní plaky a protein tau (s tubulinem asociovaná jednotka) tvořící neurofibrilární vlákna (NFT) (Sheppard & Coleman, 2020).

Senilní plaky jsou primárně tvořeny různými amyloidními peptidy o délce 36-43 aminokyselin (nejčastější A β je dlouhý 40 a 42 aminokyselin) pocházejícími z transmembránového prekursorového proteinu pro amyloid β , který je štěpen β - a γ -sekretasou (katalytickou komponentu γ -sekretasy kóduje presenelin 1 a 2). Tyto peptidy se nachází v extracelulárním prostoru a jsou fibrilizovány, aby nedocházelo k jejich degradaci (Thal et al., 2015). Dle amyloidní hypotézy spouští nahromadění A β kaskádu událostí, která vede ke smrti neuronů a vzniku AD. Akumulace A β je pravděpodobně zodpovědná za smrt neuronů prostřednictvím více mechanismů, mezi které patří například excitotoxicita, přerušení synapsí, oxidativní stres nebo poškození mitochondrií. Za excitotoxicitou může být kontinuální aktivace NMDA (N-methyl-D-aspartát receptor, z rodiny glutamátových receptorů) receptorů právě přítomným akumulovaným A β (Sheppard & Coleman, 2020).

NFT jsou intraneuronální agregáty tau proteinu, který je kódován MAPT genem (tau protein asociovaný s mikrotubuly). Primární funkcí tau proteinu je stabilizovat mikrotubuly v axonech. Kvůli hromadění A β , dochází k fosforylaci tau proteinu, což může způsobovat jeho agregaci (Kumar et al., 2022). Monomery hyperfosforylovaného tau proteinu tvoří oligomery, ze kterých vznikají párované helikální fragmenty, a ty pak tvoří NFT. Stejně jako amyloidní plaky se i NFT šíří mozkiem, počínaje v hipokampu, jak se AD zhoršuje (Kumar et al., 2022; Sheppard & Coleman, 2020).

Na rozdíl od amyloidní hypotézy, ve které primárně dochází k hromadění A β a vzniku plátů a teprve sekundárně dochází k poškození mitochondrií, hypotéza mitochondriální kaskády předpokládá, že nejdříve dochází k poškození mitochondrií a ostatní patologické jevy jsou sekundární. Prvním nepřímým důkazem o zapojení mitochondrií do AD je přítomnost sníženého metabolismu glukózy a kyslíku v mozcích pacientů s AD. V mnoha studiích byly navíc popsány strukturní a funkční abnormality mitochondrií (Monzio Compagnoni et al., 2020), jako například abnormální morfologie a počet mitochondrií, oxidativní fosforylace nebo produkce ROS. U enzymů zapojených do buněčného dýchání byly navíc zjištěny jejich snížené aktivity. Patří sem cytochrom c oxidasa, pyruvát dehydrogenasový komplex, α -ketoglutarát dehydrogenasa a ATP-syntasa, naopak u sukcinát a malát dehydrogenasy byly zjištěny jejich zvýšené aktivity. Mimo to dochází také k nerovnováze mezi ROS a antioxidačními mechanismy, kdy ROS vyvolávají oxidativní stres v neuronech mozků postižených AD (Cenini & Voos, 2019).

Neurony u pacientů s AD s největší pravděpodobností umírají apoptózou, se zapojením kaspasové signální dráhy a fragmentace DNA. V postižených mozcích byly totiž nalezeny jak fragmenty DNA, tak apoptopický protein Bcl-2 (B-cell lymfoma 2) navíc bylo prokázáno, že syntetický A β aktivuje apoptopickou kaskádu (Chang et al., 2016).

***In vitro* model neurodegenerace**

K navození *in vitro* modelu neurodegenerace je využíván glutamát (Glu). Jakožto excitační neurotransmitter se objevuje v mozku. Dojde-li k jeho akumulaci a jeho koncentrace jsou příliš vysoké, začne působit jako neurotoxin a způsobuje smrt buněk, což bylo potvrzeno v mnoha *in vitro* studiích. Glu vykazuje excitotoxicitu na SH-SY5Y buňkách skrz oxidativní stres. Bylo zjištěno, že působením Glu na tyto buňky dochází k redukci celkového množství glutathionu. Nadměrná koncentrace extracelulárního glutamátu inhibuje cystin/glutamátový antiporter, čímž dochází v buňce k depleci cystinu, který je potřebný k syntéze redukovaného glutathionu, jež slouží jako vnitrobuněčný antioxidant. Buňka není schopná odbourávat ROS a dochází k apoptóze (Sun et al., 2010).

2.2.2. Parkinsonova choroba

PD je druhé nejčastější neurodegenerativní onemocnění po AD. Prevalence u věkových kategorií se liší. Ve věku od 65 do 69 let je přibližně 0,5-1 %, u lidí nad 80 let potom stoupá k 1-3 %. Toto komplexní progresivní neurodegenerativní onemocnění je charakterizované klidovým třesem, ztuhlostí, bradykinezi (zpomalenými pohyby) s nestabilním držením těla v pozdějších stádiích. Příčina vzniku PD není dosud známa, je ale známo mnoho genetických i environmentálních rizikových faktorů stejně jako jsou známy geny zapojené do vzniku familiární PD. Zajímavostí je fakt, že kouření cigaret a pití kávy může snižovat riziko vzniku PD. Oba dva návyky mají také potenciálně protektivní účinky, co se PD týče (Kouli et al., 2018).

Mezi environmentální rizikové faktory patří pesticidy a herbicidy, u kterých bylo prokázáno, že jsou neurotoxické; jsou selektivními inhibitory mitochondriálního komplexu I, které poškozují dopaminergní buňky v substantia nigra (černá substance) (Kouli et al., 2018). Na genetickém podkladu s monogenní (podmíněnou jedním genem) Mendelistickou dědičností vzniká asi 5-10 % případů PD. Prozatím bylo identifikováno 19 genů (10

autozomálně dominantních a 9 autozomálně recesivních) a 23 lokusů, které způsobují PD. Lokusy jsou pojmenovány PARK a číslem od 1 do 23 (Deng et al., 2018). Mezi další geny s predispozicí k PD patří GBA1 (β -glukocerebrosidasa-A), histokompatibilní komplex třídy II nebo MAPT a další (Kouli et al., 2018).

Při příčných řezech mozkovým kmenem je hlavní výraznou makroskopickou morfoloogickou změnou ztráta tmavého zbarvení v oblasti substantia nigra pars compacta, což koreluje s mrtvými dopaminergními neurony (Dickson, 2012). Mikroskopickým znakem PD je přítomnost abnormálních cytoplazmatických agregátů proteinu α -synukleinu v tělech neuronů tzv. Lewyho tělíska. Často bývají doprovázeny dystrofickými neurity – Lewyho neurity – většinou se jedná o axon. Lewyho tělíska jsou složena z granulárního a fibrilárního jádra obklopeného „svatozáří“. V průměru mají od 5 do 30 μ m a v jednom neuronu může být i více než jedno tělísko. Kromě fosforylovaného agregovaného α -synukleinu je v Lewyho tělískách přítomno více proteinu, mezi které patří ubiquitin, tau, proteiny tepelného šoku a další (Kouli et al., 2018).

Stejně jako u AD hraje mitochondriální dysfunkce i u PD velkou roli. U pacientů s PD bylo zjištěno, že dochází k poklesu aktivity komplexu I mitochondriálního dýchacího řetězce, nebo k úbytku podjednotek tohoto komplexu. Možné zapojení komplexu I do patogeneze PD bylo potvrzeno, když se po podání inhibitorů komplexu I lidem i zvířatům rozvinuly příznaky PD. Dalším podporujícím faktem je, že geny způsobující familiární PD jsou také zapojeny do degradace mitochondrií. Mutace Parkin a PINK1 (respektive PARK2 a PARK6) zapříčiňují autozomálně recesivní formu familiární PD. Zároveň však PINK1 monitoruje stav mitochondrií a když detekuje poškození, aktivuje Parkin. Parkin umožňuje spojení ubiquitinu s proteiny vnější membrány mitochondrií. Tím vzniká autofagozóm, který fúzuje s lysozomem a dochází k degradaci mitochondrií. Nakonec se nabízí korelace mezi mitochondriální dysfunkcí a akumulací α -synukleinu. Některé formy α -synukleinu se mohou vázat na translokasu vnější membrány 20, čímž inhibují import mitochondriálních proteinů, což vyústí ve snížené dýchání a nadprodukcí ROS (Monzio Compagnoni et al., 2020). Může také docházet k interakcím α -synukleinu s mitochondriální membránou, následné akumulaci v organele, a to vede ke snížení nebo zastavení aktivity komplexu I. V konečném důsledku dochází k poškození normálních funkcí mitochondrií a zvýšení oxidativního stresu (Kouli et al., 2018).

2.2.3. Jiná neurodegenerativní onemocnění

Huntingtonova choroba

HD je neurodegenerativní onemocnění charakterizované poruchou kognitivních, motorických a psychických funkcí. V západní populaci se toto onemocnění vyskytuje s prevalencí 10,6-13,7 případů na 100 000 obyvatel. Nejčastěji se příznaky manifestují mezi 30 a 40 rokem života (McColgan & Tabrizi, 2018).

Podstatou HD je autozomálně dominantně zděděná expanze CAG trinukleotidové repetice v genu pro huntingtin na 4. chromosomu. To ústí v produkci mutantního proteinu huntingtinu, který má abnormálně dlouhé polyglutaminové repetice. Pokud je v genu přítomno 39 a více CAG repetic, onemocnění se s jistotou projeví, pokud je přítomno 36 až 39 repetic, penetrance onemocnění je snižena (MacDonald et al., 1993).

Mutantní huntingtin způsobuje dysfunkci a smrt neuronů prostřednictvím mnoha mechanismů. Patří mezi ně formace agregátů mutantního proteinu, dysregulace transkripce některých důležitých genů, narušená proteinová homeostáza, mitochondriální dysfunkce, narušení axonálního transportu nebo narušená synaptická plasticita a neurogliální dysfunkce. Narušení funkcí mitochondrií může být způsobeno přímou interakcí mutantního huntingtinu s vnější membránou mitochondrií nebo díky narušení normálního transportu organel v axonech, což může snížit transport mitochondrií do synapsí, a tím i snížit produkci ATP. Může také docházet ke snížení transkripce mitochondriálních genů nebo transportu proteinů do mitochondrií, jelikož mutantní huntingtin inhibuje komponentu transportního komplexu vnitřní mitochondriální membrány. Výše zmíněné mechanismy vedou k narušení normální funkce mitochondrií, narušení buněčného dýchání, nadprodukce ROS, což nakonec vyústí v neuronální smrt (Jimenez-Sanchez et al., 2017).

Amyotrofická laterální skleróza

Lou Gehrigova choroba neboli ALS je progresivní, fatální, neurodegenerativní onemocnění postihující primárně motoneurony v mozku a míše (Siddique & Siddique, 1993). Degenerace horních motoneuronů (v mozkové kůře) vede k hyperreflexi, zpomalené koordinaci končetin se spasticitou a ke svalové ztuhlosti. Degenerace dolních motoneuronů (v míše) se nejdříve projevuje spontánními svalovými záškuby, následně dochází

k progresivní atrofii svalů spolu se zánikem synapsí spojující neurony se svaly. Nejdříve jsou postiženy končetiny, v pokročilých stádiích atrofují i oční svaly a svaly svěračů, přičemž mentální schopnosti bývají neporušené (Darrell Hulsiz, 2018).

Prevalence ALS je zhruba 6 případů na 100 000 obyvatel. Průměrný věk manifestace ALS je 58-60 let, přičemž průměrná délka přežití od začátku onemocnění je 3-4 roky. Většina případů ALS, asi 90-95 %, je sporadických, zatímco zbylých 5-10 % je dědičná familiární forma ALS (Talbot et al., 2016). U familiární formy ALS dochází ke vzniku onemocnění již velmi brzy, a to přesněji před 20 rokem života nebo v rané dospělosti. Sporadická forma ALS nemá žádnou známou příčinu. Za vznikem může stát více faktorů jako abnormální fungování imunitního systému, vystavení se toxinům, dysfunkce mitochondrií nebo glutamátová toxicita (Darrell Hulsiz, 2018).

S familiární formou ALS jsou nejvíce spojovány geny SOD1 (superoxid dismutasa 1), FUS (fúzaný v sarkomu), TARDBP/TDP-43 (TAR (element trans-aktivační odevzy) DNA-vazebný protein) nebo C9orf72 (otevřený čtecí rámec 72 na chromozomu 9). Mutovaný SOD1 je přítomen zhruba u 12-20 % familiární ALS. Funkční SOD1 je zodpovědný za konverzi superoxidového radikálu na peroxid vodíku. Ztráta jeho funkce při mutaci však nemá za následek ztrátu neuronů, za tou stojí dysfunkce mitochondrií a axonálního transportu. FUS je jaderný protein regulující genovou expresi. Jeho mutace se vyskytují u zhruba 5 % familiárních ALS. Mechanismus patogeneze tohoto proteinu je podobný jako u TDP-43, také se s ním nachází v granulech v motoneuronech. Mutace v TDP-43 je přítomna u přibližně 5 % familiární ALS, viz níže. Nejvíce detekovanou genetickou variantou u familiární ALS (u asi 25-40 %) je šesti nukleotidová repetice u C9orf72.

Stejně jako u předešlých neurodegenerativních onemocnění se i u ALS objevují patologické agregáty určitého proteinu. V tomto případě se jedná o protein TDP-43. TDP-43 je heterogenní jaderný ribonukleový protein s různými buněčnými funkcemi jako udržování stability mRNA, její zpracování, transport a translaci a negativní regulaci alternativního splicingu. Za normálních podmínek je TDP-43 exprimován v mnoha tkáních včetně jader neuronů. Při ALS dochází ale k vymizení z jader a formaci jeho patologických fosforylovaných agregátů v cytoplasmě. Tento protein je také hlavní složkou ubiquitinových inkluzí v cytoplasmě neuronů pacientů s ALS (Saber et al., 2015).

3. Experimentální část

3.1. Chemická část

3.1.1. Materiál a metody

3.1.1.1. Chemikálie

1,4-diazabicyklo(2.2.2)oktan, ethylenglykol, hexakynoželezitan draselný, kyselina chlorovodíková, kyselina sírová, *meta*-chlorperoxybenzoová kyselina, methoxid sodný v methanolu 30 %, N-methylmorfolin-N-oxid, oxid osmičelý, *para*-toluensulfonová kyselina, terc-butanol a tetrahydridohlinitan lithný – výše zmíněné chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Merck).

Aceton, cyklohexan, chloroform, dichlormethan, ethanol, ethylester kyseliny octové, methanol, siřičitan sodný, tetrahydrofuran, toluen, uhličitan draselný a vínan draselnosodný – tyto chemikálie byly zakoupeny od firmy Penta chemicals unlimited.

Pokud není uvedeno jinak byly výchozí látky pro syntézu oxysterolů poskytnuty z knihovny Laboratoře růstových regulátorů.

3.1.1.2. Laboratorní přístroje a pomůcky

Analytická kolona Pack SIL 250x20 mm, S-10 μm (YMC), analytické váhy (BP 310 P, Sartorius/BL 224 XS balance), binární pumpa a ELS detektor pro vysokotlakou kapalinovou chromatografii (1525 resp. 2424, Waters), digestoř (N 1800, Merci), hmotnostní spektrometr TOF (analyzátor doby letu) LC/MS (6230, Agilent technologies), horkovzdušná pistole (typ 3482, Steinell), lyofilizátor laboratorní (L4-55, Gregor instruments), magnetické míchadlo s ohřevem (RCT basic, IKA), NMR spektrometr (JNM-ECA 500, Jeol), silikagel pro kolonovou chromatografii, ultra čistý, 40-60 μm , 60A (Lach-ner), silikagel pro tenkovrstevnou kapalinovou chromatografii (TLC) na hliníkových destičkách (60 F₂₅₄, Merck), vakuová pumpa (MZ 2C NT, Vacuubrand), vakuová rotační odparka (Laborota 4000, Heidolph).

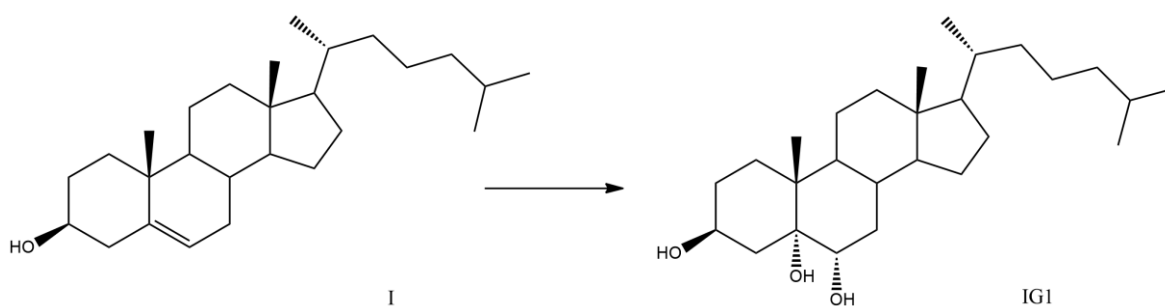
3.1.1.3. Obecný postup při syntéze oxysterolů

Pro kontrolu průběhu reakce, čistoty produktu a zjištění mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii byla použita TLC. Vyvinutá destička byla ponořena do 10% kyseliny sírové v ethanolu a zahřívána pomocí horkovzdušné pistole s nastavenou teplotou na 400 °C. Pro přečištění byla zvolena extrakce mezi ethylacetátem a vodou, organická fáze byla odpařena a surový produkt byl vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu s příslušnou mobilní fází. Poté byly připravené látky lyofilizovány v terc-butanolu a identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) a nukleární magnetické rezonanční (NMR) spektroskopie.

