



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Deriváty oxysterolů a jejich antiproliferační
aktivita *in vitro***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Kateřina Horáková**
Studijní program: N1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.**
Termín odevzdání práce: 2022

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora:	Bc. Kateřina Horáková
Název práce:	Deriváty oxysterolů a jejich antiproliferační aktivita <i>in vitro</i>
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2022
Abstrakt:	<p>Tato diplomová práce se zabývá antiproliferační aktivitou derivátů oxysterolů <i>in vitro</i>. Oxysteroly jsou bioaktivní látky, které vznikají oxidací molekuly cholesterolu, a mnoho z nich má významné cytotoxické a proapoptotické vlastnosti, které by mohly nalézt uplatnění v protinádorové terapii. V teoretické části práce jsou shrnuty informace o cervikálním karcinomu, buněčném cyklu, programované buněčné smrti a oxysterolech. V experimentální části práce bylo provedeno testování antiproliferační aktivity dvou syntetických a dvou přírodních derivátů oxysterolů na buněčné linii HeLa odvozené od nádoru děložního hrdla. Metodou western blottingu byly sledovány hladiny proapoptotických proteinů a jaderného receptoru. Průběh buněčného cyklu byl analyzován pomocí průtokové cytometrie a metodou imunofluorescence byla sledována translokace receptoru do jádra buněk.</p>
Klíčová slova:	Oxysteroly, cervikální karcinom, buněčný cyklus, apoptóza, western blotting, průtoková cytometrie, imunofluorescence
Počet stran:	71
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Bc. Kateřina Horáková

Title of thesis: Oxysterol derivatives and their antiproliferative activity *in vitro*

Type of thesis: Diploma

Department: Laboratory of Growth Regulators

Supervisor: Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.

The year of presentation: 2022

Abstract: The diploma thesis deals with antiproliferative activity of oxysterol derivatives *in vitro*. Oxysterols are bioactive substances that arise from the oxidation of the cholesterol molecules, and many of them have significant cytotoxic and proapoptotic properties that could find application in antitumor therapy. The theoretical part of the thesis summarizes information about cervical cancer, the cell cycle, programmed cell death and oxysterols. In the experimental part of the thesis the antiproliferative activity of two synthetic and two natural oxysterol derivatives was tested on the HeLa cell line derived from cervical cancer. The levels of proapoptotic proteins and nuclear receptor were monitored by western blotting. The cell cycle progression was analyzed using flow cytometry and the nuclear receptor translocation was monitored using the immunofluorescence method.

Keywords: Oxysterols, cervical cancer, cell cycle, apoptosis, western blotting, flow cytometry, immunofluorescence

Number of pages: 71

Number of appendices: 0

Language: Czech

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

V Olomouci dne

.....

Bc. Kateřina Horáková

Poděkování

Tato diplomová práce byla realizována s podporou Interní grantové agentury Univerzity Palackého (IGA_2022_007). Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Lucii Rárové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a předané znalosti při vypracovávání mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Marii Kvasnicové, Ph.D., Anežce Šindlerové a Ing. Tereze Štenclové za pomoc v laboratoři a cenné rady.

Obsah

Seznam zkratek	8
1. Úvod a cíle práce	11
2. Teoretická část.....	12
2.1 CERVIKÁLNÍ KARCINOM	12
2.1.1 Obecná charakteristika rakoviny.....	12
2.1.2 Obecná charakteristika cervikálního karcinomu.....	13
2.1.3 Původce cervikálního karcinomu.....	14
2.1.4 Prevence vzniku cervikálního karcinomu	16
2.1.5 Buněčné linie odvozené z cervikálního karcinomu	17
2.1.6 Metody léčby cervikálního karcinomu.....	18
2.1.7 Nejčastěji používaná léčiva	18
2.2 BUNĚČNÝ CYKLUS.....	20
2.2.1 Kontrolní systém buněčného cyklu.....	21
2.2.2 Retinoblastomový protein	22
2.2.3 Protein p53.....	22
2.2.4 Změny v buněčném cyklu u nádorových buněk	23
2.3 APOPTÓZA.....	24
2.3.1 Kaspáza 7.....	25
2.3.2 PARP-1.....	25
2.4 OXYSTEROLY	27
2.4.1 Členění steroidních látek	27
2.4.2 Biosyntéza oxysterolů	28
2.4.3 Biologické funkce oxysterolů	30
2.4.4 Uplatnění oxysterolů v terapii nádorů.....	31
3. Experimentální část	33
3.1 Buněčné linie a testované deriváty.....	33
3.2 Chemikálie	34
3.2.1 Roztoky.....	36
3.2.2 Protilátky	37
3.3 Přístrojové vybavení.....	37
3.4 Metody.....	38
3.4.1 Kultivace buněčné linie a její ovlivnění testovanou látkou.....	38
3.4.2 Sklizení a lyzace buněk pro western blotting	39
3.4.3 SDS-PAGE a western blotting.....	40

3.4.4	Imunodetekce proteinů	41
3.4.5	Analýza buněčného cyklu průtokovým cytometrem.....	42
3.4.6	Imunofluorescenční analýza	43
4.	Výsledky	44
4.1	Western blotting	44
4.2	Průtoková cytometrie	47
4.3	Imunofluorescenční analýza	48
5.	Diskuze	49
6.	Závěr	53
7.	Použitá literatura.....	54

Seznam zkratk

14-3-3 σ - gen pro protein stratifin
7-KC - 7-ketocholesterol
AA - akrylamid
AC - adenokarcinom
AMK - aminokyselina
Apaf-1 - faktor aktivující apoptotickou proteázu
APS - peroxodisíran amonný
Bak - Bcl-2 antagonist/killer
Bax - Bcl-2-associated protein X
Bcl-2 - B-cell lymphoma 2
Bcl-XL - B-cell lymphoma 2 extra-large
Bis AA - bisakrylamid
BJ - primární buňky lidských fibroblastů
BRCA1 - gen citlivosti na rakovinu prsu 1
BSA - hovězí sérový albumin
CaSki - lidské buňky spinocelulárního cervikálního karcinomu
CDK - cyklin-dependentní kináza
CEM - linie akutní lymfoblastické leukémie
CH₃COOH - kyselina octová
CIN - cervikální intraepiteliální neoplazie
CO₂ - oxid uhličitý
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO - dimethylsulfoxid
DNA - deoxyribonukleová kyselina
DTT - dithiothreitol
E2F - transkripční faktor E2F
EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA - ethylenglykoltetraoctová kyselina
ER - estrogenový receptor