3.1.1.4. Syntéza látky IG1

Do roztoku látky **I** (50 mg, 0,13 mmol) ve vodě (3,5 ml) a terc-butanolu (3,5 ml) byl přidán hexakynoželezitan draselný (425 mg, 1,29 mmol), uhličitan draselný (175 mg, 1,27 mmol), 1,4-diazabicyklo(2.2.2)oktan (5 mg, 0,04 mmol) a oxid osmičelý v terc-butanolu (0,2 ml, 0,04 mmol) (Obrázek 2). Směs byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Pro zastavení reakce byl do směsi přidán nasycený roztok siřičitanu sodného. Mobilní fáze pro čištění produktu **IG1** sloupcovou chromatografií na silikagelu byla zvolena následovně: nejdříve bylo použito 300 ml ethylacetátu a následně 500 ml 5% isopropanolu v ethylacetátu. Výtěžek reakce byl 38 mg (69 %).

Cholestan-3 β ,5 α ,6 α -triol (IG1): ^1H NMR ($\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$) δ 0,59 (s, 3H, CH_3); 0,80 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,81 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,84 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 0,89 (s, 3H, CH_3); 1,73-1,81 (m, 2H); 1,92 (m, 1H); 1,99 (dd, 1H, $J = 13,0$, $J' = 4,1$ Hz); 3,55 (m, 1H, H-6 β); 3,93 (tt, 1H, $J = 10,9$, $J' = 5,3$ Hz, H-3 α). ^{13}C NMR δ 11,90; 15,43; 18,46; 21,02; 22,38; 22,65; 23,71; 23,97; 27,86; 28,08; 29,97; 30,93; 33,53; 34,42; 35,66; 35,99; 37,64; 38,95; 39,34; 39,74; 42,53; 44,23; 55,77; 56,03; 66,98; 70,37; 76,75. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{O}_2$ ($[(\text{M}-\text{H}_2\text{O})+\text{H}]^+$) 403,3576; nalezeno 403.3574.



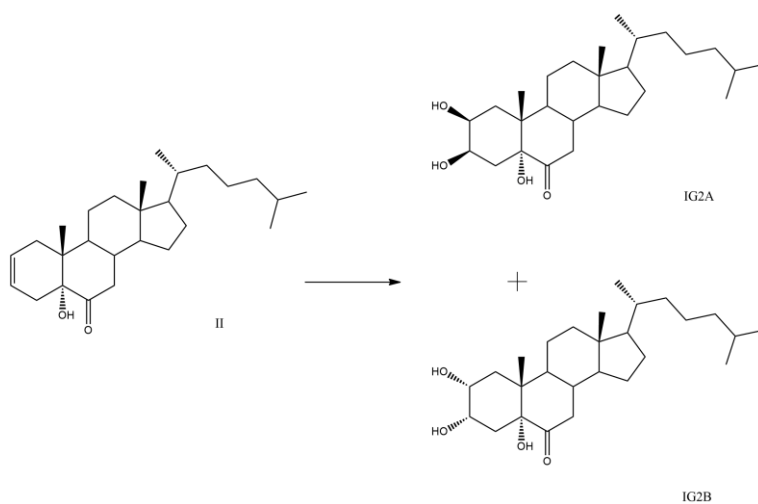
Obrázek 2 Syntéza látky IG1

3.1.1.5. Syntéza látek IG2A/IG2B

Do roztoku látky **II** (100 mg, 0,25 mmol) v tetrahydrofuranu (4 ml), acetonu (4 ml) a vodě (1 ml) byl přidán N-methylmorfolin-N-oxid (55 mg, 0,47 mmol) a oxid osmičelý v terc-butanolu (0,1 ml, 0,02 mmol) (Obrázek 3). Směs byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Pro zastavení reakce byl do směsi přidán nasycený roztok siřičitanu sodného. Mobilní fáze pro rozdělení výsledné směsi látek **IG2A** a **IG2B** sloupcovou chromatografií na silikagelu byla zvolena následovně: nejdříve bylo použito 200 ml 40% ethylacetátu v cyklohexanu, dále 400 ml 50% ethylacetátu v cyklohexanu a nakonec 60% ethylacetát v cyklohexanu. Výtěžek reakce byl pro **IG2A** 17 mg (15 %) a pro **IG2B** 65 mg (60 %).

2 β ,3 β ,5 α -Trihydroxycholestan-6-on (IG2A): ^1H NMR ($\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$) δ 0,58 (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); 0,92 (s, 3H, CH_3); 1,70-1,84 (m, 3H); 1,89-1,99 (m, 3H); 2,67 (t, 1H, $J = 12,5$ Hz); 3,91 (bs, 2H, H-2 α , H-3 α); ^{13}C NMR δ 11,78; 15,70; 18,35; 21,20; 22,28; 22,54; 23,62; 23,68; 27,78; 27,88; 29,49; 29,82; 35,54; 35,89; 36,52; 39,27; 39,46; 41,40; 41,72; 42,96; 44,45; 55,89; 56,02; 67,83; 68,64; 79,98; 214,67. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{O}_3$ ($[(\text{M}-\text{H}_2\text{O})+\text{H}]^+$) 417,3369; nalezeno 417,3366.

2 α ,3 α ,5 α -Trihydroxycholestan-6-on (IG2B): ^1H NMR ($\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$) δ 0,64 (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); 0,91 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 1,79 (t, 1H, $J = 12,3$ Hz); 1,85 (m, 1H); 1,99-2,09 (m, 4H); 2,71 (t, 1H, $J = 12,3$ Hz); 3,91 (m, 1H, H-2 β); 4,18 (m, 1H, H-3 β). ^{13}C NMR δ 11,97; 14,73; 18,60; 21,13; 22,53; 22,79; 23,83; 23,89; 27,97; 28,03; 30,06; 34,24; 35,71; 36,05; 37,12; 39,43; 39,49; 41,48; 43,07; 44,49; 45,43; 56,04; 56,21; 67,78; 69,86; 79,33; 211,35. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 435,3474; nalezeno 435,3477.

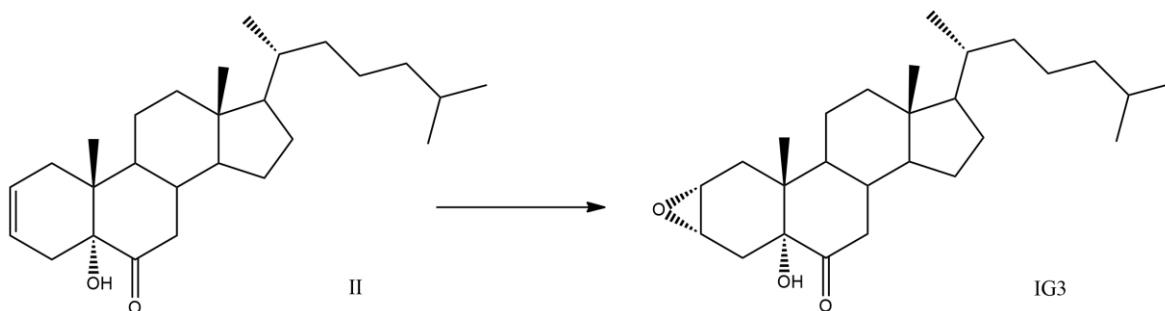


Obrázek 3 Syntéza látek IG2A a IG2B

3.1.1.6. Syntéza látky IG3

K látce **II** (100 mg, 0,25 mmol) v 5 ml ethylacetátu byla přidána kyselina *meta*-chlorperoxybenzoová (160 mg, 0,93 mmol) (Obrázek 4). Směs byla míchána 4 hodiny při laboratorní teplotě. Zastavení reakce bylo provedeno přidáním nasyceného roztoku siřičitanu sodného. Mobilní fázi pro čištění produktu **IG3** sloupcovou chromatografií na silikagelu bylo 700 ml 10% ethylacetátu v cyklohexanu. Výtěžek reakce byl 80 mg (77 %).

2 α ,3 α -Epoxy-5 α -hydroxycholestan-6-on (IG3): ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,63 (s, 3H, CH_3); 0,73 (s, 3H, CH_3); 0,86 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,87 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,91 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 1,80-1,88 (m, 2H); 1,91 (dd, 1H, $J = 15,9$, $J' = 5,8$ Hz); 2,01-2,09 (m, 2H); 2,12 (dd, 1H, $J = 12,3$, $J' = 4,0$ Hz); 2,41 (dd, 1H, $J = 16,8$, $J' = 1,8$ Hz); 2,61 (t, 1H, $J = 12,3$ Hz); 3,30 (m, 1H, H-2 β); 3,46 (m, 1H, H-3 β); 3,56 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR δ 11,81; 15,89; 18,60; 20,73; 22,52; 22,79; 23,80; 23,91; 26,45; 27,95; 27,97; 33,46; 35,68; 36,02; 37,97; 39,38; 39,42; 41,83; 41,98; 42,79; 45,57; 51,59; 54,01; 56,02; 56,17; 79,14; 209,91. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 417,3369; nalezeno 417,3369.

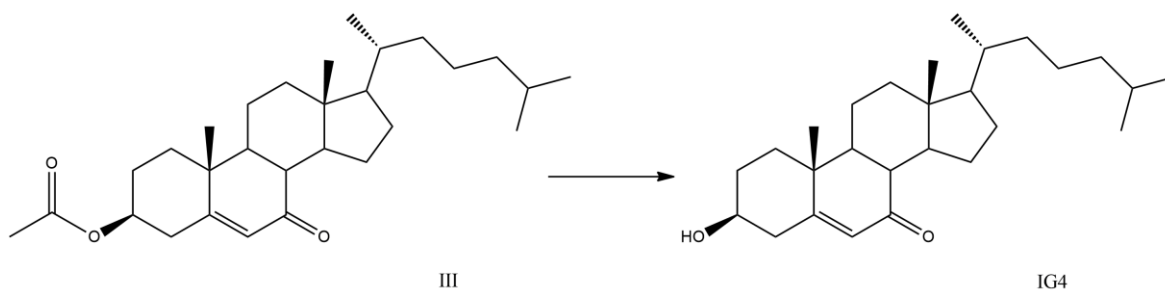


Obrázek 4 Syntéza látky IG3

3.1.1.7. Syntéza látky IG4 (7-KC)

K látce **III** (500 mg, 1,13 mmol) v 25 ml tetrahydrofuranu byl přidán methoxid sodný 30% v methanolu (1 ml, 5,4 mmol) (Obrázek 5). Reakce byla po 30 minutách při laboratorní teplotě zastavena přidavkem 5% kyseliny chlorovodíkové (dokud nebylo v baňce kyselé prostředí). Mobilní fáze pro čištění produktu **IG4** sloupcovou chromatografií na silikagelu byla zvolena následovně: nejdříve bylo použito 600 ml 40% ethylacetátu v cyklohexanu a následně 500 ml 50% ethylacetátu v cyklohexanu. Výtěžek reakce byl 270 mg (60 %).

3 β -Hydroxycholest-5-en-7-on (7-ketocholesterol, IG4): ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,69 (s, 3H, CH_3); 0,86 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,87 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,93 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 1,20 (s, 3H, CH_3); 1,87-1,98 (m, 3H); 2,04 (dt, 1H, $J = 12,9$, $J' = 3,3$ Hz); 2,24 (dd, 1H, $J = 12,4$, $J' = 10,9$ Hz); 2,37-2,43 (m, 2H); 2,51 (ddd, 1H, $J = 14,1$, $J' = 4,7$, $J'' = 2,3$ Hz); 3,68 (m, 1H, H-3 α); 5,7 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-6). ^{13}C NMR δ 11,95; 17,29; 18,84; 21,19; 22,54; 22,79; 23,80; 26,29; 27,98; 28,52; 31,15; 35,69; 36,16; 36,31; 38,25; 38,66; 39,45; 41,78; 43,07; 45,38; 49,89; 49,92; 54,75; 70,49; 126,09; 165,13; 202,38. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 401,3420; nalezeno 401.3422.

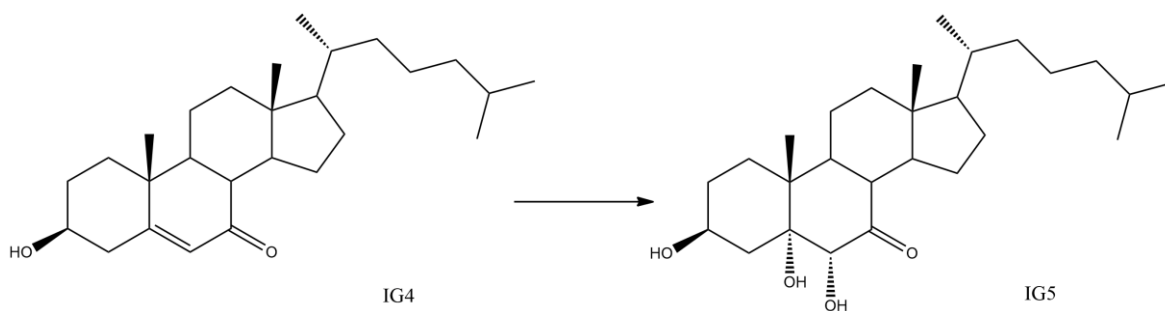


Obrázek 5 Syntéza látky IG4

3.1.1.8. Syntéza látky IG5

Ke směsi látky **IG4** (50 mg, 0,125 mmol) v terc-butanolu (4 ml) a vodě (4 ml) byl přidán hexakynoželezitan draselný (425 mg, 1,29 mmol), uhličitan draselný (175 mg, 1,27 mmol), 1,4-diazabicyklo(2.2.2)oktan (5 mg, 0,04 mmol) a oxid osmičelý v terc-butanolu (0,2 ml, 0,04 mmol) (Obrázek 6). Reakce probíhala 24 hodin při laboratorní teplotě a byla zastavena přidáním nasyceného roztoku siřičitanu sodného. Mobilní fází pro čištění produktu **IG5** sloupcovou chromatografií na silikagelu bylo 500 ml 5% methanolu v chloroformu. Výtěžek reakce byl 39 mg (72 %).

3 β ,5 α ,6 α -Trihydroxycholestan-7-on (IG5): ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 0,62 (s, 3H, CH $_3$); 0,84 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH $_3$); 0,85 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH $_3$); 0,89 (d, 3H, J = 6,5 Hz, CH $_3$); 1,17 (s, 3H, CH $_3$); 1,60-1,70 (m, 2H); 1,80 (m, 1H); 1,91-2,00 (m, 2H); 2,13 (m, 1H); 2,40 (t, 1H, J = 11,2 Hz); 3,65 (tq, 1H, J = 10,7, J' = 5,3 Hz, H-3 α); 4,07 (d, 1H, J = 6,8 Hz); 4,13 (d, 1H, J = 6,8 Hz); 4,22 (s, 1H, OH); 4,33 (d, 1H, J = 5,2 Hz, OH). ^{13}C NMR δ 11,93; 15,88; 18,61; 21,33; 22,42; 22,69; 23,24; 24,36; 27,40; 28,07; 30,57; 30,79; 35,14; 35,68; 38,04; 38,92; 39,04; 39,13; 42,37; 46,64; 47,16; 48,76; 54,47; 65,24; 77,47; 81,54, 210,31. HRMS (API+) vypočítáno pro C $_{27}$ H $_{45}$ O $_3$ [(M-H $_2$ O)+H] $^+$ 417,3369; nalezeno 417,3373.

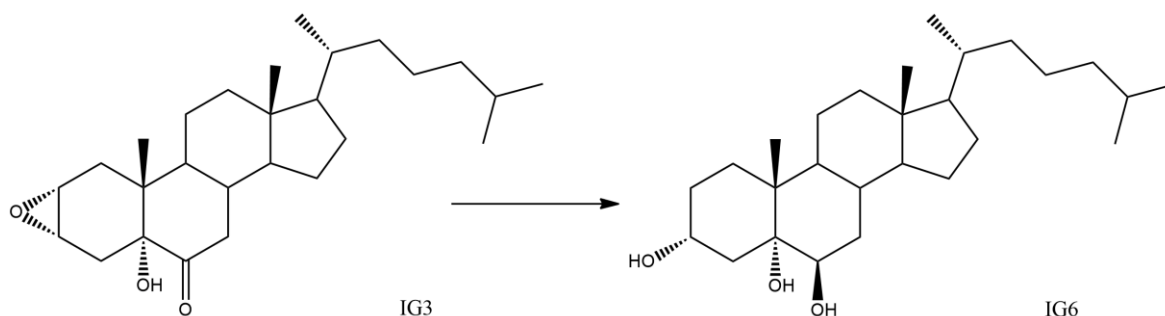


Obrázek 6 Syntéza látky IG5

3.1.1.9. Syntéza látky IG6

K látce **IG3** (40 mg, 0,09 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (4 ml) byl přidán tetrahydridohlinitan lithný (1 ml, 1,6 mmol) (Obrázek 7). Reakce probíhala 2 hodiny při 40 °C. Pro zastavení byl do směsi přidán nasycený vodný roztok vlnanu draselno-sodného a ethylacetát. Mobilní fáze pro čištění produktu **IG6** sloupcovou chromatografií na silikagelu byla zvolena následovně: nejdříve bylo použito 300 ml 40% ethylacetátu v cyklohexanu, dále 300 ml 45% ethylacetátu v cyklohexanu a nakonec 50% ethylacetát v cyklohexanu. Výtěžek reakce byl 24 mg (63 %).

Cholestan-3 α ,5 α ,6 β -triol (IG6): ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,66 (s, 3H, CH_3); 0,84 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,85 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,89 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 1,09 (s, 3H, CH_3); 1,77-1,87 (m, 2H); 1,98 (dt, 1H, $J = 12,4$, $J' = 3,3$ Hz); 2,26 (dd, 1H, $J = 14,7$, $J' = 3,4$ Hz); 3,53 (bs, 1H, H-6 α); 4,21 (m, 1H, H-3 β). ^{13}C NMR δ 12,06; 16,43; 18,58; 20,64; 22,48; 22,75; 23,80; 24,04; 27,93; 28,16; 28,27; 28,61; 29,63; 30,02; 33,89; 35,76; 36,08; 39,04; 39,42; 39,89; 42,64; 45,41; 55,82; 56,14; 68,14; 75,02; 75,62. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{O}_2$ ($[(\text{M}-\text{H}_2\text{O})+\text{H}]^+$) 403,3576; nalezeno 403.3575.

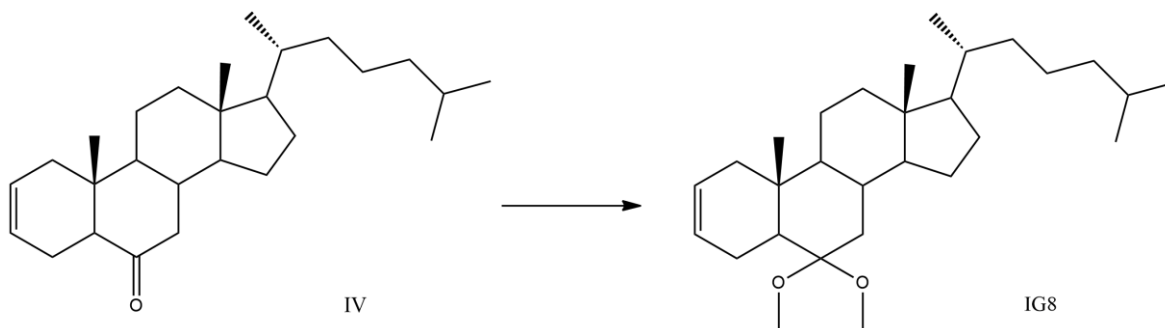


Obrázek 7 Syntéza látky IG6

3.1.1.10. Syntéza látky IG8

K látce **IV** (150 mg, 0,39 mmol) v toluenu (15 ml) byla přidána kyselina *para*-toluensulfonová (7 mg, 0,04 mmol) a ethylenglykol (1,5 ml, 0,03 mol) (Obrázek 8). Směs byla refluxována 7 hodin při 120 °C. Po ochlazení směsi byl k zastavení použit nasycený roztok uhličitanu draselného. Výtěžek reakce byl 158 mg (95 %).

6,6-Ethylenedioxy-5 α -cholest-2-en (IG8): ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,81 (s, 3H, CH_3); 0,793 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,797 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,81 (s, 3H, CH_3); 0,84 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 1,64 (dd, 1H, $J = 11,1$, $J' = 5,1$ Hz); 1,68-1,78 (m, 3H); 1,84-1,96 (m, 3H); 2,02 (m, 1H); 3,71 (m, 1H, H_{ketal}); 3,81-3,93 (m, 3H, $3 \times \text{H}_{\text{ketal}}$); 5,47 (m, 1H, H-2); 5,59 (m, 1H, H-3). ^{13}C NMR δ 11,97; 13,59; 18,67; 20,86; 21,43; 22,55; 22,81; 23,79; 24,16; 28,00; 28,13; 33,35; 35,76; 35,89; 36,14; 39,49; 39,78; 41,22; 41,24; 42,52; 48,08; 53,48; 55,97; 56,17; 64,08; 65,56; 110,09; 124,84; 125,68. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 429,3733; nalezeno 429.3733.

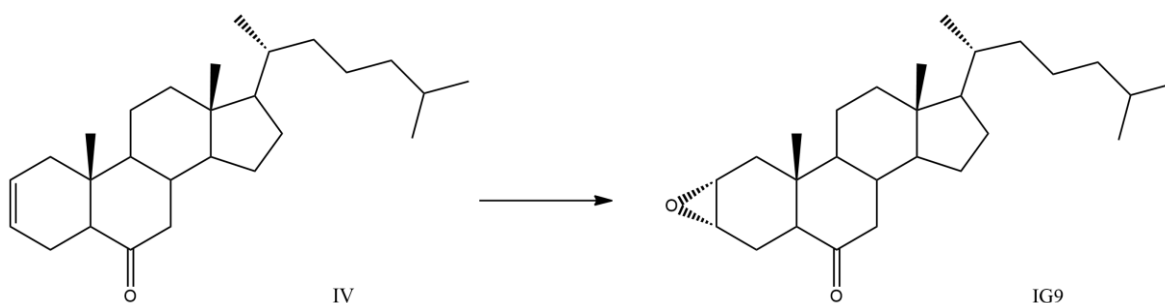


Obrázek 8 Syntéza látky IG8

3.1.1.11. Syntéza látky IG9

K látce **IV** (100 mg, 0,26 mmol) v ethylacetátu (5 ml) byla přidána kyselina *meta*-chlorperoxybenzoová (160 mg, 0,93 mmol) (Obrázek 9). Reakce probíhala 3 hodiny při laboratorní teplotě. Výtěžek reakce byl 50 mg (48 %).

2 α ,3 α -Epoxy-5 α -cholestan-6-on (IG9): $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 0,65 (s, 3H, CH_3); 0,71 (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); 1,74 (d, 1H, $J = 15,3$ Hz); 1,84 (m, 1H); 1,91-2,07 (m, 1H); 2,12 (ddd, 1H, $J = 16,1$, $J' = 4,6$, $J'' = 1,5$ Hz); 2,33 (dd, 1H, $J = 13,2$, $J' = 4,1$ Hz); 2,37 (dd, 1H, $J = 11,6$, $J' = 4,1$ Hz); 3,13 (dd, 1H, $J = 5,8$, $J' = 4,0$ Hz, H-2 β); 3,28 (m, 1H, H-3 β). $^{13}\text{C NMR}$ δ 11,87; 15,00; 18,82; 21,00; 21,04; 22,53; 22,79; 23,76; 23,92; 27,96; 27,98; 35,66; 36,04; 37,48; 37,83; 38,44; 39,34; 39,44; 42,72; 46,92; 49,88; 50,22; 52,43; 53,83; 56,02; 56,53; 211,64. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 401,3420; nalezeno 401.3421.

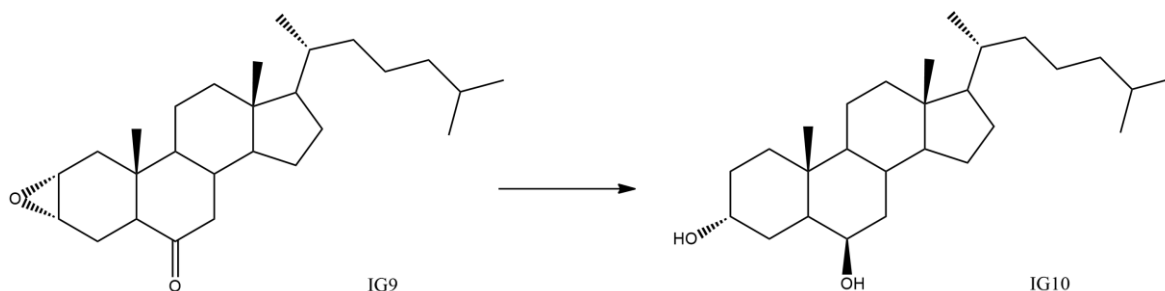


Obrázek 9 Syntéza látky IG9

3.1.1.12. Syntéza látky IG10

K látce **IG9** (50 mg, 0,125 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (4 ml) byl přidán tetrahydridohlinitan lithný (1 ml, 1,6 mmol) (Obrázek 10). Reakce probíhala 2 hodiny při 40 °C. Pro zastavení reakce byl do směsi přidán nasycený vodný roztok vlnanu draselno-sodného a ethylacetát. Mobilní fáze pro čištění produktu **IG10** sloupcovou chromatografií na silikagelu byla zvolena následovně: nejdříve bylo použito 300 ml 40% ethylacetátu v cyklohexanu a dále 400 ml 50% ethylacetátu v cyklohexanu. Výtěžek reakce byl 28 mg (55 %).

Cholestan-3 α ,6 β -diol (IG10): $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 0,69 (s, 3H, CH_3); 0,86 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,87 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,91 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 1,01 (s, 3H, CH_3); 1,78-1,89 (m, 2H); 1,95-2,02 (m, 2H); 3,53 (q, 1H, $J = 2,5$ Hz, H-6 α); 4,18 (m, 1H, H-3 β). $^{13}\text{C NMR}$ δ 12,09; 14,85; 18,66; 20,57; 22,54; 22,81; 23,80; 24,17; 27,99; 28,18; 29,07; 30,26; 33,03; 33,93; 35,76; 36,05; 36,13; 39,48; 39,68; 39,89; 41,65; 42,62; 54,15; 56,18; 56,20; 66,66; 72,24. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{O}$ ($[(\text{M}-\text{H}_2\text{O})+\text{H}]^+$) 387,3627; nalezeno 387.3624.

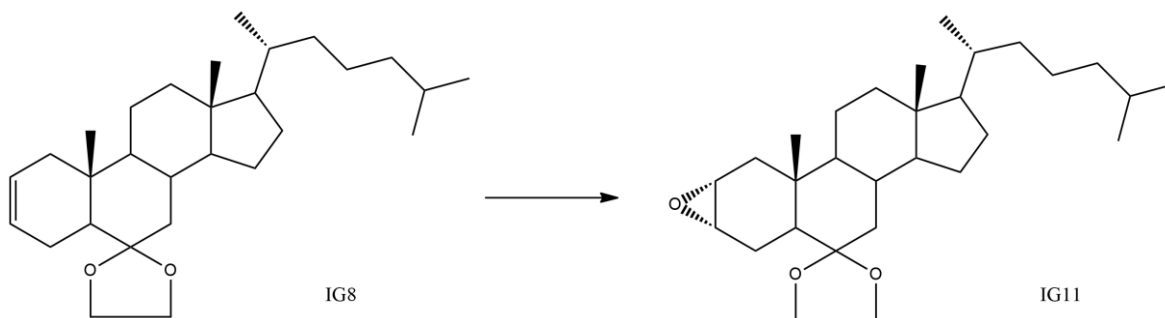


Obrázek 10 Syntéza látky IG10

3.1.1.13. Syntéza látky IG11

K látce **IG8** (170 mg, 0,40 mmol) v ethylacetátu (10 ml) byla přidána kyselina *meta*-chlorperoxybenzoová (244 mg, 1,42 mmol) (Obrázek 11). Reakce probíhala 2,5 hodiny při laboratorní teplotě. Pro zastavení reakce byl přidán nasycený roztok siřičitanu sodného. Mobilní fází pro čištění produktu **IG11** sloupcovou chromatografií na silikagelu bylo 500 ml 10% ethylacetátu v cyklohexanu. Výtěžek reakce byl 70 mg (39 %).

6,6-Ethylenedioxy-5 α -cholestan-2 α ,3 α -epoxid (IG11): ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,66 (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 (s, 3H, CH_3); 0,90 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 1,66 (dd, 1H, $J = 12,2$, $J' = 4,3$ Hz); 1,75 (dd, 1H, $J = 13,0$, $J' = 3,5$ Hz); 1,78-1,83 (m, 2H); 1,92 (dd, 1H, $J = 15,0$, $J' = 6,1$ Hz); 1,99 (td, 1H, $J = 12,6$, $J' = 3,5$ Hz); 2,13 (dd, 1H, $J = 15,0$, $J' = 1,4$ Hz); 3,10 (dd, 1H, $J = 6,0$, $J' = 4,1$ Hz); 3,25 (m, 1H); 3,78 (m, 1H, H_{ketal}); 3,88-3,98 (m, 3H, $3 \times \text{H}_{\text{ketal}}$). ^{13}C NMR δ 11,91; 14,71; 18,64; 20,08; 20,78; 22,54; 22,80; 23,76; 24,14; 27,99; 28,10; 33,04; 34,75; 35,73; 36,09; 39,48; 39,62; 39,64; 40,94; 42,38; 43,23; 50,48; 52,83; 53,12; 55,77; 56,07; 64,06; 65,40; 109,83. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 445,3682; nalezeno 445,3685.

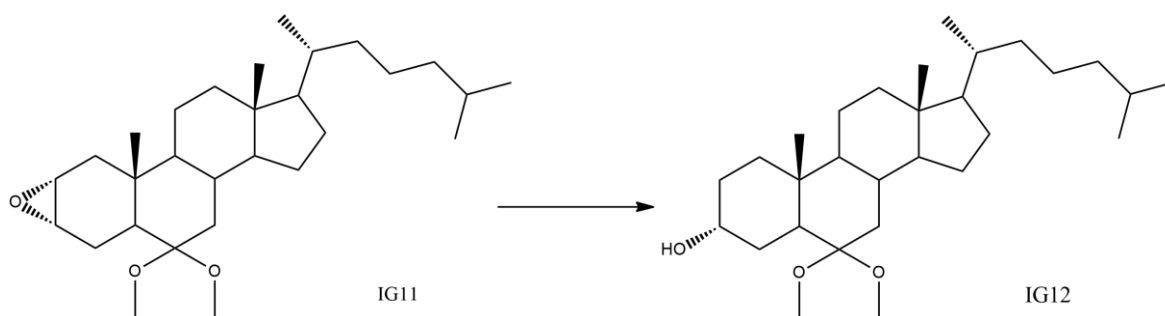


Obrázek 11 Syntéza látky IG11

3.1.1.14. Syntéza látky IG12

K látce **IG11** (70 mg, 0,16 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (4 ml) byl přidán tetrahydridohlinitan lithný (1,2 ml, 1,9 mmol) (Obrázek 12). Reakce probíhala 3 hodiny při 40 °C. Pro zastavení reakce byl do směsi přidán nasycený vodný roztok vlnanu draselno-sodného a ethylacetát. Mobilní fáze pro čištění produktu **IG12** sloupcovou chromatografií na silikagelu byla zvolena následovně: nejdříve bylo použito 300 ml 20% ethylacetátu v cyklohexanu a dále 500 ml 25% ethylacetátu v cyklohexanu. Výtěžek reakce byl 60 mg (84 %).

6,6-Ethylenedioxy-5 α -cholestan-3 α -ol (IG12): ^1H 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); 0,897 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 0,899 (s, 3H, CH_3); 1,76 (dd, 1H, $J = 13,1$, $J' = 3,7$ Hz); 1,81 (m, 1H); 1,90 (dd, 1H, $J = 12,6$, $J' = 2,9$ Hz); 1,97 (td, 1H, $J = 12,6$, $J' = 3,2$ Hz); 3,72 (m, 1H, H_{ketal}); 3,87-3,95 (m, 3H, $3 \times \text{H}_{\text{ketal}}$); 4,12 (m, 1H, H-3 β). ^{13}C NMR δ 11,98; 13,22; 18,60; 20,57; 22,52; 22,78; 23,80; 24,10; 27,11; 27,96; 28,12; 28,15; 33,27; 33,51; 35,75; 36,09; 37,37; 39,45; 39,75; 41,20; 42,52; 45,09; 53,48; 56,01; 56,12; 64,05; 65,33; 66,12; 110,18. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{29}\text{H}_{51}\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 447,3838; nalezeno 447,3841.