Fas-L - Fas ligand, ligand smrti
GADD45 - gen zastavení růstu a poškození DNA
HeLa - lidské buňky cervikální karcinomu
HL-HPV - nízko rizikové lidské papilomaviry
HMG-CoA reductáza - 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reductáza
HPV - lidské papilomaviry
HR-HPV - vysoce rizikové lidské papilomaviry
HSP60 - heat shock protein 60
HSP90 - heat shock protein 90
HT-29 - buněčná linie karcinomu tlustého střeva
IC₅₀ - poloviční inhibiční koncentrace
IF - imunofluorescence
IL-8 - interleukin 8
KCl - chlorid draselný
KO⁻ - negativní kontrola
KO⁺ - pozitivní kontrola
LAMA-89 - buněčná linie myeloidní leukémie
LCR - dlouhá kontrolní oblast
LP - lyzační pufř
LXR - jaterní X receptor
MDA-MB-231 - buněčná linie prsního adenokarcinomu
Mdm2 - E3 ubiquitin-protein ligáza
MSH2 - DNA mismatch repair protein
Na₂HPO₄ · 12 H₂O - hydrogenfosforečnan sodný
Na₂VO₃ - vanadičitan sodný
NaCl - chlorid sodný
NAD⁺ - nikotinamidadenindinukleotid
NaF - fluorid sodný
ORF - otevřený čtecí rámeček
p107 - retinoblastoma-like protein 1

p130 - retinoblastoma-like protein 2
p21 - inhibitor cyklin-dependentních kináz 1
p53 - buněčný nádorový antigen p53
PARP-1 - poly (ADP-ribóza) polymeráza-1
PBS - fosfátový pufr
PCR - polymerázová řetězová reakce
PI - propidium jodid
PMSF - fenylmetylsulfonylfluorid
pRb - retinoblastomový protein
RAM - protilátka králičí proti myši
RIPA - radioimunoprecipitační pufr
RNA - ribonukleová kyselina
ROR - orphan receptor související s retinoidy
ROS - reaktivní kyslíkové radikály
SCC - spinocelulární karcinom
SDS - dodecylsírán sodný
SDS-PAGE - polyakrylamidová elektroforéza za přítomnosti dodecylsírany sodného
SiHa - lidské buňky spinocelulárního cervikálního karcinomu
SWAR - protilátka prasečí proti králičí
TBS - fyziologický roztok pufovaný Tris-pufrem
TEMED - tetramethyletylendiamin
THP-1 - buněčná linie monocytární leukémie
TNF α - tumor nekrotizující faktor α
TRIS - tris (hydroxymethyl) aminomethan
VEGF-A - vaskulární endotelový růstový faktor
VEGF-R - receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor
WB - western blotting
ŽK - žlučové kyseliny

1. Úvod a cíle práce

Tato diplomová práce se zabývá problematikou antiproliferační aktivity vybraných derivátů oxysterolů *in vitro*. Oxysteroly představují skupinu látek, které vznikají enzymatickou nebo neenzymatickou oxidací molekuly cholesterolu. Jedná se o bioaktivní látky, jelikož se v lidském organismu zapojují do mnoha fyziologických procesů. U oxysterolů vznikajících především neenzymatickou oxidací byly prokázány významné cytotoxické a proapoptotické vlastnosti, které by mohly nalézt uplatnění v terapii nádorových onemocnění. Pro testování těchto vlastností byla v experimentální části práce využita buněčná linie HeLa odvozená od cervikálního karcinomu.

Cervikální karcinom neboli karcinom děložního čípku je jedno z nejčastějších nádorových onemocnění u žen. Z 95 % je onemocnění způsobeno infekcí lidskými papilomaviry a to především vysoce rizikovými typy 16 a 18, které jsou klasifikovány jako cervikální karcinogeny. Infekci a případnému vzniku karcinomu lze účinně předcházet prostřednictvím 3 dostupných rekombinantních vakcín a pravidelného preventivního screeningu. Při odhalení nemoci v časném stádiu je šance na pětileté přežití více než 90 %. Léčba je indikována individuálně podle závažnosti a preferencí na zachování plodnosti. Nejčastěji je kombinováno chirurgické odstranění, radioterapie a chemoterapie.

Cílem teoretické části diplomové práce bylo provést literární rešerši na zadané téma. V první kapitole teoretické části jsou uvedeny základní informace o karcinomu děložního čípku, jeho původci, klasifikaci a metodách léčby. Druhá kapitola je věnována buněčnému cyklu včetně jeho kontrolního systému. Třetí kapitola obsahuje stručné informace o programované buněčné smrti neboli apoptóze. Poslední kapitola teoretické části popisuje zařazení oxysterolů v systému steroidních látek, způsoby vzniku oxysterolů, dále také jejich biologické funkce a uplatnění v terapii nádorů.

V experimentální části bylo cílem provést testování antiproliferační aktivity vybraných derivátů oxysterolů metodami western blottingu, průtokové cytometrie a imunofluorescence a současně získat teoretické i praktické znalosti v oblasti kultivace buněčných kultur.

2. Teoretická část

2.1 CERVIKÁLNÍ KARCINOM

Cervikální karcinom neboli karcinom děložního čípku je označení pro zhoubný nádor děložního hrdla. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO, World Health Organization) se jedná o čtvrté nejčastější nádorové onemocnění u žen. V roce 2020 bylo na celém světě odhaleno přibližně 604 000 nových případů. Zhruba 342 000 žen tentýž rok této nemoci podlehl, z čehož obecně asi 90 % všech úmrtí připadá na zaostalé nebo rozvojové země především sub-Saharské Afriky, Melanésie, Latinské Ameriky, Karibiku a jihovýchodní Asie. V České republice bylo v roce 2018 diagnostikováno 3565 nových případů (66,07/100 000 žen) s úmrtností necelých 11 %. K nejčastějšímu záchytu onemocnění dochází mezi 30 - 34 rokem života (<https://www.who.int/>; Dušek *et al.*, 2007; Cutts *et al.*, 2007).

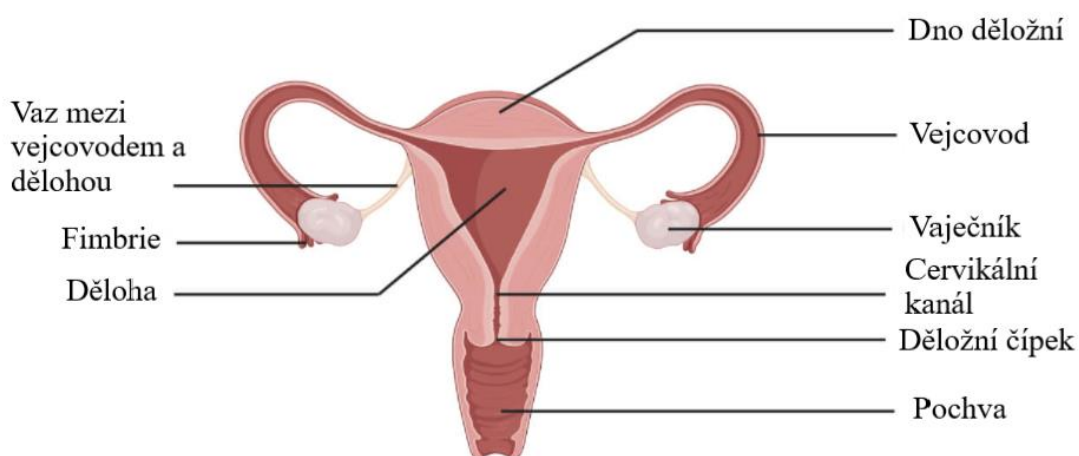
2.1.1 Obecná charakteristika rakoviny

Rakovina je genetické onemocnění, které je charakteristické dynamickými změnami v genomu. Tyto změny jsou způsobeny mutacemi aktivující onkogeny a inaktivující tumor supresorové geny a geny stability. Proces transformace normální zdravé buňky na nádorovou se nazývá karcinogeneze a buňka v jeho průběhu získává nové vlastnosti (Romero-Garcia *et al.*, 2011).

Pro nádorovou buňku je typická nezávislost na vnějších stimulačních a inhibujících růstových signálech a schopnost odolávat apoptóze, které dohromady umožňují nekontrolovatelné buněčné dělení. Nádorová buňka se může dělit prakticky neomezeně a v určité fázi si dokáže vytvářet vlastní cévní systém pro přísun kyslíku a živin, tento proces je označován jako angiogeneze. V určité fázi vývoje se mohou nádorové buňky přemístit prostřednictvím cévního systému na jiné místo, kde vytváří sekundární nádory neboli metastáze (Hanahan & Weinberg, 2000). Získání těchto vlastností je umožněno nestabilitou genomu, která umožňuje vznik nových mutací, a vznikem zánětlivého stavu vyvolaného buňkami imunitního systému, které podporují progresi nádoru. Imunitní systém se zároveň snaží o eliminaci nádorových buněk, ačkoliv ty si nachází stále nové způsoby, jak se eliminaci vyhnout. Poslední oficiálně uznanou obecnou vlastností je schopnost modifikace energetického metabolismu ve prospěch proliferace a růstu (Hanahan & Weinberg, 2011).

2.1.2 Obecná charakteristika cervikálního karcinomu

Děložní hrdlo (cervix uteri) je nejnižší část dělohy tvaru válce, která spojuje dělohu s pochvou. Anatomicky se dělí na horní úsek, tzv. cervikální kanál neboli endocervix a dolní úsek. Dolní úsek ční do dutiny pochvy a je označován jako čípek děložní nebo exocervix (viz. Obr. 1) (Čihák, 2013; <https://www.cancer.org/>). Sliznice cervikálního kanálu je tvořena epitelem jednovrstevným cylindrickým, jehož buňky produkují hlen, a sliznice děložního čípku epitelem vícevrstevným dlaždicovým nerohovějícím. Místo, kde dochází k přechodu epitelů, se nazývá transformační zóna (Vajner *et al.*, 2017).



Obr. 1: Vnitřní ženské pohlavní orgány. (převzato a upraveno z <https://thebiologynotes.com/diseases-and-disorders-of-the-female-reproductive-system/>)

Právě transformační zóna je považována za nejrizikovější místo pro vznik prekancerózy, což mohou být dysplazie cervixu nebo karcinom in situ (Small *et al.*, 2017; Vorlíček *et al.*, 2010). Dysplazie zahrnují změny morfologie a uspořádání jednotlivých buněk v celkově nezměněné tkáni. Naopak karcinom in situ představuje poslední stádium, kdy jednotlivé buňky ještě nepronikají přes bazální membránu tkáně a nedochází tak k invazivnímu růstu. Souhrnně jsou tyto prekancerózy označovány jako cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN) a jsou rozděleny do 3 stupňů podle závažnosti. Nejlehčí formou je lehká dysplazie s pozorovatelnými změnami v dolní třetině epitelu (CIN 1). Rozšíření změn do dvou třetin epitelu je už považováno za CIN 2 neboli střední dysplazii, přičemž progresse do tohoto stádia je mnohem rychlejší. Ve finálním stádiu (CIN 3) se již jedná o těžkou dysplazii nebo karcinom in situ se ztrátou vrstev, aneuploidií jader, atypickými mitózami a nediferencovaným epitelem (Vorlíček *et al.*, 2010; Roztočil *et al.*, 2011, <https://www.cancer.org/>).

Karcinom děložního hrdla se může rozvinout buď na povrchu hrdla (exocervikální forma), čímž vzniká tzv. spinocelulární karcinom (SCC), nebo v cervikálním kanále (endocervikální forma), kde poté vzniká adenokarcinom (AC). Spinocelulární karcinom je nejčastější formou a objevuje se v 90 % případů. Zbýlých 10 % případů představují adenokarcinomy a další vzácné typy jako třeba maligní melanom nebo smíšený mezenchymální nádor. Adenokarcinomy jsou paradoxně více nebezpečné, jelikož mohou dlouhá léta existovat absolutně bez příznaků a prorůstat do okolních tkání (Vorlíček *et al.*, 2010; <https://www.cancer.org/>). Některé zdroje uvádí odlišný poměr mezi formami karcinomu, a to 70 % SCC a přibližně 15-20 % AC, což je přisuzováno obecně zvýšenému výskytu AC a pokroku v rámci včasné diagnostiky SCC (Watson *et al.*, 2008; Roztočil *et al.*, 2011).

Podle Mezinárodní federace gynekologie a porodnictví (FIGO) lze cervikální karcinom rozdělit do 4-5 hlavních klinických stádií podle velikosti léze a míry šíření do okolních tkání (Tab. 1) (Jauniaux, 2018). Mezi nejčastější příznaky cervikálního karcinomu patří vodnatý až krvavý výtok, nepravidelné krvácení z dělohy mimo menstruační cyklus a krvácení po pohlavním styku. Bolesti v podbříšku a urologické komplikace jsou již známkou pokročilejší stádia onemocnění (Vorlíček *et al.*, 2010; Roztočil *et al.*, 2011).

Tab. 1: Hlavní klinická stádia cervikálního karcinomu podle FIGO (Bhatla *et al.*, 2019)

Stádium	Popis stádia
I	Léze pouze na děložním hrdle
II	Rozšíření léze do dvou třetin pochvy
III	Rozšíření léze do spodní třetiny pochvy, do pánevní stěny, postižení pánevních nebo paraaortálních uzlin, možné poškození ledvin
IV	Postižení pánve, rozšíření do močového měchýře a konečníku, možné metastázování do vzdálených orgánů

2.1.3 Původce cervikálního karcinomu

Nejrizikovějším faktorem pro vznik cervikálního karcinomu je infekce lidskými papilomaviry (HPV, Human Papillomavirus), jejichž DNA byla odhalena v 95 % případů cervikálního karcinomu (Muñoz *et al.*, 2003). Četnost výskytu HPV mezi muži a ženami je rovnocenná a jedná se tak o nejběžněji sexuálně přenosnou chorobu. Zajímavostí je, že se během svého života údajně s HPV setká až 80 % všech sexuálně aktivních žen (Roztočil *et*

al., 2011). Podle nejnovějších zdrojů bylo doposud identifikováno přes 150 různých HPV infikující člověka, z nichž asi 40 způsobuje infekci genitálního traktu. Kromě cervikálního karcinomu mohou způsobovat také anogenitální (v oblasti řitního otvoru a zevních genitálií) a orofaryngeální nádory (oblast dutiny ústní a hltanu) (IARC, 2007; <https://nyulangone.org/>). U mužů může HPV infekce způsobovat léze na penisu, v uretře, močovém měchýři, prostatě a nadvarleti (Roztočil *et al.*, 2011).