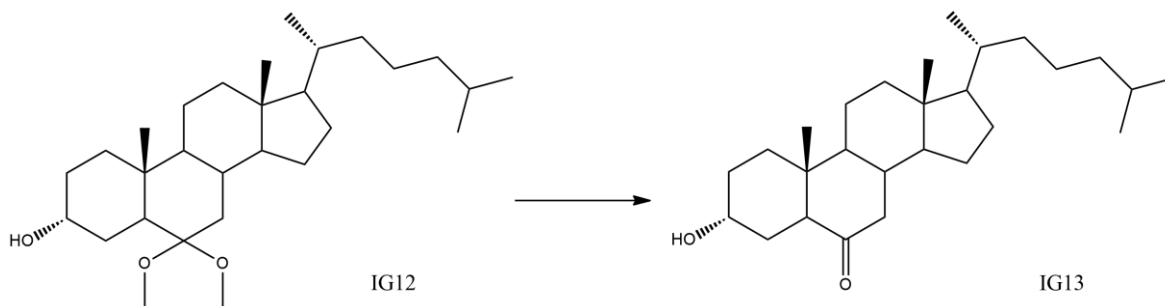


Obrázek 12 Syntéza látky IG12

3.1.1.15. Syntéza látky IG13

K látce **IG12** (60 mg, 0,13 mmol) v tetrahydrofuranu (5 ml) byla přidána 5% kyselina chlorovodíková (3 ml, 4,11 mmol) (Obrázek 13). Reakce probíhala 7 hodin při 40 °C. Mobilní fáze pro čištění produktu **IG13** sloupcovou chromatografií na silikagelu byla zvolena následovně: nejdříve bylo použito 300 ml 30% ethylacetátu v cyklohexanu a dále 40% ethylacetát v cyklohexanu. Výtěžek reakce byl 40 mg (77 %).

3 α -Hydroxy-5 α -cholest-6-on (IG13): ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,65 (s, 3H, CH_3); 0,72 (s, 3H, CH_3); 0,85 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,86 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,91 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 1,74-1,88 (m, 2H); 1,99 (m, 1H); 2,03 (td, 1H, $J = 12,5$, $J' = 2,9$ Hz); 2,29 (dd, 1H, $J = 13,0$, $J' = 4,4$ Hz); 2,71 (m, 1H); 4,15 (m, 1H, H-3 β). ^{13}C NMR δ 11,97; 12,27; 18,59; 21,02; 22,52; 22,77; 23,76; 23,90; 27,62; 27,95; 27,99; 28,11; 31,63; 35,66; 36,03; 37,96; 39,42; 39,47; 41,54; 42,90; 46,86; 51,63; 53,77; 56,02; 56,75; 65,35; 212,97. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 403,3576; nalezeno 403.3573.

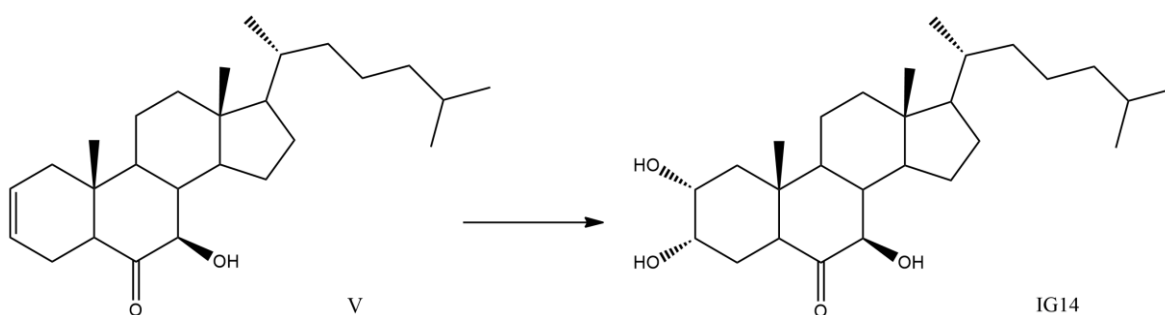


Obrázek 13 Syntéza látky IG13

3.1.1.16. Syntéza látky IG14

K směsi látky **V** (23 mg, 0,06 mmol) v tetrahydrofuranu (2 ml), acetonu (2 ml) a vodě (0,5 ml) byl přidán N-methylmorfolin-N-oxid (12 mg, 0,10 mmol) a oxid osmičelý v terc-butanolu (0,2 ml, 0,04 mmol) (Obrázek 14). Směs byla míchána 27 hodin při laboratorní teplotě. Pro zastavení reakce byl do směsi přidán nasycený roztok siřičitanu sodného. Mobilní fází pro čištění produktu **IG14** sloupcovou chromatografií na silikagelu bylo 500 ml 70% ethylacetátu v cyklohexanu. Následně byla použita HPLC s mobilní fází 65% ethylacetátu v cyklohexanu. Výtěžek reakce byl 16 mg (61 %).

2 α ,3 α ,7 β -Trihydroxy-5 α -cholest-6-on (IG14): ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,68 (s, 3H, CH_3); 0,73 (s, 3H, CH_3); 0,87 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,88 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,93 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 1,77 (dd, 1H, $J = 12,2$, $J' = 4,9$ Hz); 1,81-1,90 (m, 2H); 1,95 (td, 1H, $J = 15,1$, $J' = 3,3$ Hz); 2,07 (m, 1H); 2,75 (dd, 1H, $J = 12,2$, $J' = 2,4$ Hz); 3,78 (m, 1H, H-2 β); 3,80 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, H-7 α); 4,08 (m, 1H, H-3 β). ^{13}C NMR δ 12,09; 13,62; 18,74; 21,15; 22,53; 22,80; 23,84; 26,01; 26,13; 28,00; 28,42; 35,73; 36,10; 39,43; 39,46; 40,18; 42,84; 43,51; 46,57; 48,26; 51,52; 55,50; 56,80; 68,10; 68,15; 78,93; 211,91. HRMS (API+) vypočítáno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 435,3474; nalezeno 435,3473.



Obrázek 14 Syntéza látky IG14

3.2. Biologická část

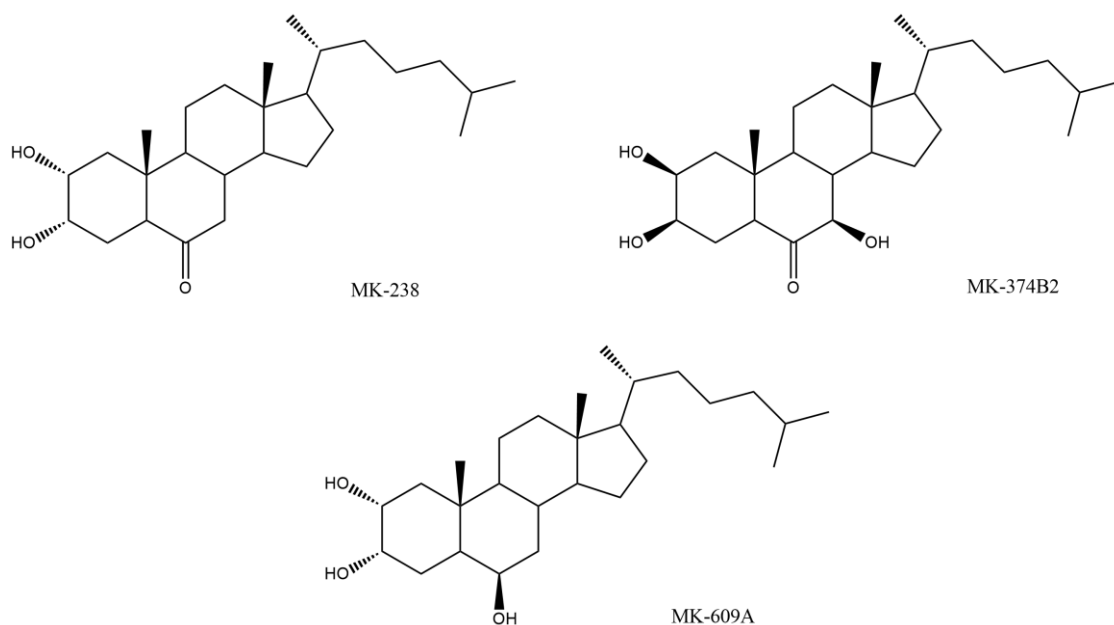
3.2.1. Materiál a metody

3.2.1.1. Chemikálie

Ac-DEVD-AFC, Ac-DEVD-CHO, all-*trans* retinová kyselina (ATRA), dihydroethidium (DHE), dimethylsulfoxid (DMSO), dithiotreitol (DTT), DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/směs živin F12), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), fetální bovinní sérum (FBS), fosfátový pufr (PBS), glutaman sodný, kit pro membránový potenciál mitochondrií s JC10, kyselina R-lipoová (R-LA), penicilin, propidium jodid (PI), složky pufru pro jedнокrokovou kaspáza 3/7 esej, streptomycin, triton X-100 a trypsin byly zakoupeny od Sigmy Aldrich. LDH-release kit byl zakoupen od firmy Roche.

22(R)-hydroxycholesterol (22(R)-HC), 22(S)-hydroxycholesterol (22(S)-HC), 24(S)-hydroxycholesterol (24(S)-HC), 25-hydroxycholesterol (25-HC), 27-hydroxycholesterol (27-HC), 4 β -hydroxycholesterol (4 β -HC), 3 β ,5 α -dihydroxycholestan-6-on (ketodiol), 7-keto-25-hydroxycholesterol (7-keto-25-HC), 7 α -27-dihydroxycholesterol (7 α -27-dHC) a cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol (TRIOL) byly zakoupeny od Avanti Polar Lipids.

MK-238, MK-374B2 a MK-609A (Obrázek 15) byly použity z knihovny oxysterolů Laboratoře růstových regulátorů.



Obrázek 15 Chemická struktura látek MK-238, MK-374B2 a MK-609A

3.2.1.2. Laboratorní přístroje a pomůcky

Centrifuga (BR 4i, Trigon-plus), centrifuga Eppendorf (5702, Sigma Aldrich), CO₂ inkubátor (MCO-170AIC-PE, PHC), destičkový reader Infinite M200 Pro (Tecan), DM IL LED fluorescenční mikroskop (Leica Microsystems), laminární flowbox MSC-Advantage (Thermo Scientific), software i-control 1.12 (Tecan).

3.2.1.3. Buněčná linie SH-SY5Y

Pro zjištění biologické aktivity přírodních a syntetických oxysterolů byla použita neuroblastomová buněčná linie SH-SY5Y (ECACC 94030304). Tato linie je třetím subklonem odvozeným od původní neuroblastomové buněčné linie SK-N-SH pocházející z kostní dřeně 4leté pacientky z roku 1970 (Biedler et al., 1973, 1978).

Buňky byly kultivovány na Petriho miskách (TPP) při 37 °C a 5 % CO₂ v kultivačním médiu, které kromě samotného DMEM/F12 obsahovalo také 10% filtrované FBS a 1% penicilin a streptomycin. Při zakládání experimentu byly buňky vysety na 96 jamkovou destičku (TPP) v počtu 20 000 na jamku ve 100 µl 10% DMEM/F12.

Po 24 hodinové inkubaci při 37 °C a 5 % CO₂ byla k buňkám přidána ATRA a to tak, že ve 100 µl 1% DMEM/F12 (obsahuje jen 1 % FBS) byla její finální koncentrace 10 µM. Takto ovlivněné buňky byly inkubovány 48 hodin ve stejných podmínkách jako před diferenciací. Tento krok je prováděn, aby byla u buněk navozena diferenciac (dochází ke vzniku a prodlužování neuritů, buňky získávají fenotyp podobný neuronům).

Po diferenciaci bylo staré DMEM/F12 vyměněné za 100 µl nového 1% obsahujícího kromě testovaných látek ve finálních koncentracích 0,1; 1; 10 µM také Glu o koncentraci 160 mM. Jako kontrola sloužilo 1% DMEM/F12 s DMSO, jako toxin bylo použito 1% DMEM/F12 se 160 mM Glu. Testované látky byly aplikovány v triplicátu. Buňky byly inkubovány při 37 °C a 5 % CO₂ po dobu, která je u dané eseje potřebná.

3.2.1.4. Stanovení buněčné smrti pomocí propidium jodidu (PI)

Po 24 hodinách inkubace testovaných látek s buňkami bylo do každé jamky přidáno 100 µl 1x PBS s PI (finální koncentrace PI v jamce 1 µg/ml). Buňky byly dále inkubovány 15 minut ve tmě při laboratorní teplotě a následně kvantifikovány v destičkovém readeru při vlnové

délce excitace 535 nm a emise 617 nm. U buněk ovlivněných toxinem (Glu) byla naměřená fluorescence stanovená jako 100% buněčná smrt.

3.2.1.5. Stanovení buněčné smrti pomocí laktát dehydrogenasy (LDH)

Buňky byly s testovanými látkami inkubovány 24 hodin. Následně bylo přeneseno 50 μ l jen média (bez buněk) do nové 96 jamkové destičky. K tomuto bylo přidáno 50 μ l LDH release. Destička byla ponechána 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě, následně bylo přidáno 25 μ l Stop solution a měřena absorbance při 490 nm. Naměřená absorbance buněk ovlivněných Glu byla stanovena jako 100% buněčná smrt.

3.2.1.6. Měření oxidativního stresu pomocí dihydroethidia (DHE)

Testované látky byly s buňkami inkubovány 4 hodiny, poté byly stočeny na 1200 rpm na 5 minut a 30 sekund. Po stočení bylo opatrně z každé jamky odsáno staré médium a nahrazeno 100 μ l 1x PBS s DHE o finální koncentraci 10 μ M. Buňky byly inkubovány 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě a následně byla měřena fluorescence při excitační vlnové délce 500 nm a emisní 580 nm. Fluorescence buněk ovlivněných Glu byla stanovena jako 100% vznik ROS.

3.2.1.7. Měření aktivity kaspasy 3/7

Buňky byly s testovanými látkami inkubovány 1 hodinu. K obsahu v jamkách bylo přidáno 50 μ l kaspázového pufru obsahujícího 30 mM DTT, 3 mM PMSF a 75 μ M Ac-DEVD-AFC (substrát kaspasy). Buňky byly inkubovány 3 hodiny ve tmě při 37 °C a 5 % CO₂. Poté byla měřena fluorescence při excitační vlnové délce 400 nm a emisní 505 nm. Fluorescence naměřená u buněk ovlivněných Glu byla přepočítána jako 100% aktivita kaspasy 3/7.

3.2.1.8. Měření mitochondriálního membránového potenciálu pomocí JC10

Oproti všem esejím byly při této buňky ovlivněny pouze 50 μ l 1% DMEM/F12 s testovanými látkami, následně byly inkubovány 1 hodinu. Do každé jamky bylo přidáno 25 μ l předem připraveného roztoku (na 2 ml pufry A bylo přidáno 20 μ l JC10), buňky byly inkubovány 30 minut ve tmě při 37 °C a 5 % CO₂. Poté bylo do každé jamky přidáno 25 μ l pufry B a byla měřena fluorescence při excitační vlnové délce 490 nm a emisní 525 nm a také při excitační vlnové délce 540 nm a emisní 590 nm. Naměřené fluorescence byly dány do poměru a byly přepočítány na membránový potenciál mitochondrií, přičemž 100% byl u kontroly s médiem s DMSO.

3.2.1.9. Stanovení cytotoxicity pomocí propidium jodidu (PI) s tritonem X-100

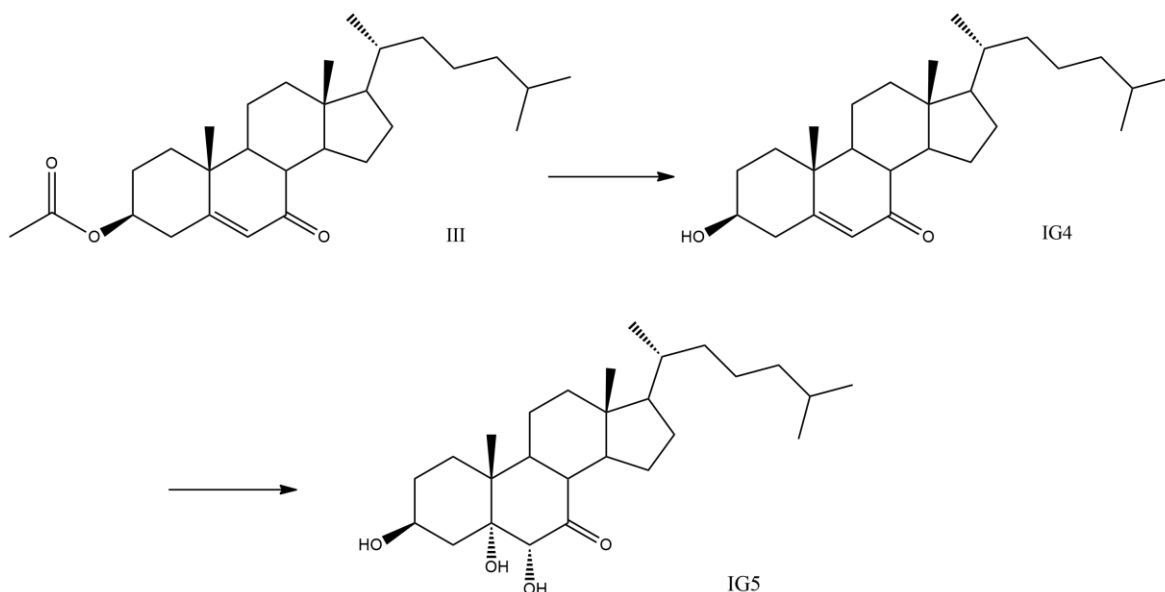
Stejně jako u stanovení buněčné smrti pomocí PI byly i u této eseje buňky s testovanými látkami inkubovány 24 hodin (v médiu bez přítomnosti Glu). Poté bylo z poloviny kontrolních jamek (pouze 1% DMEM/F12 s DMSO) odebráno 50 μ l média a následně doplněno 50 μ l tritonu X-100 (v PBS) ve finální 1% koncentraci. Po dvou minutách od této drobné modifikace bylo do každé jamky přidáno 100 μ l 1x PBS s PI (finální koncentrace PI v jamce 1 μ g/ml). Buňky byly dále inkubovány 15 minut ve tmě při laboratorní teplotě a následně kvantifikovány v destičkovém readeru při vlnové délce excitace 535 nm a emise 617 nm. Cytotoxicita tritonu X-100 byla stanovena jako 100%.

4. Výsledky a diskuze

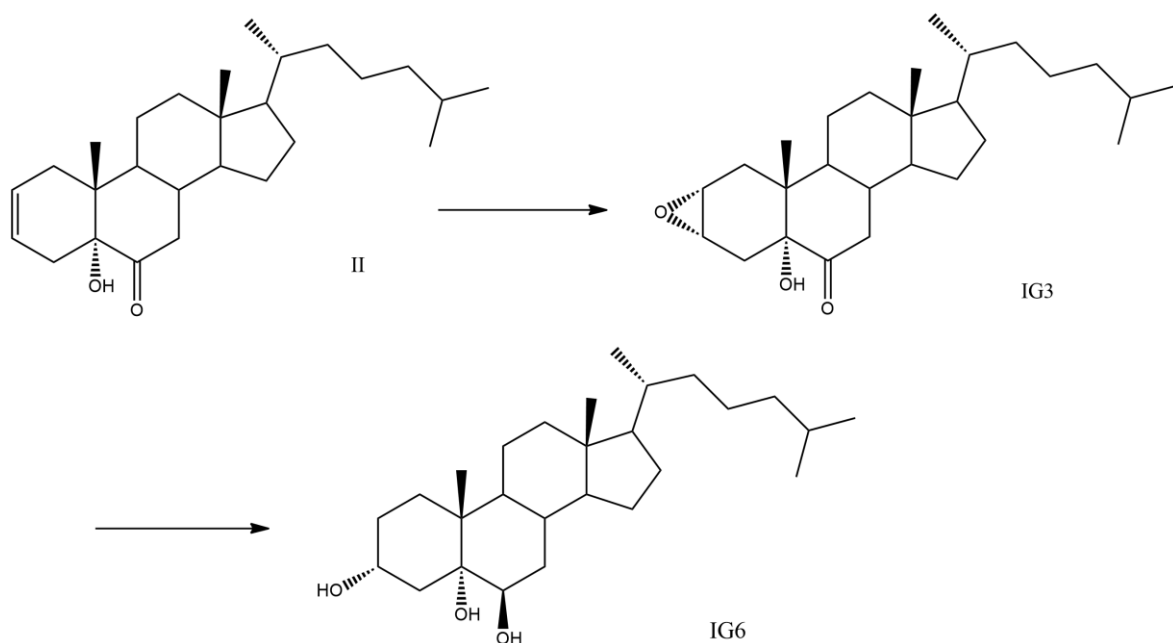
4.1. Syntéza látek

Jednostupňovou syntézou byly připraveny látky **IG1**, **IG2A**, **IG2B**, **IG4** a **IG14** (Obrázek 2, Obrázek 3, Obrázek 5, Obrázek 14). U výchozí látky **I** byla dvojná vazba mezi C5 a C6 a u výchozích látek **II** a **V** mezi C2 a C3 *cis* dihydroxylována pomocí oxidu osmičelého. U látek **IG1**, **IG2B** a **IG14** došlo k navázání nových hydroxylových skupin v konfiguraci α , u látky **IG2A** je konfigurace nových hydroxylů β . Deacetylací výchozí látky **III** byla syntetizována látka **IG4** (7-KC).

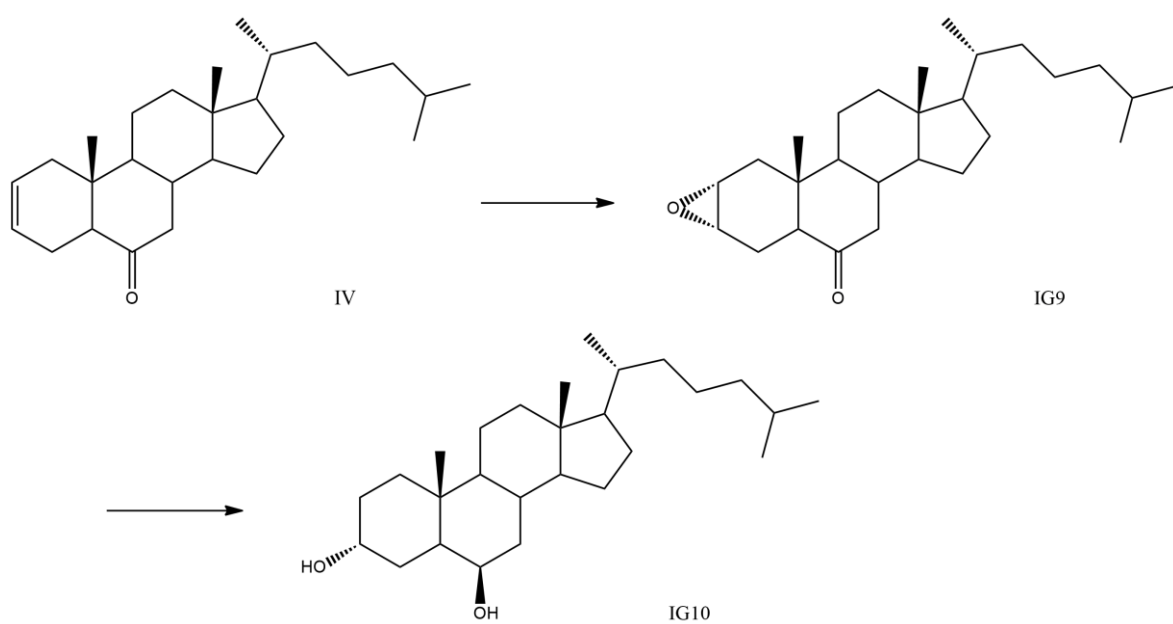
Dvoustupňovou syntézou byly připraveny látky **IG5**, **IG6** a **IG10**. U syntézy **IG5** byla v prvním kroku výchozí látka **III** deacetylována za vzniku **IG4** a následně byla dvojná vazba mezi C5 a C6 *syn* dihydroxylována za vzniku **IG5** s α konfigurací nových hydroxylů (Obrázek 16). Syntéza látek **IG6** a **IG10** byla v podstatě totožná, tyto dvě molekuly se liší jen přítomností α hydroxylu na pozici 5 u **IG6**. V prvním kroku byly dvojně vazby mezi C2 a C3 u výchozích látek **II** a **IV** epoxidovány *meta*-chlorperoxybenzoovou kyselinou. V druhém kroku došlo redukcí k otevření epoxidu a také byla redukována keto skupina na C6 na β hydroxyl (Obrázek 17, Obrázek 18).



Obrázek 16 Dvoustupňová syntéza IG5



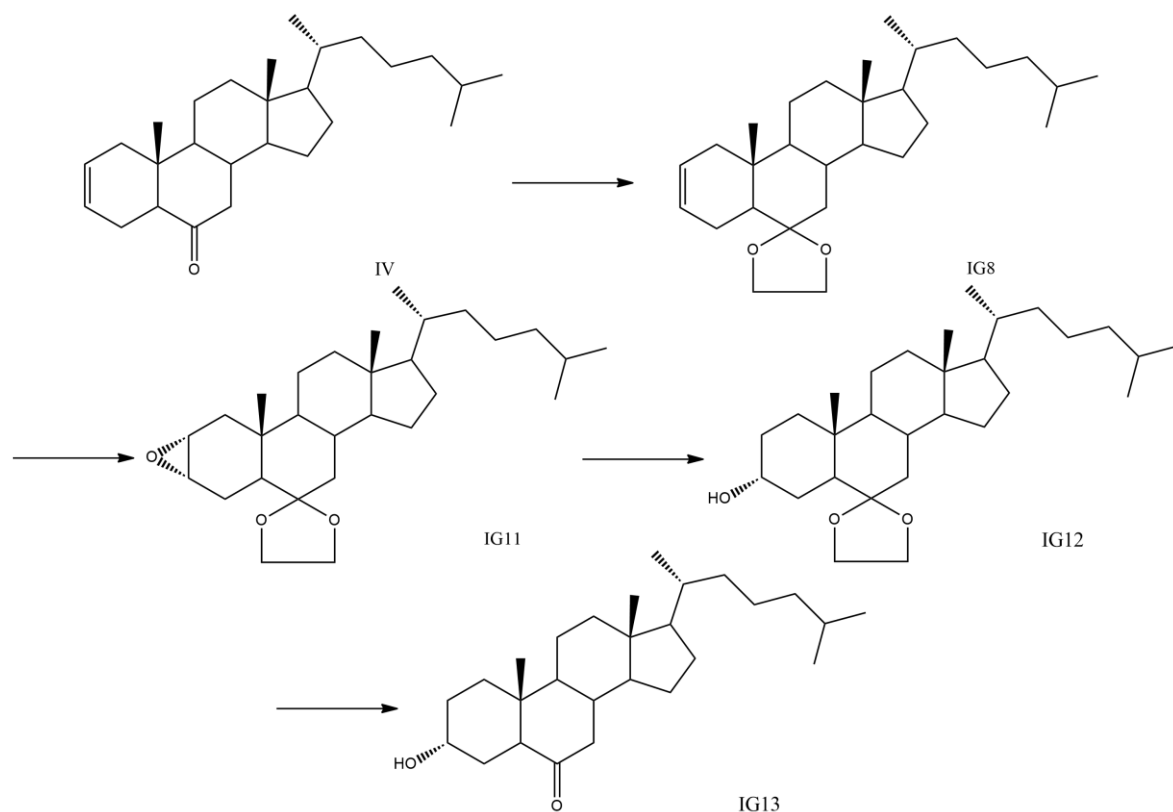
Obrázek 17 Dvoustupňová syntéza IG6



Obrázek 18 Dvoustupňová syntéza IG10

Látka **IG13** byla připravena čtyřstupňovou syntézou. V prvním kroku reagovala keto skupina na C6 výchozí látky **IV** s ethylenglykolem za vzniku protekční skupiny (cyklického ketálu). V druhém kroku byla dvojná vazba mezi C2 a C3 látky **IG8** epoxidována *meta*-chlorperoxybenzoovou kyselinou. Následovala redukce tohoto epoxidu za vzniku 3 α

hydroxyly. V posledním kroku došlo k odstranění protekční skupiny pomocí 5% kyseliny chlorovodíkové, čímž byla zachována tato keto skupina (Obrázek 19).



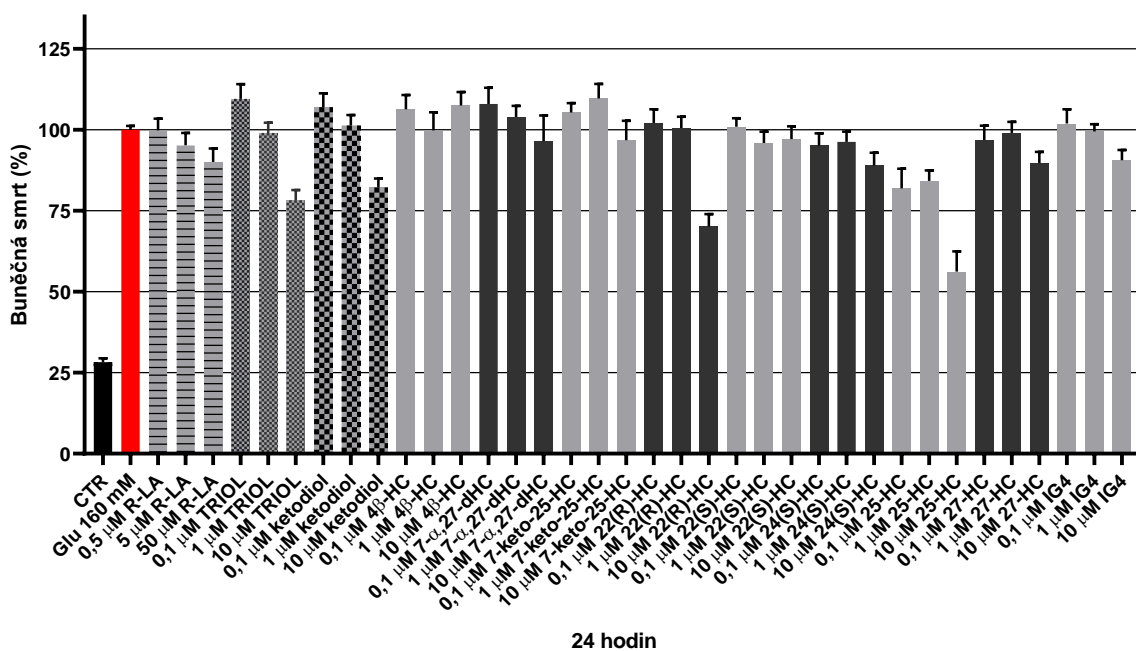
Obrázek 19 Čtyřstupňová syntéza IG13

4.2. Biologická aktivita

Biologická aktivita přírodních a syntetických oxysterolů byla testována na buněčné linii SH-SY5Y, u které byla pomocí ATRA navozena neuronální diferenciace a následně byl pomocí Glu 160 mM vyvolán *in vitro* model neurodegenerace. Na buňky byly aplikovány testované látky ve třech finálních koncentracích 0,1; 1 a 10 μM , negativní kontrola (médiu s DMSO) a jako pozitivní kontroly sloužily R-LA, TRIOL, MK-238, jejichž neuroprotektivní účinky byly publikovány (Górová, 2019; Liu et al., 2005; Tirosh et al., 1999) a ketodiol.

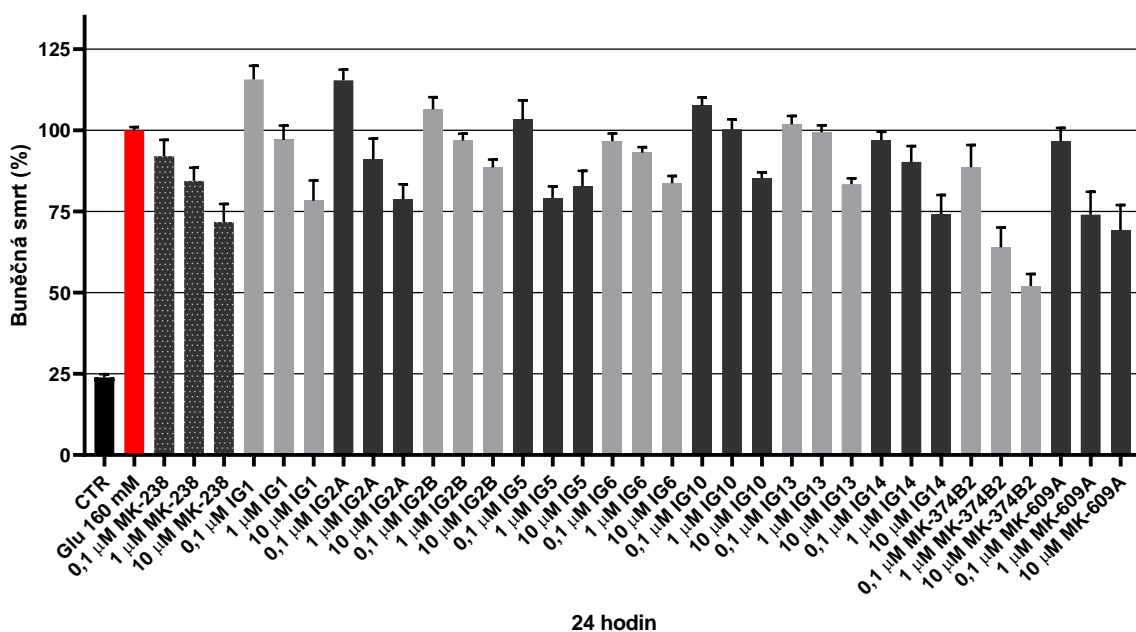
Pro identifikaci aktivních látek byla použita esej na stanovení buněčné smrti pomocí PI. Toto barvivo proniká pouze do buněk s poškozenou membránou (umírající či již mrtvé buňky), interkaluje se do DNA a tvoří komplexy, které amplifikují detekovanou fluorescenci

(Dengler et al., 1995). Největší pokles buněčné smrti, tedy nejvíce přeživších buněk, bylo z přírodních oxysterolů detekováno u 22(R)-HC (70 %) a 25-HC (56 %) v koncentraci 10 μ M (Graf 1). U ostatních látek v nejvyšší koncentraci nedošlo k většímu poklesu, než o zhruba 11 % vůči toxinu. Toto naznačuje, že tyto přírodní oxysteroly (kromě dvou výše zmíněných) nemají neuroprotektivní účinky.