Lidské papilomaviry jsou malé neobalené viry s dvouvláknovou DNA řazené do čeledi *Papillomaviridae*. Čeleď *Papillomaviridae* se dále člení na 16 rodů, z nichž v rodu *Alphapapillomavirus* nalezneme typy způsobující slizniční nádory a v rodu *Betapapillomavirus* typy způsobující nádory kožní. Z tohoto rozdělení tedy vyplývá, že do svého hostitele pronikají skrz bazální epiteliální buňky kůže a sliznic v místě mikroskopického poranění nebo právě v transformační zóně (Bouvard *et al.*, 2009; IARC, 2007).

Genom HPV se skládá z 8 čtecích rámců (ORF) a je rozdělen na 3 oblasti podle proteinů, které kódují. Oblast časně se replikujících genů (E – early region) obsahuje geny E1, E2, E4, E5, E6 a E7, jejichž produkty jsou důležité pro expresi virového genomu, replikaci a přežití viru. Oblast pozdně se replikujících genů (L – late region) kóduje hlavní (L1) a vedlejší (L2) kapsidový protein. Dlouhá kontrolní oblast (LCR – long control region) je nekódující a zajišťuje regulaci exprese a replikace virového genomu. Jelikož je gen L1 nejvíce konzervovaný v celém genomu, je používán pro fylogenetické zařazení jednotlivých typů HPV do příslušných rodů (Bouvard *et al.*, 2009; de Villiers *et al.*, 2004; Fehrman & Laimins, 2003; Tommasino, 2014).

Alphapapillomaviry jsou na základě onkogenního potenciálu rozděleny na vysoce rizikové typy (high-risk, HR - HPV), které jsou spojovány právě s cervikálním karcinomem a dalšími anogenitálními tumory, a nízko rizikové (low-risk, HL - HPV), které způsobují genitální bradavice a nezhoubné nádory (Tommasino, 2014; zur Hausen, 2002). Mezi HR-HPV jsou řazeny typy 16 a 18, které byly již v roce 1995 klasifikovány jako cervikální karcinogeny a jejichž přítomnost je nejčastěji potvrzena v případech cervikálního karcinomu. Později byly mezi HR - HPV přidány také typy 31, 33, 51, 56, 66, 18, 39, 45, 59, 35, 52 a 58 (Bouvard *et al.*, 2009). Muñoz *et al.*, 2003 testovali 2506 případů cervikálního karcinomu, kde u 58,9 % byla potvrzena přítomnost HPV 16 a u 15 % HPV 18.

Mezi další faktory, které zvyšují pravděpodobnost infekce HPV a možného vzniku cervikálního karcinomu, patří časný počátek sexuálního života, sexuální promiskuita, vysoký počet porodů a potratů, první porod ve velmi mladém věku, kouření cigaret, užívání drog a orální antikoncepce, dále také současná infekce virem herpes simplex typu 2 a virem lidské imunodeficiencie (Small *et al.*, 2017; Waggoner & Chernicky, 2004; Vorlíček *et al.*, 2010). Nicméně byly také potvrzeny případy cervikálního adenokarcinomu, jejichž příčinou nebyla infekce HR - HPV, ale přítomnost zárodečných mutací BRCA1 a MSH2 (Hereditární karcinom prsu a ovaria, Lynchův syndrom) (Carnevali *et al.*, 2020).

2.1.4 Prevence vzniku cervikálního karcinomu

V současnosti prevence před infekcí HPV a potenciálním vznikem cervikálního karcinomu stojí na dvou základních prvcích. Jako primární prvek je označována vakcinace proti HPV a sekundární prvek pak preventivní pravidelný screening a léčba prekancerózních stavů (Bhatla *et al.*, 2018). Nicméně jako základní prvek ochrany před pohlavně přenosnými chorobami je široce doporučováno používání prezervativů, které v této situaci poskytují jen částečnou ochranu, jelikož buňky nakažené virem se mohou vyskytovat také na zevních genitálech (zur Hausen, 2002).

Aktuálně jsou v mnoha zemích dostupné 3 různé rekombinantní vakcíny schválené agenturou FDA (Food and Drug Administration – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, USA) pro použití u mužů i žen, respektive dívek a chlapců (Tab. 2). Všechny zmíněné vakcíny by měly poskytovat ochranu před vysoce rizikovými typy HPV 16 a 18 a obě vakcíny Gardasil chrání také před typy 6 a 11, které způsobují anogenitální bradavice. Navíc nonavalentní vakcína Gardasil 9 poskytuje ochranu proti pěti dalším onkogenním typům HPV. Je doporučováno provádět vakcinaci u dívek a chlapců v rozmezí od 9 do 14 let, ideálně před začátkem sexuálního života. V České republice je podání do 13 let věku alespoň částečně hrazeno zdravotními pojišťovkami. Ačkoliv jsou vyvinuty účinné vakcíny, je třeba nezapomínat, že nenahrazují pravidelný preventivní screening (<https://www.who.int/>; <https://ockovaniprotihipv.cz/>; <https://www.cervarix.cz/>).

Tab. 2: Schválené vakcíny a příslušné typy HPV, před kterými poskytují ochranu (<https://www.zpmvcr.cz/>)

HPV vakcína	Ochrana před typy HPV
Cervarix	16, 18
Gardasil	6, 11, 16, 18
Gardasil 9	6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58

Strategie preventivního screeningu karcinomu děložního hrdla se v různých zemích velice liší. V České republice je prováděn v rámci pravidelných gynekologických prohlídek a skládá se z kolposkopie, kdy se pomocí zvětšovací skel prohlédne děložní hrdlo, a následného stěru buněk z děložního hrdla, které jsou vyšetřeny metodami klasické cytologie (<https://www.zpmvcr.cz/>). Kromě těchto metod se obecně používá také cytologie na tekuté bázi, HPV testování pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a vizuální kontrola pomocí kyseliny octové a Lugolova roztoku (Sankaranarayanan, 2014). Problémové jsou země s nízkými a středně nízkými příjmy, které mají často chabé screeningové programy, a z tohoto důvodu je u nich incidence cervikálního karcinomu vyšší (zur Hausen, 2002).

2.1.5 Buněčné linie odvozené z cervikálního karcinomu

Nádorové buněčné linie jsou vzorky buněk odebrané z různých typů nádorů kultivované *in vitro* v komerčních kultivačních médiích (Masters, 2000). Dnes se nachází v laboratořích celého světa a své uplatnění nachází ve výzkumech molekulární a buněčné biologie, nádorové biologie, medicíny a farmakologie (Lyapun *et al.*, 2019).