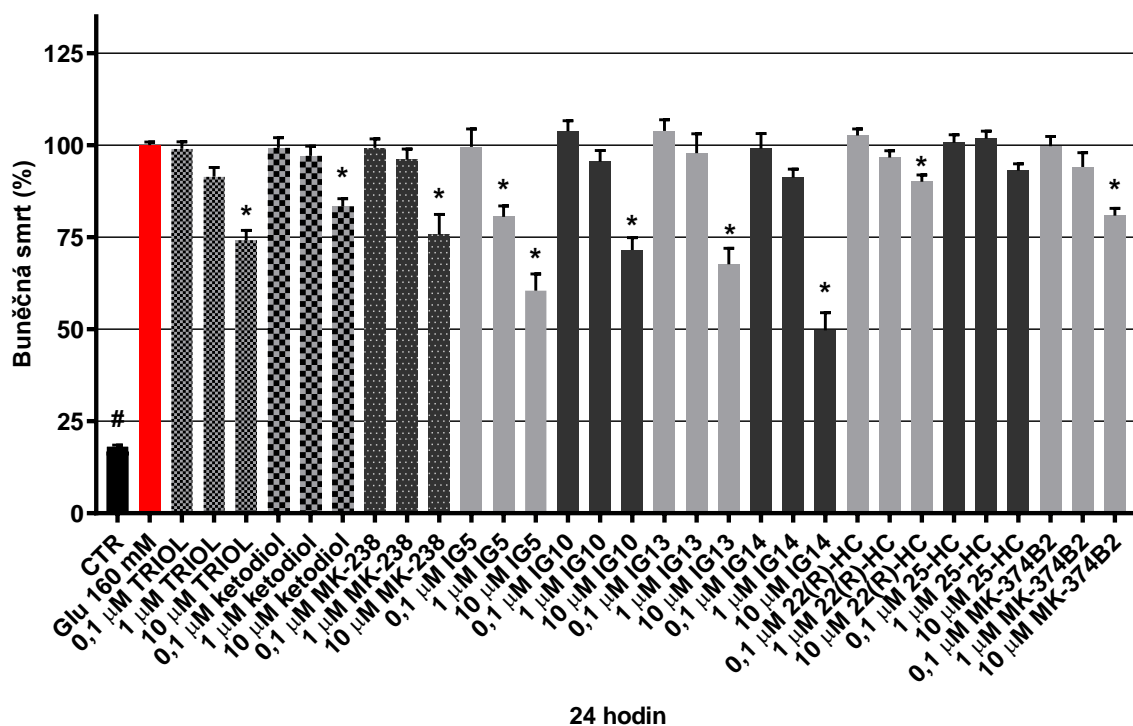
Graf 1 Stanovení buněčné smrti pomocí propidium jodidu po aplikaci přírodních oxysterolů v koncentracích 0,1; 1 a 10 μ M po 24 hodinové inkubaci. Výsledné hodnoty odpovídají buněčné smrti v % \pm SEM (standardní chyba průměru) vztážené na toxin Glu 160 mM z triplikátu ze čtyř na sobě nezávislých experimentů. Jako pozitivní kontrola slouží R-LA (0,5; 5 a 50 μ M), TRIOL a ketodiol ve stejných koncentracích jako testované látky. CTR – kontrolní buňky, Glu – glutamát, R-LA – R-lipoová kyselina, TRIOL – cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol, ketodiol – 3 β ,5 α -dihydroxycholestan-6-on, 4 β -HC – 4 β -hydroxycholesterol, 7 α -27-dHC – 7 α -27-dihydroxycholesterol, 7-keto-25-HC – 7-keto-25-hydroxycholesterol, 22(R)-HC – 22(R)-hydroxycholesterol, 22(S)-HC – 22(S)-hydroxycholesterol, 24(S)-HC – 24(S)-hydroxycholesterol, 25-HC – 25-hydroxycholesterol, 27-HC – 27-hydroxycholesterol.

U stanovení buněčné smrti pomocí PI u syntetických oxysterolů byl téměř u všech z nich pozorován koncentračně závislý pokles buněčné smrti, kromě IG5 (Graf 2). Největší pokles buněčné smrti byl pozorován u látky MK-374B2, kdy v její nejvyšší koncentraci došlo k poklesu až o 48 %. Následovaly látky MK-609A a IG14, kdy v koncentraci 10 μ M dosahovala buněčná smrt 69 % respektive 74 % oproti 100% smrti u Glu 160 mM. U látek IG1, IG2A, IG2B, IG5, IG6, IG10 a IG13 v 10 μ M koncentraci se buněčná smrt pohybovala od 78 % do zhruba 85 %. Na základě prvotních získaných dat byly vybrány syntetické oxysteroly IG5, IG10, IG13, IG14, MK-374B2 a přírodní oxysteroly 22(R)-HC a 25-HC pro ověření výsledků pomocí LDH eseje.



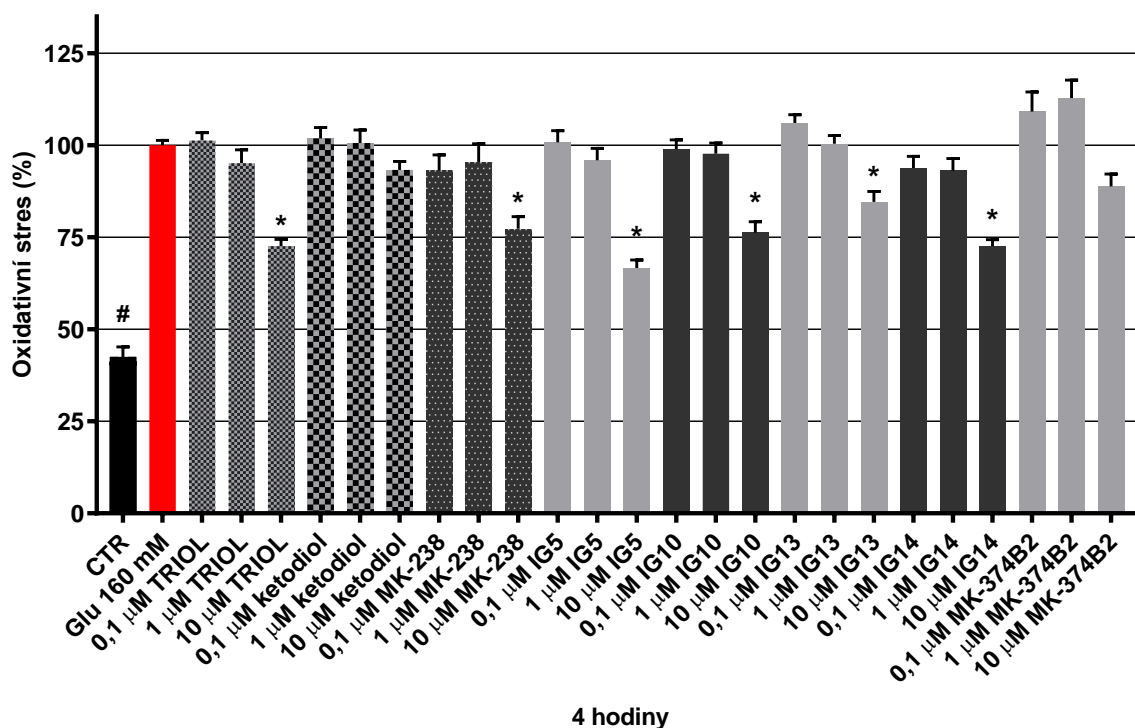
Graf 2 Stanovení buněčné smrti pomocí propidium jodidu po aplikaci syntetických oxysterolů v koncentracích 0,1; 1 a 10 μ M po 24 hodinové inkubaci. Výsledné hodnoty odpovídají buněčné smrti v % \pm SEM (standardní chyba průměru) vztažené na toxin Glu 160 mM z triplikátu ze čtyř na sobě nezávislých experimentů. Jako pozitivní kontrola slouží MK238 ve stejných koncentracích jako testované látky. CTR – kontrolní buňky, Glu – glutamát.

Pro validaci získaných výsledků z eseje s PI pro stanovení buněčné smrti byla použita esej využívající cytosolický enzym laktát dehydrogenasu. Tento enzym je uvolňován do média z buněk, které mají poškozenou buněčnou membránu. Metoda je založena na měření tohoto enzymu, a tím stanovení buněčné smrti (Sun et al., 2010). U přírodních oxysterolů 22(R)-HC a 25-HC nebyl pozorován pokles buněčné smrti větší než 10 % (Graf 3), proto nebyly tyto látky dále testovány. U syntetických oxysterolů byly potvrzeny domněnky o neuroprotektivní aktivitě z eseje s PI. Koncentračně závislý pokles buněčné smrti byl pozorován u všech syntetických oxysterolů. Největší pokles buněčné smrti je pozorovatelný u **IG14** v koncentraci 10 μ M, a to dokonce na necelých 50 %. Další výrazný pokles nastal u **IG5**, **IG10** a **IG13** v nejvyšších koncentracích, a to na 61 %, 72 % a na 68 % oproti 100% smrti u Glu 160 mM. U látky MK-374B2 byl pozorován výrazný pokles o 20 % vůči toxinu.



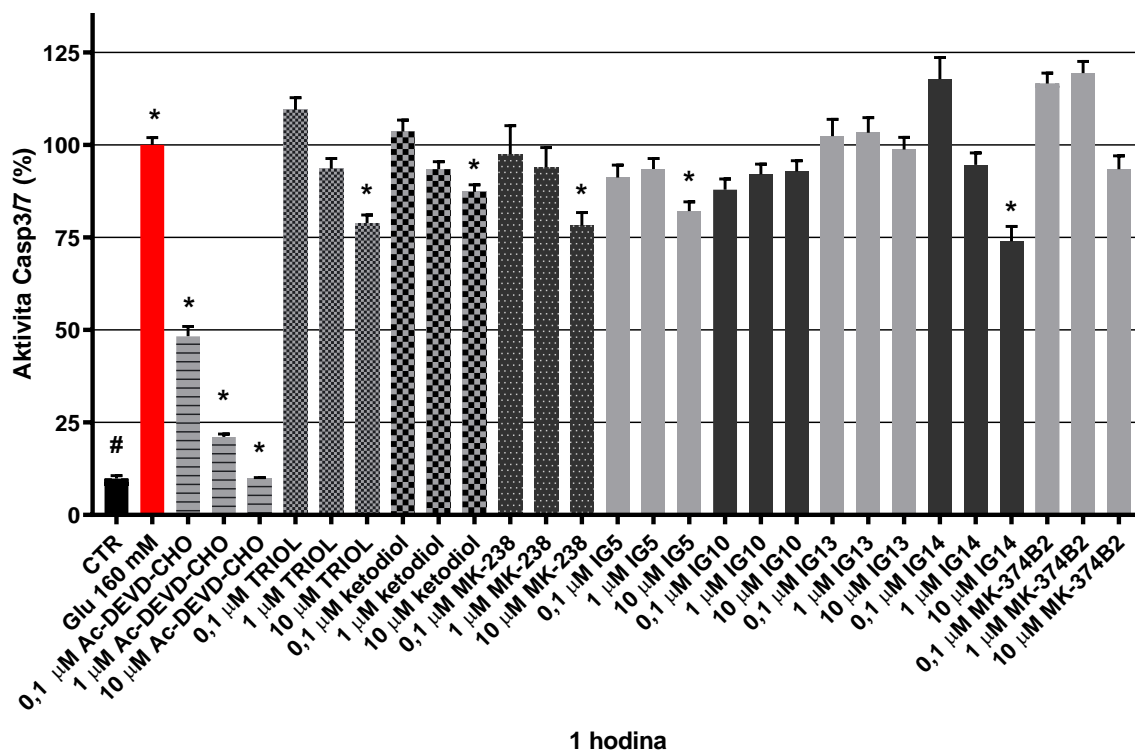
Graf 3 Stanovení buněčné smrti pomocí laktát dehydrogenasy po aplikaci přírodních a syntetických oxysterolů v koncentracích 0,1; 1 a 10 μM po 24 hodinové inkubaci. Výsledné hodnoty odpovídají buněčné smrti v % ± SEM (standardní chyba průměru) vztahované na toxin Glu 160 mM z triplikátu ze čtyř respektive pěti na sobě nezávislých experimentů. Jako pozitivní kontrola slouží TRIOL, ketodiol a MK238 ve stejných koncentracích jako testované látky. Statisticky významné hodnoty označeny * (pro látku v určité koncentraci vůči Glu 160 mM) nebo # (pro CTR vůči Glu 160 mM), $p < 0,05$, vyhodnoceny pomocí Mann-Whitney post hoc test s Bonferroniho korekcí p hodnot. CTR – kontrolní buňky, Glu – glutamát, TRIOL – cholestan-3β,5α,6β-triol, ketodiol – 3β,5α-dihydroxycholestan-6-on, 22(R)-HC – 22(R)-hydroxycholesterol, 25-HC – 25-hydroxycholesterol.

Míra oxidativního stresu neboli formace superoxidových radikálů byla měřena pomocí DHE. Toto modré fluorescenční barvivo prostupuje membránou a uvnitř buňky je superoxidovými radikály oxidováno na ethidium, které se interkaluje do DNA a jeho fluorescence je následně měřena (Bindokas et al., 1996). Nejbližší hodnotě oxidativního stresu kontrolních neovlivněných buněk (42 %) byla látka **IG5** v koncentraci 10 μM (67 %) (Graf 4). Další výrazný pokles byl pozorován u látek **IG10** a **IG14** na 76 %, respektive 72 % vůči 100 % Glu 160 mM. U nejvyšší koncentrace látky **IG13** byl pokles necelých 15 %. Látka MK-374B2 oxidativní stres prakticky nesnižovala, naopak v koncentracích 0,1 a 1 μM došlo ke zvýšení oxidativního stresu nad úroveň toxinu.



Graf 4 Měření oxidativního stresu pomocí dihydroethidia po aplikaci syntetických oxysterolů v koncentracích 0,1; 1 a 10 μM po 4 hodinové inkubaci. Výsledné hodnoty odpovídají míře oxidativního stresu v % ± SEM (standardní chyba průměru) vztažené na toxin Glu 160 mM z triplikátu z pěti až osmi na sobě nezávislých experimentů. Jako pozitivní kontrola slouží TRIOL, ketodiol a MK238 ve stejných koncentracích jako testované látky. Statisticky významné hodnoty označeny * (pro látku v určité koncentraci vůči Glu 160 mM) nebo # (pro CTR vůči Glu 160 mM), $p < 0,05$, vyhodnoceny pomocí Tukey post hoc test. CTR – kontrolní buňky, Glu – glutamát, TRIOL – cholestan-3β,5α,6β-triol, ketodiol – 3β,5α-dihydroxycholestan-6-on.

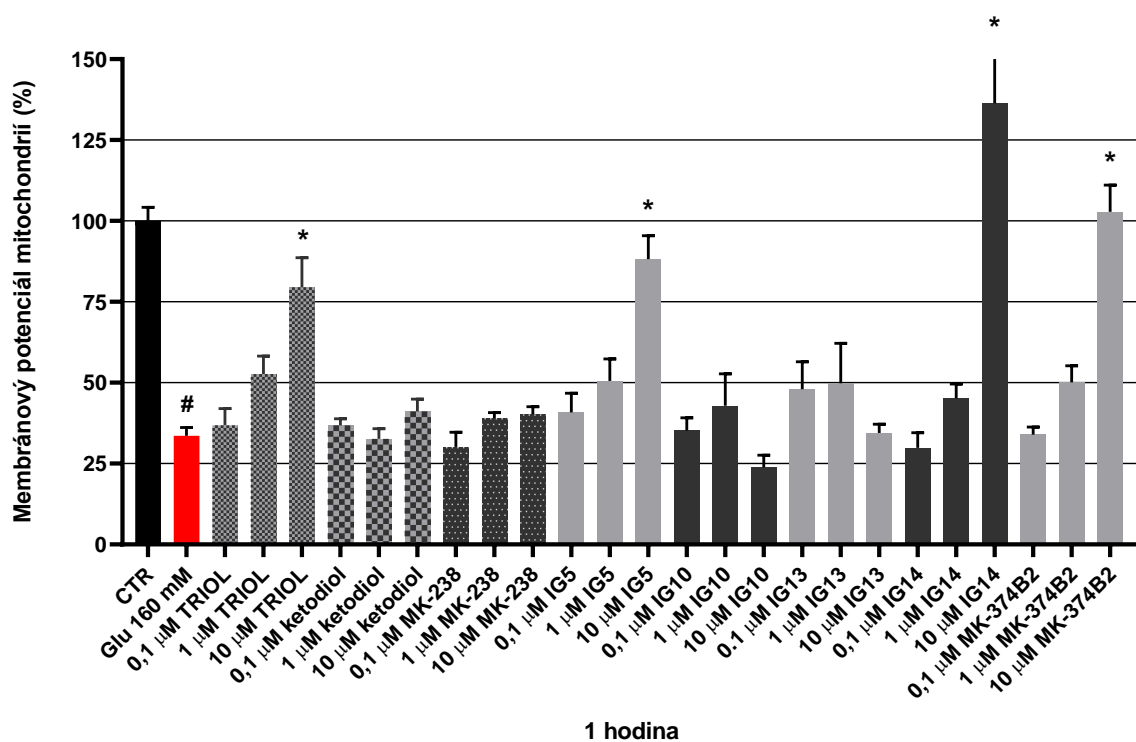
Aktivita kaspasy 3/7 byla měřena pro zjištění, zda buňky umírají apoptotickou smrtí a zdali není některá z testovaných látek schopna ovlivnit tento proces. Kromě testovaných látek byly zvláště buňky ovlivněny kaspasovým inhibitorem Ac-DEVD-CHO. Tento inhibitor je používán pro potvrzení apoptózy jakožto důvodu buněčné smrti. U tohoto inhibitoru v nejvyšší koncentraci byl pozorován pokles kaspasové aktivity na hodnoty kontroly (Graf 5). Koncentračně závislý pokles a zároveň největší pokles u nejvyšší koncentrace byl naměřen u látky **IG14** (74 %), což může značit ovlivnění kaspasové aktivity touto látkou. U ostatních testovaných látek nebyl pozorován koncentračně závislý pokles ani významný pokles, až na **IG5** 10 μM (82 %).