První úspěšně stabilizovanou imortalizovanou lidskou buněčnou linií byla buněčná linie HeLa, která vznikla odebráním buněk z karcinomu děložního hrdla 30-ti leté Henrietty Lacksové v roce 1951, po níž je tato linie pojmenována. Ačkoliv pacientka obdržela radiologickou léčbu, přibližně po 7 měsících od potvrzení diagnózy zemřela. Nádor Henrietty Lacksové byl nejprve diagnostikován jako spinocelulární karcinom, nicméně při pozdějším přezkoumání bylo odhaleno, že se jednalo o vysoce agresivní adenokarcinom (Lucey *et al.*, 2009). Bylo potvrzeno, že buněčná linie HeLa obsahuje DNA HPV 18 a dochází u ní k nízké expresi proteinu p53 (Meissner, 1999; <https://www.atcc.org/>). Buněčná linie HeLa by měla být snadno kultivovatelná, jelikož se dělí extrémně rychle, skoro dvakrát rychleji ve srovnání s buňkami z normální tkáň, dokonce i v porovnání s jinými nádorovými liniemi, což je způsobeno vysokou aktivitou enzymu telomerázy. Díky poměrně univerzální sadě receptorů na svém buněčném povrchu umožňují studium účinků různých cytokinů (Lyapun *et al.*, 2019). Buňky HeLa mají ve svém jádře 70-90 chromozomů s četnými mutacemi ve srovnání s původním karyotypem Henrietty Lacksové, který měl standartních 46 chromozomů. Množí se proto dotazy, zda se stále jedná o lidský genom (Heng, 2013). Frattini *et al.*, 2015 testovali různé šarže buněčné linie HeLa a zjistili, že díky vzniklým mutacím neexistuje ani jedna šarže, která by měla stejný genomický profil, což

může způsobovat rozdílné výsledky experimentů. Nicméně přínos buněčné linie HeLa pro vědu je nedocenitelný.

Kromě buněčné linie HeLa existují i další méně používané buněčné linie odvozené z karcinomu děložního hrdla SiHa a CaSki. Linie SiHa je model spinocelulárního karcinomu druhého klinického stádia získaný od 55-leté ženy asijského původu obsahující DNA HPV 16 a exprimující jak protein p53, tak pRb. Linie CaSki je model spinocelulárního karcinomu s metastazováním do mesenteria tenkého střeva získaný od 40-leté ženy z Kavkazu obsahující také DNA HPV 16 (Friedl *et al.*, 1970; Meissner, 1999; Pattillo *et al.*, 1977; <https://www.atcc.org/>).

2.1.6 Metody léčby cervikálního karcinomu

Cervikální karcinom je možné léčit chirurgickým postupem, radioterapií či chemoterapií, přičemž jednotlivé metody lze kombinovat. Léčebný postup je vždy volen podle klinického stádia onemocnění a preferencí pacientky na zachování plodnosti. Méně radikální metody pro zachování plodnosti jsou možné pouze při zachycení nemoci v časném stádiu (Bhatla *et al.*, 2018; Koh *et al.*, 2015). Šance na pětileté přežití od odhalení diagnózy u časného stádia je téměř 92 %, u stádia s rozšířením do lymfatických cév 58 % a u metastazujících stádií pouze 17 % (<https://seer.cancer.gov/>).

Pro časná stádia onemocnění je doporučováno chirurgické odstranění metodou cervikální konizace nebo celkové jednoduché hysterektomie pro mladší pacientky a radikální hysterektomie pro pacientky starší. U pokročilejších stádií onemocnění je nejvíce indikována radioterapie či chemoradioterapie, kdy se tradičně využívá zevního ozáření a brachyterapie, což je metoda zavedení radioaktivních zrn do místa nádoru (Bhatla *et al.*, 2018; Haie-Meder *et al.*, 2010). Jsou také vyvíjeny nové metody obrazově vedené adaptivní brachyterapie, které umožňují zacílení větší dávky záření do místa nádoru a lepší ochranu okolních orgánů před zářením (Fokdal *et al.*, 2016).

2.1.7 Nejčastěji používaná léčiva

Nejčastěji používaná léčiva pro léčbu cervikálního karcinomu jsou cisplatina, paclitaxel, bevacizumab a topotecan (Koh *et al.*, 2015). Cisplatina je jedno z nejvíce používaných chemoterapeutik pro léčbu široké škály nádorů. Její objev byl velkým milníkem pro možnost využití látek na bázi kovů v léčbě rakoviny. Protinádorový účinek cisplatiny je komplexní a

spočívá ve vyvolání buněčné smrti ovlivněním více jednotlivých intracelulárních drah (Florea & Büsselberg, 2011). Cisplatina například interakcí s DNA způsobuje její poškození, brání syntéze DNA, indukuje oxidativní stres v buňkách, ovlivňuje dráhu proteinu p53 a tak dále. I přes své pozitivní účinky je cisplatina zvláště při vysokých dávkách poměrně toxická a má mnoho vedlejších účinků. Z tohoto důvodu jsou vyvíjeny různé vhodnější platinové analogy jako například karboplatina nebo oxaliplatin (Dasari & Tchounwou, 2014).

Paclitaxel, jiným názvem Taxol, je jedno z nejúspěšnějších protinádorových léčiv přírodního původu. Je to tricyklický diterpenoid získávaný z kůry a jehličí tisu západoamerického (*Taxus brevifolia*) (Wani *et al.*, 1971; Zhu & Chen, 2019). Protinádorový účinek paclitaxelu je unikátní a spočívá v podpoře polymerizace mikrotubulů a zábraně jejich disociace, čímž je znemožněn přechod do další fáze buněčného cyklu (Weaver, 2014). Své využití nachází i v léčbě dalších nádorových i nenádorových onemocnění (Chen & Shi, 2016; D. Zhang *et al.*, 2014).

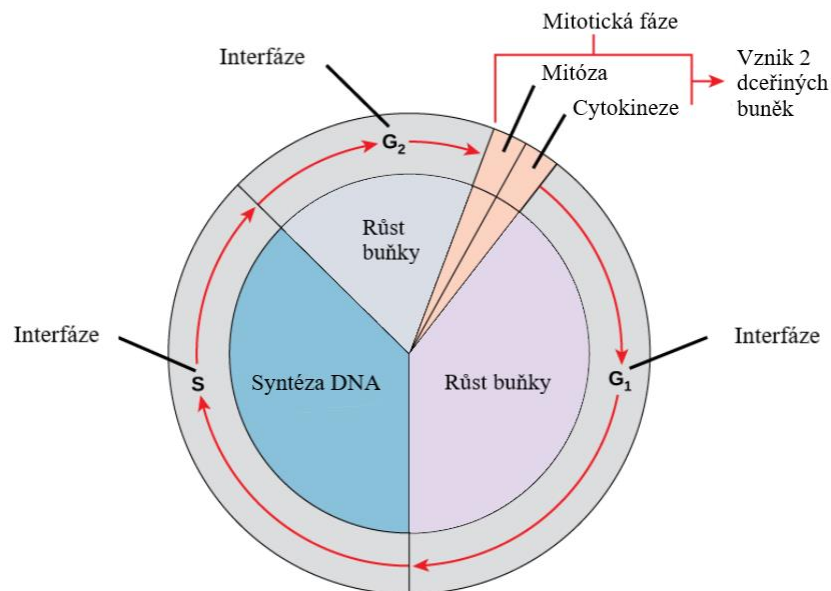
Bevacizumab, obchodním názvem Avastin, je humanizovaná monoklonální protilátka, která se váže na vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF-A), který podporuje tvorbu nových krevních cév (angiogeneze) a endotelových buněk. Dále brání apoptóze endoteliálních buněk, zvyšuje permeabilitu cév a uplatňuje se i při zánětech. Neutralizací VEGF-A je znemožněna vazba na receptor VEGF-R, čímž je mimo jiné inhibována angiogeneze. Jednotlivé funkce VEGF-A se různou měrou uplatňují v závislosti na typu nádoru a klinickém stádiu (Ferrara *et al.*, 2004).

Topotecan je semi-syntetický derivát camptothecinu, což je alkaloid, který způsobuje selektivní inhibici DNA topoisomérázy I. Inhibicí DNA topoisomérázy I vznikají dvouvláknové zlomy DNA během replikace, což vede k zastavení buněčného cyklu v S fázi a v konečném důsledku k buněčné smrti. Bylo prokázáno, že topotecan v kombinaci s cisplatinou nebo paclitaxelem u některých buněčných linií zvyšuje jejich cytotoxický efekt pravděpodobně prostřednictvím inhibice oprav DNA (Boabang *et al.*, 2000).

2.2 BUNĚČNÝ CYKLUS

Buněčný cyklus je velmi složitý komplexní proces skládající se z několika fází, jehož výsledkem je vznik dvou geneticky identických dceřiných buněk. Kromě proliferace buněk se buněčný cyklus uplatňuje také při vývoji organismu, regulaci oprav poškození DNA a jako reakce na zranění nebo různé nemoci. Pro správný průběh buněčného cyklu je stěžejní působení regulačních proteinů, a to zejména cyklinů, cyklin-dependentních kináz (CDK), produktů onkogenů a tumorsupresorových genů. Mutace v genech regulačních proteinů či chyby vzniklé při dělení buněk mohou vést ke vzniku různých nádorových i nenádorových onemocnění (Schafer, 1998; Wenzel & Singh, 2018).

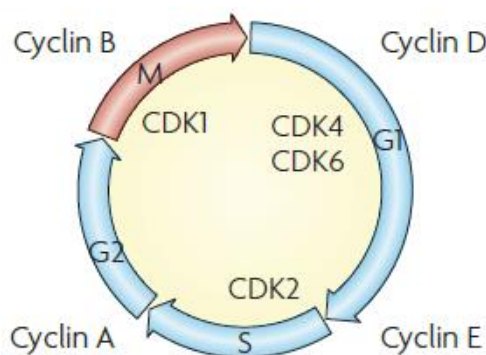
Buněčný cyklus lze rozdělit na 4 hlavní fáze: G_1 , S, G_2 (souhrnně označovány jako interfáze) a M fázi neboli mitózu (viz Obr. 2). Mitóza je dále rozdělena na profázi, prometafázi, metafázi, anafázi a telofázi, po které následuje vlastní rozdělení buňky neboli cytokineze. Fáze G_1 a G_2 jsou přípravné a dochází při nich k růstu buňky a intenzivní syntéze proteinů, RNA a buněčných organel, přičemž v G_1 fázi jsou také syntetizovány nukleotidy a enzymy pro následnou replikaci jaderné DNA, která probíhá v S fázi (syntetické). Rozdílný obsah jaderné DNA v jednotlivých fázích je využíván při analýze buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie (Nečas, 2000; Alberts *et al.*, 2001).



Obr. 2: Schéma buněčného cyklu (převzato a upraveno z: https://cnx.org/contents/GFy_h8cu@9.87:1tJ55Ot6@7/The-Cell-Cycle).

2.2.1 Kontrolní systém buněčného cyklu

V rámci kontrolního systému buněčného cyklu hrají pravděpodobně největší roli cykliny a cyklin-dependentní kinázy (CDK), které spolu v průběhu buněčného cyklu vytváří specifické komplexy. Cyklin-dependentní kinázy patří mezi serin-threoninové protein kinázy, pro jejichž aktivaci je nutné navázání určitého cyklinu a současná fosforylace jinými kinázami (J. Pines, 1995; Zetterberg et al., 1995). Pro CDK je charakteristické, že daná CDK může být aktivní pouze v určité fázi buněčného cyklu, což je zajišťováno systematickou syntézou a degradací jednotlivých cyklinů (Darzynkiewicz *et al.*, 1996). Aktivní komplexy cyklin-CDK fosforylují specifické substráty, čímž umožňují přechod buňky do další fáze cyklu (Wenzel & Singh, 2018).



Obr. 3: Schéma působení jednotlivých cyklinů a CDK v daných fázích buněčného cyklu (převzato a upraveno z: Malumbres & Barbacid, 2009).

Na rozhraních fází G₁/S, G₂/M a metafáze/anafáze se nachází důležité kontrolní body, které zajišťují připravenost buňky pro přechod do další fáze cyklu. Jsou sice označovány jako body, ale jedná se spíše o biochemické reakce specifických proteinů v daný čas (viz Obr. 3). Kontrolní bod G₁/S je někdy označován jako Start, protože v něm je rozhodnuto, zda bude probíhat další dělení nebo zda buňka vstoupí do klidové fáze G₀. V tomto bodě je sledována přítomnost růstových faktorů, poškození DNA, velikost a dostatečná výživa buňky. Na začátku G₁ fáze je aktivní komplex cyklinu D1-CDK 4 nebo D1-CDK 6, které interagují s retinoblastomovým proteinem. Přejít do S fáze a zahájení replikace DNA je ovlivněn aktivitou komplexu cyklin E-CDK 2. Později v S fázi je aktivní také komplex cyklin A-CDK 2. V bodě G₂/M je rozhodující správnost provedené replikace DNA a její možné poškození. Kontrolní bod metafáze/anafáze zodpovídá za správné připojení mitotického vřeténka na chromozomy před jejich segregací. Tento úsek od fáze G₂ až po metafázi je kontrolován komplexem cyklin B-CDK 1. Pokud je v kontrolním bodě

detekováno poškození, dojde k zastavení buněčného cyklu umožňující opravu daných chyb (Morgan, 2007; Murray, 1994; Schafer, 1998; Zetterberg et al., 1995). Jak již bylo zmíněno výše, mezi významné regulátory buněčného cyklu patří také produkty onkogenů a tumorsupresorových genů.

2.2.2 Retinoblastomový protein

Retinoblastomový protein (pRb) je produkt tumorsupresorového genu patřící spolu s proteiny p107 a p130 do rodiny „kapsových“ proteinů. Jejich klíčovou funkcí je regulace průběhu buněčného cyklu. Nicméně bylo zjištěno, že se účastní také dalších dějů jako například definitivní ukončení buněčného cyklu, ochrana před apoptózou, zábrana opětovného vstupu do buněčného cyklu a indukce exprese tkáňově specifických genů (Bartek *et al.*, 1996; Lipinski & Jacks, 1999).