Graf 5 Měření aktivity kaspasy 3/7 po aplikaci syntetických oxysterolů v koncentracích 0,1; 1 a 10 μM po hodinové inkubaci. Výsledné hodnoty odpovídají aktivitě kaspázy 3/7 v % \pm SEM (standardní chyba průměru) vztahované na toxin Glu 160 mM z triplikátu z třech až pěti na sobě nezávislých experimentů. Jako pozitivní kontrola slouží TRIOL, ketodiol a MK238 ve stejných koncentracích jako testované látky. Statisticky významné hodnoty označeny * (pro látku v určité koncentraci vůči Glu 160 mM) nebo # (pro CTR vůči Glu 160 mM), $p < 0,05$, vyhodnoceny pomocí Mann-Whitney post hoc test s Bonferroniho korekcí p hodnot. CTR – kontrolní buňky, Glu – glutamát, TRIOL – cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol, ketodiol – 3 β ,5 α -dihydroxycholestan-6-on.

Membránový potenciál mitochondrií byl měřen pomocí barvy JC10. Pokud jsou buňky zdravé s nepoškozenými mitochondriemi a normálním membránovým potenciálem, jsou schopny tvořit polymerní formu JC10, která se vyznačuje červenou fluorescencí. Pokud však buňky umírají apoptózou nebo nekrotizací, nebo mají poškozené mitochondrie, a tím i narušený jejich membránový potenciál, tak nedochází k tvorbě polymerů a JC10 je přítomen jako monomer se zelenou fluorescencí (X. Wu et al., 2018). Naměřená červená a zelená fluorescence se dají do poměru (zdravé ku poškozeným buňkám) a výsledek je přepočítán na procenta membránového potenciálu mitochondrií vůči 100% kontrole (neovlivněným buňkám). U látek **IG5**, **IG14** a **MK-374B2** je pozorován koncentračně závislý nárůst membránového potenciálu (Graf 6), přičemž **MK-374B2** v nejvyšší koncentraci dosahuje prakticky stejných hodnot jako potenciál kontrolních neovlivněných buněk. U **IG14** je potenciál dokonce vyšší než u kontrolních buněk. To však je nejspíše způsobeno špatným provedením experimentu než účinkem látky samotné. Ze zjištěných

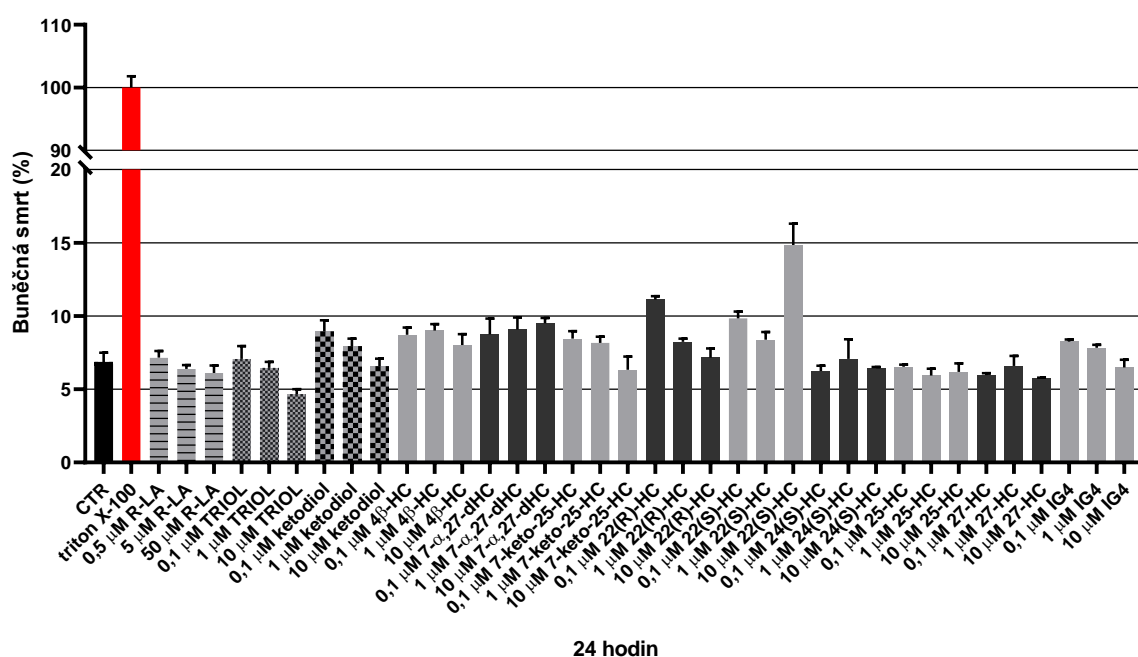
výsledků se lze domnívat, že na schopnost ochránit mitochondrie před poškozením má vliv struktura látek, přesněji přítomnost tří hydroxylových skupin. Lepších výsledků dosahují látky, které mají navíc ještě keto skupinu – TRIOL (tři hydroxylové skupiny na A a B kruhu) nezvyšuje potenciál mitochondrií na tolik jako **IG5**, **IG14** a **MK-374B2**, které mají kromě tří hydroxylových skupin také keto skupinu na B kruhu. Z porovnání hodnot pro **IG14** a **MK-374B2** lze usoudit, že hydroxylové skupiny na C2 a C3 vykazují lepší účinky v konfiguraci α . V koncentraci 10 μM u látky **IG10**, byl pozorován pokles potenciálu pod hodnoty toxinu (24 %). Tato látka nemá žádné pozitivní účinky na mitochondrie a buňky chrání před smrtí pomocí jiných mechanismů. U látky **IG13** nebyl pozorován žádný významný nárůst membránového potenciálu, nejvyšší hodnoty se pohybovaly okolo 50 %.



Graf 6 Měření mitochondriálního membránového potenciálu pomocí JC10 po aplikaci syntetických oxysterolů v koncentracích 0,1; 1 a 10 μM po hodinové inkubaci. Výsledné hodnoty odpovídají membránovému potenciálu mitochondrií v % \pm SEM (standardní chyba průměru) vztahené kontrolní buňky z triplikátu z třech až čtyřech na sobě nezávislých experimentů. Jako pozitivní kontrola slouží TRIOL, ketodiol a MK238 ve stejných koncentracích jako testované látky. Statisticky významné hodnoty označeny * (pro látku v určité koncentraci vůči CTR) nebo # (pro Glu 160 mM vůči CTR), $p < 0,05$, vyhodnoceny pomocí Mann-Whitney post hoc test s Bonferroniho korekcí p hodnot. CTR – kontrolní buňky, Glu – glutamát, TRIOL – cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol, ketodiol – 3 β ,5 α -dihydroxycholestan-6-on.

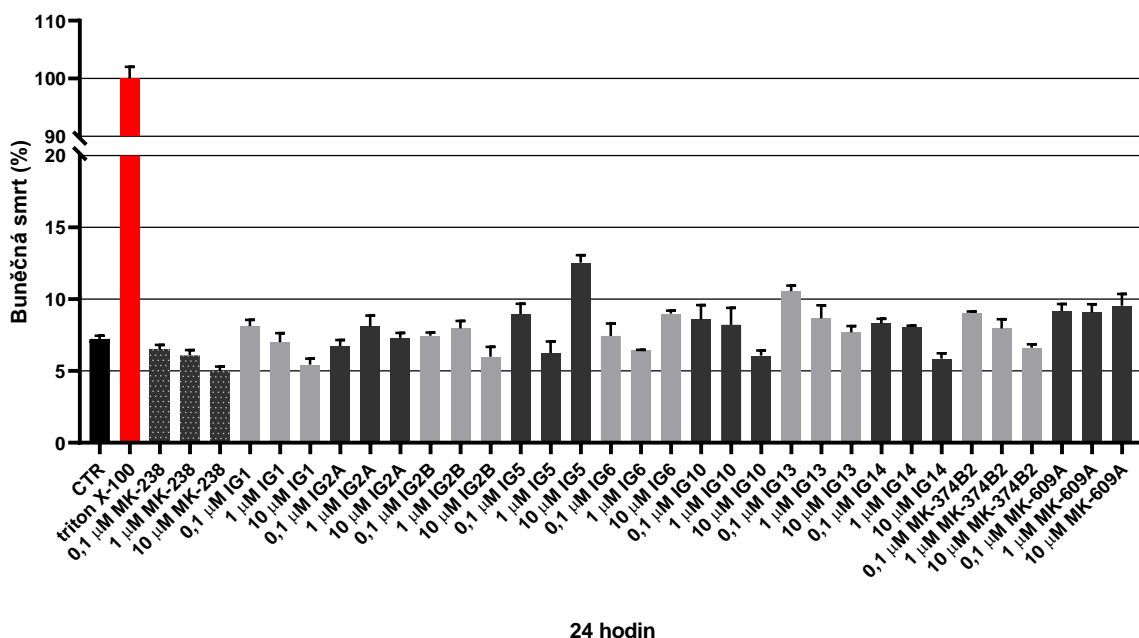
Cytotoxicita testovaných látek byla zjišťována pomocí eseje s PI jako tomu bylo u stanovení buněčné smrti, jakožto eseje pro identifikaci aktivních látek (princip metod totožný). V této eseji nebyl toxin přítomen v médiu spolu s testovanými látkami. Testované

látky byli s buňkami inkubovány čistě jen v DMEM/F12 médiu. Toxin (triton X-100) byl aplikován pouze v triplikátu k polovině kontrolních buněk před aplikací PI. U žádné z testovaných látek, ať už u přírodních nebo syntetických oxysterolů, nebyl pozorován cytotoxický efekt na neuronálních buňkách v rozsahu použitých koncentrací a inkubačního času (24 hodin). Nejvyšší hodnoty buněčné smrti u přírodních oxysterolů byly pozorovány u 22(S)-HC (Graf 7), kdy v nejvyšší koncentraci byla buněčná smrt okolo 15 % vůči 100% cytotoxicitě tritonu X-100. Koncentračně závislý pokles buněčné smrti lze pozorovat u látek 7-keto-25-HC, 22(R)-HC a **IG4** (7-KC). Kromě nejnižší koncentrace u látky 22(R)-HC (11 %) se buněčná smrt u všech látek pohybovala pod 10 % vůči 100% toxinu tritonu X-100. Zjištěné výsledky jsou v souladu s již publikovanými výsledky, kdy například 4 β -HC, **IG4** (7-KC) a 24(S)-HC v námi testovaných koncentracích nevykazovali cytotoxické účinky (Nury et al., 2013; Okabe et al., 2014).



Graf 7 Stanovení cytotoxicity pomocí propidium jodidu s tritonem X-100 po aplikaci přírodních oxysterolů v koncentracích 0,1; 1 a 10 μ M po 24 hodinové inkubaci. Výsledné hodnoty odpovídají buněčné smrti v % \pm SEM (standardní chyba průměru) vztažené na toxin triton X-100 z triplikátu z jednoho experimentu. Jako pozitivní kontrola slouží R-LA (0,5; 5 a 50 μ M), TRIOL a ketodiol ve stejných koncentracích jako testované látky. CTR – kontrolní buňky, R-LA – R-lipoová kyselina, TRIOL – cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol, ketodiol – 3 β ,5 α -dihydroxycholestan-6-on, 4 β -HC – 4 β -hydroxycholesterol, 7 α -27-dHC – 7 α -27-dihydroxycholesterol, 7-keto-25-HC – 7-keto-25-hydroxycholesterol, 22(R)-HC – 22(R)-hydroxycholesterol, 22(S)-HC – 22(S)-hydroxycholesterol, 24(S)-HC – 24(S)-hydroxycholesterol, 25-HC – 25-hydroxycholesterol, 27-HC – 27-hydroxycholesterol.

U syntetických oxysterolů byla nejvyšší buněčná smrt u látky **IG5** v nejvyšší koncentraci (13 %) (Graf 8), druhá nejvyšší smrt byla pozorována v nejnižší koncentraci látky **IG13** (11 %). U ostatních látek nepřesáhla buněčná smrt hranici 10 %. Koncentračně závislý pokles buněčné smrti byl pozorován u látek **IG1**, **IG10**, **IG13**, **IG14** a **MK-374B2**.



Graf 8 Stanovení cytotoxicity pomocí propidium jodidu s tritonem X-100 po aplikaci syntetických oxysterolů v koncentracích 0,1; 1 a 10 μM po 24 hodinové inkubaci. Výsledné hodnoty odpovídají buněčné smrti v % ± SEM (standardní chyba průměru) vztahené na triton X-100 z triplikátu z jednoho experimentu. Jako pozitivní kontrola slouží MK238 ve stejných koncentracích jako testované látky. CTR – kontrolní buňky.

5. Závěr

V teoretické části této diplomové práce jsou shrnuty poznatky o oxysterolech – jejich cestách vzniku jak enzymatických, tak neenzymatických, o jejich metabolismu, ale také o zapojení jak do fyziologických, tak i do patofyziologických procesů a neurodegenerativních onemocnění. Dále jsou podrobněji popsána vybraná neurodegenerativní onemocnění jako Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova choroba nebo amyotrofická laterální skleróza. Experimentální část byla věnována syntéze vybraných oxysterolů a testování biologické aktivity jak připravených, tak i přírodních oxysterolů.

Pomocí organické syntézy bylo nasyntetizováno 9 oxysterolů. Identifikovány byly pomocí hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetické rezonanční spektroskopie. Jak nasyntetizované, tak i vybrané přírodní oxysteroly byly v koncentracích 0,1; 1 a 10 μM testovány na neuroblastomové buněčné linii SH-SY5Y. Nejprve byla stanovována buněčná smrt pomocí propidium jodidu, respektive její snížení pomocí testovaných oxysterolů. Nejlepších výsledků dosáhly látky **IG5**, **IG10**, **IG13**, **IG14**, MK-374B2 a z přírodních 22(R)-HC a 25-HC, kdy pokles buněčné smrti u výše zmíněných látek byl až 50%. Ve validační eseji využívající laktát dehydrogenasu byly z dalšího testování vyloučeny přírodní oxysteroly 22(R)-HC a 25-HC. U ostatních byly potvrzeny neuroprotektivní účinky. Při měření míry oxidačního stresu pomocí dihydroethidia dosáhla nejnižších hodnot látka **IG5**, a to 67 %. Nejnižší kaspasovou aktivitu vykazovaly látky **IG14** (74 %) a **IG5** (82 %). Prakticky 100% membránového potenciálu mitochondrií, měřeného pomocí barviva JC10, jako u kontrolních neovlivněných buněk, dosáhly látky **IG14** a MK-374B2, které se liší pouze konfigurací hydroxylů v pozici C2 a C3 na A kruhu. Na závěr nebyl žádný z testovaných, ať už z přírodních, nebo syntetických oxysterolů, vyhodnocen jako cytotoxický, což bylo zjištěno pomocí eseje s propidium jodidem využívající cytotoxický efekt tritonu X-100.

Použitá literatura

- Association, A. (2019). 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 15(3), 321–387. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010>
- Astiasarán, I. (2011). Correlation between serum content of the main COPs (Cholesterol oxidation products) from autoxidation and CVD risk factors. *NUTRICION HOSPITALARIA*, 1, 0–0. <https://doi.org/10.3305/nh.2011.26.1.4690>
- Biedler, J. L., Helson, L., & Spengler, B. A. (1973). *Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture*. 33, 10.
- Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., & Freedman, L. S. (1978). *Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones*. 38, 7.
- Bindokas, V., Jordan, J., Lee, C., & Miller, R. (1996). Superoxide production in rat hippocampal neurons: Selective imaging with hydroethidine. *The Journal of Neuroscience*, 16(4), 1324–1336. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-04-01324.1996>
- Björkhem, I., Cedazo-Minguez, A., Leoni, V., & Meaney, S. (2009). Oxysterols and neurodegenerative diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(3), 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.001>
- Björkhem, I., Lütjohann, D., Diczfalusy, U., Stähle, L., Ahlborg, G., & Wahren, J. (1998). Cholesterol homeostasis in human brain: Turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *Journal of Lipid Research*, 39(8), 1594–1600. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32188-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32188-X)
- Briscoe, J., & Thérond, P. P. (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(7), 418–431. <https://doi.org/10.1038/nrm3598>
- Brooks, S. C., Locke, E. R., & Soule, H. D. (1973). Estrogen Receptor in a Human Cell Line (MCF-7) from Breast Carcinoma. *Journal of Biological Chemistry*, 248(17), 6251–6253. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43537-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43537-0)
- Brown, A. J., & Jessup, W. (2009). Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(3), 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.005>
- Brown, A. J., Leong, S. L., Dean, R. T., & Jessup, W. (1997). 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque.