Regulace průběhu buněčného cyklu je zprostředkována interakcí pRb s transkripčními faktory E2F, které ovlivňují transkripci důležitých genů pro průběh fází G₁ a S (např. cykliny E, A, CDK 1, proteiny účastnící se replikace DNA) (Graña *et al.*, 1998). Tato interakce je uskutečňována buď přímou inhibicí pozitivní transkripční aktivity vytvořením komplexu pRb s E2F, nebo zaváděním represivních faktorů do promotorů, které jsou pod kontrolou E2F. V G₁ fázi pRb není fosforylován, tvoří komplex s E2F a je tedy aktivní. V kontrolním bodě G₁/S dochází k fosforylaci pRb komplexem cyklin D1/CDK 4 a cyklin E/CDK 2, která způsobí uvolnění faktorů E2F a represivních faktorů z promotorů, které umožní transkripci genů pro přechod do S fáze (Lipinski & Jacks, 1999; Weinberg, 1995).

Jelikož se jedná o stěžejní prvek obrany proti nekontrolovanému množení buňky, stává se gen pro pRb častým cílem mutací u různých druhů nádorů jako retinoblastomy, sarkomy a malobuněčné karcinomy plic (Horowitz *et al.*, 1990). Rovněž samotný pRb je cílem některých onkogenních DNA virů jako HPV nebo adenovirus (Nevins, 1994). Jedním z genů, jehož transkripce je pod kontrolou E2F, je gen pro protein p53, čímž zde dochází k propojení drah tohoto proteinu s pRb (Hiebert *et al.*, 1995).

2.2.3 Protein p53

Protein p53 je stejně jako pRb produkt tumorsupresorového genu, který má klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu, apoptóze, senescenci, opravách DNA, buněčné diferenciaci a

angiogenezi. Je také označován jako „strážce genomu“ díky schopnosti bránit akumulaci genetických změn (Vogt Sionov & Haupt, 1999).

K aktivaci p53 může dojít v G₁ nebo G₂ fázi vlivem poškození DNA, hypoxie, změny redoxního potenciálu nebo exprese některých onkogenů (Giaccia & Kastan, 1998). Za normálních podmínek se p53 v buňce nachází ve vazbě na protein Mdm2, který reguluje jeho aktivitu a stabilitu (Kubbutat *et al.*, 1997). Stresové faktory vyvolají posttranslační úpravy p53, přesněji fosforylaci a acetylaci, které způsobí uvolnění z vazby na Mdm2 a zvýšení hladin p53 v buňce (Sakaguchi *et al.*, 1998). V G₁ fázi aktivovaný p53 indukuje syntézu proteinu p21, který způsobuje inhibici CDK nutných pro fosforylaci pRb a také váže proliferační jaderný antigen (PCNA), což je důležitý prvek aktivace DNA polymerázy pro následnou replikaci (Hengstschläger *et al.*, 1999; Waga *et al.*, 1994). V G₂ fázi p53 spouští transkripci genů 14-3-3 σ a GADD45, jejichž produkty inhibují aktivitu CDK pro přechod do mitózy (Peng *et al.*, 1997; X. W. Wang *et al.*, 1999).

Zastavení buněčného cyklu umožňuje buňce provést nezbytné opravy. Pokud nejsou vzniklé chyby opraveny, p53 indukuje transkripci různých specifických genů, které nastartují proces buněčné smrti (Vogt Sionov & Haupt, 1999). Gen pro p53 je častým cílem mutací u nádorových onemocnění. U více než poloviny typů lidských nádorů jsou nalezeny mutace v tomto genu (Greenblatt *et al.*, 1994). Stejně jako pRb i p53 interaguje s některými onkogenními viry jako HPV nebo adenovirus, které indukují jeho degradaci (Moran, 1993; Scheffner, 1998).

2.2.4 Změny v buněčném cyklu u nádorových buněk

Pro nádorové buňky je typická přítomnost mutací v genech, jejichž produkty ovlivňují průběh buněčného cyklu. Mutace tak způsobí ztráty kontrolních bodů, čímž je umožněn přechod do další fáze cyklu bez řádné kontroly poškození a chyb, které mohou být následně přenášeny do další generace. Kromě změn v onkogenech a tumorsupresorových genech může docházet ke změnám v aktivitě cyklinů a CDK. Častým jevem je zvýšená exprese CDK 4 a 6, cyklinu E a D, které ovlivňují důležitý kontrolní bod G₁/S (Malumbres & Barbacid, 2001; Morgan, 2007; Ortega *et al.*, 2002).

2.3 APOPTÓZA

Apoptóza je nezbytný proces k zajištění rovnováhy mezi vznikem a zánikem buněk. Hraje nesmírně důležitou roli při embryonálním vývoji a obnově tkání a naopak porušení její funkce může přispívat ke vzniku různých nádorových i nenádorových onemocnění. Je označována také jako programovaná buněčná smrt, jelikož je její průběh přísně kontrolován (Kerr, 2002; Obeng, 2021).

Apoptózu může vyvolat řada vnějších a vnitřních stimulů jako například poškození DNA, nekontrolovaná proliferace nebo buněčný stres (Lopez & Tait, 2015). Tyto faktory spouští řadu reakcí, kterých se účastní proteiny z rodiny kaspáz a z rodiny Bcl-2. Kaspázy jsou vysoce specifické cystein-dependentní endoproteázy, které způsobují hydrolýzu peptidové vazby. V buňce jsou produkovány jako neaktivní prekurzory (pro-kaspázy neboli zymogeny) a pro jejich aktivaci musí dojít k dimerizaci a jejich štěpení. V lidských buňkách bylo identifikováno 14 různých kaspáz, které byly rozděleny do 3 skupin podle funkcí. Iniciační kaspázy (kaspáza 8 a 9) zahajují proteolytické štěpení efektorových kaspáz (kaspáza 3, 6 a 7), které dále štěpí většinu konečných substrátů při apoptóze. Kaspázy 1, 4, 5 a 12 hrají roli při zánětu (Eckhart *et al.*, 2008; McIlwain *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2008).

Rodina Bcl-2 (podle B-buněčného lymfomu) zahrnuje proteiny, které svým účinkem apoptózu jednak podporují (Bax a Bak), tak také blokuje (Bcl-2 a Bcl-XL). Svého účinku dosahují díky schopnosti regulovat uvolňování cytochromu c z mitochondrií. Oddělená podrodina je tvořena proteiny, které apoptózu podporují pouze, pokud jsou nadměrně exprimovány. Zde jsou mimo jiné zařazeny proteiny Noxa, Puma a Bid, jejichž transkripce je řízena proteinem p53 (Taylor *et al.*, 2008).

Podle Grilo & Mantalaris (2019) existuje až 5 různých drah aktivace apoptózy, z nichž 3 jsou méně známé. Jedná se o dráhy závislé buď na přítomnosti granzymu A, nebo granzymu B, což jsou serinové proteázy produkované cytotoxickými T-lymfocyty a NK buňkami, a p53 řízenou aktivaci kaspázy 2 jako odpověď na poškození DNA (Orrenius *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2008; Vakifahmetoglu-Norberg & Zhivotovsky, 2010).