- Journal of Lipid Research*, 38(9), 1730–1745. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37148-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37148-0)
- Cali, J. J., & Russell, D. W. (1991). Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reaction in bile acid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 266(12), 7774–7778. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)89517-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)89517-9)
- Cenini, G., & Voos, W. (2019). Mitochondria as Potential Targets in Alzheimer Disease Therapy: An Update. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2019.00902>
- Corcoran, R. B., & Scott, M. P. (2006). Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(22), 8408–8413. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602852103>
- Darrell Hulisz, P. (2018). Amyotrophic Lateral Sclerosis: Disease State Overview. *Supplements and Featured Publications*, 24(15). <https://www.ajmc.com/view/amyotrophic-lateral-sclerosis-disease-state-overview>
- DeBose-Boyd, R. A. (2008). Feedback regulation of cholesterol synthesis: Sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Research*, 18(6), 609–621. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.61>
- Deckert, V., Duverneuil, L., Poupon, S., Monier, S., Le Guern, N., Lizard, G., Masson, D., & Lagrost, L. (2002). The impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by 7-ketocholesterol is associated with an early activation of protein kinase C. *British Journal of Pharmacology*, 137(5), 655–662. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704920>
- Deng, H., Wang, P., & Jankovic, J. (2018). The genetics of Parkinson disease. *Ageing Research Reviews*, 42, 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.12.007>
- Dengler, W. A., Schulte, J., Berger, D. P., Mertelsmann, R., & Fiebig, H. H. (1995). Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anti-Cancer Drugs*, 6(4), 522–532.
- Dickson, D. W. (2012). Parkinson's Disease and Parkinsonism: Neuropathology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8), a009258. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009258>
- DuSell, C. D., Nelson, E. R., Wang, X., Abdo, J., Mödder, U. I., Umetani, M., Gesty-Palmer, D., Javitt, N. B., Khosla, S., & McDonnell, D. P. (2010). The Endogenous Selective Estrogen Receptor Modulator 27-Hydroxycholesterol Is a Negative Regulator of

- Bone Homeostasis. *Endocrinology*, 151(8), 3675–3685.
<https://doi.org/10.1210/en.2010-0080>
- Dwyer, J. R., Sever, N., Carlson, M., Nelson, S. F., Beachy, P. A., & Parhami, F. (2007). Oxysterols Are Novel Activators of the Hedgehog Signaling Pathway in Pluripotent Mesenchymal Cells *. *Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8959–8968.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M611741200>
- Fuda, H., Javitt, N. B., Mitamura, K., Ikegawa, S., & Strott, C. A. (2007). Oxysterols are substrates for cholesterol sulfotransferase. *Journal of Lipid Research*, 48(6), 1343–1352. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700018-JLR200>
- Gamba, P., Leonarduzzi, G., Tamagno, E., Guglielmotto, M., Testa, G., Sottero, B., Gargiulo, S., Biasi, F., Mauro, A., Viña, J., & Poli, G. (2011). Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress, and amyloid- β in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: Three partners in crime. *Aging Cell*, 10(3), 403–417.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00681.x>
- Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. A., & Brown, M. S. (2006). Protein Sensors for Membrane Sterols. *Cell*, 124(1), 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.022>
- Górová, V. (2019). *Studium biologické aktivity přírodních a syntetických derivátů polyfenolů a brassinosteroidů na glutamátém indukovaném modelu excitotoxicity* [Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Mgr. Gabriel Gonzalez]. <https://theses.cz/id/ajtyda/>
- Guo, F., Liu, X., Cai, H., & Le, W. (2018). Autophagy in neurodegenerative diseases: Pathogenesis and therapy. *Brain Pathology*, 28(1), 3–13.
<https://doi.org/10.1111/bpa.12545>
- Heverin, M., Bogdanovic, N., Lütjohann, D., Bayer, T., Pikuleva, I., Bretillon, L., Diczfalusy, U., Winblad, B., & Björkhem, I. (2004). Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Lipid Research*, 45(1), 186–193. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300320-JLR200>
- Chang, Y.-J., Linh, N. H., Shih, Y. H., Yu, H.-M., Li, M. S., & Chen, Y.-R. (2016). Alzheimer's Amyloid- β Sequesters Caspase-3 in Vitro via Its C-Terminal Tail. *ACS Chemical Neuroscience*, 7(8), 1097–1106.
<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.6b00049>
- Cheng, D., Chang, C. C. Y., Qu, X., & Chang, T.-Y. (1995). Activation of Acyl-Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase by Cholesterol or by Oxysterol in a Cell-free System

- (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(2), 685–695.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.2.685>
- Cheng, D., Jenner, A. M., Shui, G., Cheong, W. F., Mitchell, T. W., Nealon, J. R., Kim, W. S., McCann, H., Wenk, M. R., Halliday, G. M., & Garner, B. (2011). Lipid Pathway Alterations in Parkinson's Disease Primary Visual Cortex. *PLOS ONE*, 6(2), e17299.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017299>
- Jessup, W., & Brown, A. J. (2005). Novel Routes for Metabolism of 7-Ketocholesterol. *Rejuvenation Research*, 8(1), 9–12. <https://doi.org/10.1089/rej.2005.8.9>
- Jimenez-Sanchez, M., Licitra, F., Underwood, B. R., & Rubinsztein, D. C. (2017). Huntington's Disease: Mechanisms of Pathogenesis and Therapeutic Strategies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(7), a024240.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024240>
- Kha, H. T., Basseri, B., Shouhed, D., Richardson, J., Tetradis, S., Hahn, T. J., & Parhami, F. (2004). Oxysterols Regulate Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Pro-Bone and Anti-Fat. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(5), 830–840.
<https://doi.org/10.1359/jbmr.040115>
- Khatib, S., & Vaya, J. (2014). Oxysterols and symptomatic versus asymptomatic human atherosclerotic plaque. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(3), 709–713. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.116>
- Kloudova, A., Guengerich, F. P., & Soucek, P. (2017). The Role of Oxysterols in Human Cancer. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(7), 485–496.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.03.002>
- Kouli, A., Torsney, K. M., & Kuan, W.-L. (2018). Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. In T. B. Stoker & J. C. Greenland (Ed.), *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*. Codon Publications.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536722/>
- Kumar, A., Sidhu, J., Goyal, A., & Tsao, J. W. (2022). Alzheimer Disease. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/>
- Larsson, H., Böttiger, Y., Iuliano, L., & Diczfalusy, U. (2007). In vivo interconversion of 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol, potential surrogate markers for oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(5), 695–701.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.033>
- Lemaire, S., Lizard, G., Monier, S., Miguet, C., Gueldry, S., Volot, F., Gambert, P., & Néel, D. (1998). Different patterns of IL-1 β secretion, adhesion molecule expression and

- apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7α -, 7β -hydroxycholesterol, or 7-ketocholesterol. *FEBS Letters*, 440(3), 434–439. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01496-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01496-3)
- Liu, H., Yuan, L., Xu, S., Wang, K., & Zhang, T. (2005). Cholestane- 3β , 5α , 6β -triol inhibits osteoblastic differentiation and promotes apoptosis of rat bone marrow stromal cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96(1), 198–208. <https://doi.org/10.1002/jcb.20510>
- Liu, H., Yuan, L., Xu, S., Zhang, T., & Wang, K. (2004). Cholestane- 3β , 5α , 6β -triol promotes vascular smooth muscle cells calcification. *Life Sciences*, 76(5), 533–543. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.06.025>
- Lordan, S., Mackrill, J. J., & O'Brien, N. M. (2009). Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: Implications in the pathology of degenerative diseases. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(5), 321–336. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.01.001>
- Lund, E. G., Guileyardo, J. M., & Russell, D. W. (1999). CDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(13), 7238–7243. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.13.7238>
- Lund, E. G., Kerr, T. A., Sakai, J., Li, W.-P., & Russell, D. W. (1998). CDNA Cloning of Mouse and Human Cholesterol 25-Hydroxylases, Polytropic Membrane Proteins That Synthesize a Potent Oxysterol Regulator of Lipid Metabolism*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(51), 34316–34327. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.51.34316>
- Lütjohann, D., Breuer, O., Ahlborg, G., Nennesmo, I., Sidén, A., Diczfalusy, U., & Björkhem, I. (1996). Cholesterol homeostasis in human brain: Evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18), 9799–9804. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9799>
- Luu, W., Sharpe, L. J., Capell-Hattam, I., Gelissen, I. C., & Brown, A. J. (2016). Oxysterols: Old Tale, New Twists. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 56(1), 447–467. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103233>
- Lyons, M. A., & Brown, A. J. (2001). Metabolism of an oxysterol, 7-ketocholesterol, by sterol 27-hydroxylase in hepG2 cells. *Lipids*, 36(7), 701–711. <https://doi.org/10.1007/s11745-001-0775-8>

- MacDonald, M. E., Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Myers, R. H., Lin, C., Srinidhi, L., Barnes, G., Taylor, S. A., James, M., Groot, N., MacFarlane, H., Jenkins, B., Anderson, M. A., Wexler, N. S., Gusella, J. F., Bates, G. P., Baxendale, S., Hummerich, H., Kirby, S., ... Harper, P. S. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72(6), 971–983. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90585-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90585-E)
- Mao, K., & Zhang, G. (2021). The role of PARP1 in neurodegenerative diseases and aging. *The FEBS Journal*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1111/febs.15716>
- McColgan, P., & Tabrizi, S. J. (2018). Huntington's disease: A clinical review. *European Journal of Neurology*, 25(1), 24–34. <https://doi.org/10.1111/ene.13413>
- Mitić, T., Shave, S., Semjonous, N., McNae, I., Cobice, D. F., Lavery, G. G., Webster, S. P., Hadoke, P. W. F., Walker, B. R., & Andrew, R. (2013). 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 contributes to the balance between 7-keto- and 7-hydroxy-oxysterols in vivo. *Biochemical Pharmacology*, 86(1), 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.002>
- Monzio Compagnoni, G., Di Fonzo, A., Corti, S., Comi, G. P., Bresolin, N., & Masliah, E. (2020). The Role of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases: The Lesson from Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, 57(7), 2959–2980. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01926-1>
- Morrissey, P. A., & Kiely, M. (2006). Oxysterols: Formation and Biological Function. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids* (s. 641–674). Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-28813-9_18
- Nachtergaele, S., Mydock, L. K., Krishnan, K., Rammohan, J., Schlesinger, P. H., Covey, D. F., & Rohatgi, R. (2012). Oxysterols are allosteric activators of the oncoprotein Smoothed. *Nature Chemical Biology*, 8(2), 211–220. <https://doi.org/10.1038/nchembio.765>
- Nury, T., Samadi, M., Zarrouk, A., Riedinger, J. M., & Lizard, G. (2013). Improved synthesis and in vitro evaluation of the cytotoxic profile of oxysterols oxidized at C4 (4 α - and 4 β -hydroxycholesterol) and C7 (7-ketocholesterol, 7 α - and 7 β -hydroxycholesterol) on cells of the central nervous system. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, 558–567. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.028>
- Okabe, A., Urano, Y., Itoh, S., Suda, N., Kotani, R., Nishimura, Y., Saito, Y., & Noguchi, N. (2014). Adaptive responses induced by 24S-hydroxycholesterol through liver X

- receptor pathway reduce 7-ketocholesterol-caused neuronal cell death. *Redox Biology*, 2, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.11.007>
- Otaegui-Arrazola, A., Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2010). Oxysterols: A world to explore. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3289–3303. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.023>
- Poli, G., Biasi, F., & Leonarduzzi, G. (2013). Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. *Redox Biology*, 1(1), 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.12.001>
- Poli, G., Sottero, B., Gargiulo, S., & Leonarduzzi, G. (2009). Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(3), 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.003>
- Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H. J., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Oxysterols block transport by binding to Insig. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(16), 6511–6518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700899104>
- Romeo, G. R., & Kazlauskas, A. (2008). Oxysterol and Diabetes Activate STAT3 and Control Endothelial Expression of Profilin-1 via OSBP1*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(15), 9595–9605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710092200>
- Russell, D. W. (2000). Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529(1), 126–135. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00142-6](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00142-6)
- Russell, D. W. (2003). The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), 137–174. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712>
- Saberi, S., Stauffer, J. E., Schulte, D. J., & Ravits, J. (2015). “Neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis and its variants”. *Neurologic clinics*, 33(4), 855–876. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2015.07.012>
- Samadi, A., Sabuncuoglu, S., Samadi, M., Isikhan, S. Y., Chirumbolo, S., Peana, M., Lay, I., Yalcinkaya, A., & Bjorklund, G. (2021). A Comprehensive Review on Oxysterols and Related Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 28(1), 110–136. <https://doi.org/10.2174/0929867327666200316142659>
- Shafaati, M., Marutle, A., Pettersson, H., Lövgren-Sandblom, A., Olin, M., Pikuleva, I., Winblad, B., Nordberg, A., & Björkhem, I. (2011). Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in the brains of Alzheimer’s patients with the Swedish APP

- 670/671 mutation. *Journal of Lipid Research*, 52(5), 1004–1010. <https://doi.org/10.1194/jlr.M014548>
- Sheppard, O., & Coleman, M. (2020). Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis. In X. Huang (Ed.), *Alzheimer's Disease: Drug Discovery*. Exon Publications. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK566126/>
- Shibata, N., & Glass, C. K. (2010). Macrophages, Oxysterols and Atherosclerosis. *Circulation Journal*, 74(10), 2045–2051. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-10-0860>
- Shinkyō, R., Xu, L., Tallman, K. A., Cheng, Q., Porter, N. A., & Guengerich, F. P. (2011). Conversion of 7-Dehydrocholesterol to 7-Ketocholesterol Is Catalyzed by Human Cytochrome P450 7A1 and Occurs by Direct Oxidation without an Epoxide Intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, 286(38), 33021–33028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.282434>
- Siddique, N., & Siddique, T. (1993). Amyotrophic Lateral Sclerosis Overview. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. W. Gripp, G. M. Mirzaa, & A. Amemiya (Ed.), *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1450/>
- Sottero, B., Gamba, P., Gargiulo, S., Leonarduzzi, G., & Poli, G. (2009). Cholesterol oxidation products and disease: An emerging topic of interest in medicinal chemistry. *Current Medicinal Chemistry*, 16(6), 685–705. Scopus. <https://doi.org/10.2174/092986709787458353>
- Sun, Z.-W., Zhang, L., Zhu, S.-J., Chen, W.-C., & Mei, B. (2010). Excitotoxicity effects of glutamate on human neuroblastoma SH-SY5Y cells via oxidative damage. *Neuroscience Bulletin*, 26(1), 8–16. <https://doi.org/10.1007/s12264-010-0813-7>
- Talbott, E. O., Malek, A. M., & Lacomis, D. (2016). Chapter 13—The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. In M. J. Aminoff, F. Boller, & D. F. Swaab (Ed.), *Handbook of Clinical Neurology* (Roč. 138, s. 225–238). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802973-2.00013-6>
- Thal, D. R., Walter, J., Saido, T. C., & Fändrich, M. (2015). Neuropathology and biochemistry of A β and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 129(2), 167–182. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1375-y>
- Tirosh, O., Sen, C. K., Roy, S., Kobayashi, M. S., & Packer, L. (1999). Neuroprotective effects of α -lipoic acid and its positively charged amide analogue. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(11), 1418–1426. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00014-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00014-3)

- Vaya, J., & Schipper, H. M. (2007). Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *Journal of Neurochemistry*, *102*(6), 1727–1737. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04689.x>
- Vejux, A., & Lizard, G. (2009). Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Molecular Aspects of Medicine*, *30*(3), 153–170. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.006>
- Wong, J., Quinn, C. M., & Brown, A. J. (2004). Statins Inhibit Synthesis of an Oxysterol Ligand for the Liver X Receptor in Human Macrophages With Consequences for Cholesterol Flux. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *24*(12), 2365–2371. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000148707.93054.7d>
- World Health Organization. (2017). *Global action plan on the public health response to dementia 2017–2025*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259615>
- Wu, Q., Ishikawa, T., Sirianni, R., Tang, H., McDonald, J. G., Yuhanna, I. S., Thompson, B., Girard, L., Mineo, C., Brekken, R. A., Umetani, M., Euhus, D. M., Xie, Y., & Shaul, P. W. (2013). 27-Hydroxycholesterol Promotes Cell-Autonomous, ER-Positive Breast Cancer Growth. *Cell Reports*, *5*(3), 637–645. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.006>
- Wu, X., Li, X., Liu, Y., Yuan, N., Li, C., Kang, Z., Zhang, X., Xia, Y., Hao, Y., & Tan, Y. (2018). Hydrogen exerts neuroprotective effects on OGD/R damaged neurons in rat hippocampal by protecting mitochondrial function via regulating mitophagy mediated by PINK1/Parkin signaling pathway. *Brain Research*, *1698*, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.06.028>
- Xu, X. X., & Tabas, I. (1991). Lipoproteins activate acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase in macrophages only after cellular cholesterol pools are expanded to a critical threshold level. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(26), 17040–17048. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)47337-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)47337-7)
- Zarrouk, A., Vejux, A., Mackrill, J., O’Callaghan, Y., Hammami, M., O’Brien, N., & Lizard, G. (2014). Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Research Reviews*, *18*, 148–162. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.09.006>