Hlavními a nejznámějšími dráhami apoptózy jsou vnější receptorová a vnitřní mitochondriální dráha. Vnější receptorová dráha je spouštěna navázáním ligandů smrti (Fas-L nebo TNF α) na receptory smrti v cytoplasmatické membráně, což vyvolá uvnitř buňky aktivaci kaspázy 8 a 10. Ty následně aktivují efektorové kaspázy 3 a 7, které indukují

buněčnou smrt (Taylor *et al.*, 2008; Wajant, 2002). Vnitřní mitochondriální dráha může být aktivována mnoha podněty, které by se daly souhrnně označit jako buněčný stres. Stres uvnitř buňky aktivuje proteiny Bax a Bak, které vytvoří póry ve vnější mitochondriální membráně, přes které se do cytosolu uvolní cytochrom c. Cytochrom c spolu s Apaf1 (faktor aktivující apoptotickou proteázu) a kaspázou 9 vytvoří komplex zvaný apoptozom. Takto aktivovaná kaspáza 9 dále aktivuje efektorové kaspázy 3 a 7, které opět indukují buněčnou smrt (Brenner & Mak, 2009; Ichim & Tait, 2016; Taylor *et al.*, 2008).

Kromě apoptózy existují ještě 2 další formy buněčné smrti. Autofagie spočívá v pohlcení a degradaci buněčného materiálu uvnitř lyzozomu a nekróza v prasknutí plazmatické membrány a vylití buněčného obsahu do okolí, které způsobí tvorbu zánětu (Weinlich *et al.*, 2017; Yang & Klionsky, 2010).

2.3.1 Kaspáza 7

Kaspáza 7 patří společně s kaspázou 3 do skupiny efektorových kaspáz, které se účastní jak vnější, tak vnitřní dráhy apoptózy. Neaktivní pro-kaspáza 7 se v cytosolu nachází jako polypeptidový řetězec o délce 303 aminokyselin (AMK) složený z N- a C-koncové subdomény spojené flexibilním linkerem. Po aktivaci dochází k rozštěpení na delší řetězec o délce 175 AMK a kratší o délce 105 AMK tvořící aktivní kaspázu (Riedl *et al.*, 2001). Aktivní kaspáza 7 štěpí soubor substrátů, což se projeví kondenzací chromatinu, fragmentací DNA, prasknutím jádra a uzavřením částí buněk do tzv. apoptotických tělísek, které jsou následně fagocytovány a degradovány (Elmore, 2007). U některých případů karcinomu tlustého střeva, jícnu a hlavy/krku byly v genu pro kaspázu 7 nalezeny inaktivační mutace (Soung *et al.*, 2003).

2.3.2 PARP-1

Poly (ADP-ribóza) polymeráza-1 neboli zkráceně PARP-1 je jaderný enzym účastnící se oprav DNA. Jeho úlohou je katalyzovat syntézu poly (ADP-ribózy) z NAD⁺ (nikotinamidadeninukleotid), která je následně kovalentně připojena k cílovým proteinům interagujícím s DNA jako například histony nebo samotný PARP-1. Tento proces je označován jako parylace a je bezprostřední reakcí na poškození DNA způsobené oxidací, alkyací nebo ionizujícím zářením. Pokud PARP-1 zaznamená poškození DNA (např. jednořetězcový či dvouřetězcový zlom), zvýší se až 500x jeho enzymatická aktivita a indukuje opravné procesy. Naopak, pokud je detekované poškození DNA příliš velké, může

PARP-1 indukovat buněčnou smrt. V průběhu apoptózy je však PARP-1 inaktivován rozštěpením kaspázou 3 a 7, aby byla umožněna fragmentace DNA (D'Amours *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2005; A. Pines *et al.*, 2013; Satoh & Lindahl, 1992; Soldani *et al.*, 2001).

2.4 OXYSTEROLY

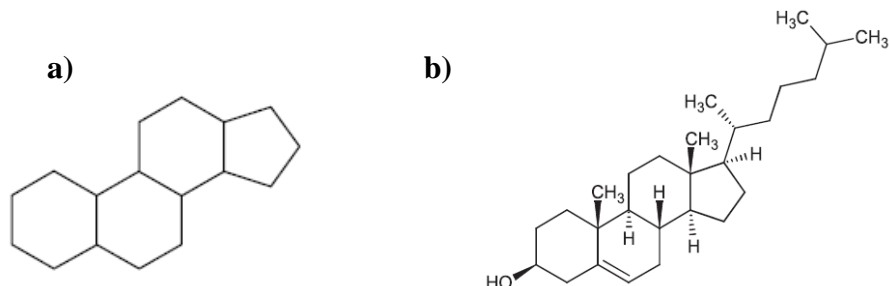
Oxysteroly jsou skupina látek vznikající oxidací molekuly cholesterolu. Jedná se o deriváty obsahující hydroxy-, keto-, hydroperoxy-, epoxy- nebo karboxylové skupiny, u nichž byly prokázány mnohé biologické vlastnosti včetně cytotoxické a proapoptotické aktivity (Olkkonen *et al.*, 2012). První zmínky o oxidovaných sterolech, které se v buněčných kulturách chovají jako inhibitory biosyntézy sterolů, se objevily v 70. letech 20. století (Kandutsch *et al.*, 1978). Rané studie popisovaly snížení syntézy sterolů u fibroblastových buněk po přidání séra, sérových lipidů nebo některých vybraných sterolů do kultivačního média (Avigan *et al.*, 1970; Rothblat & Buchko, 1971). Předpokládalo se, že cholesterol reguluje zpětnovazebně svou vlastní syntézu. Nicméně inhibiční aktivita byla potvrzena u stopových množství oxidovaných sterolů odvozených od cholesterolu, z nichž některé běžně vznikají v buňce a plní zde svou fyziologickou funkci. Inhibiční aktivita oxidovaných sterolů spočívá v ovlivnění aktivity enzymu 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A (HMG-CoA) reduktázy, která reguluje syntézu cholesterolu. Cholesterol je základní složkou buněčné membrány a je tak klíčový pro proces buněčného dělení. Na základě těchto informací byla vyslovena pravděpodobně jedna z prvních hypotéz, že oxidované steroly by díky svým specifickým vlastnostem mohly nalézt využití v kontrole buněčného dělení, které probíhá abnormální rychlostí (Kandutsch *et al.*, 1978; Kandutsch & Chen, 1978).

2.4.1 Členění steroidních látek

Mezi steroidní látky jsou řazeny jak látky přirozeně se vyskytující, tak látky syntetické, které našly své uplatnění jako terapeutická činidla. Základní molekulou steroidních látek je cyklopentanoperhydrofenanthren neboli steran, jehož struktura je znázorněna na Obr. 4. U přírodních steroidů se téměř vždy nachází jedna nebo dvě methylové skupiny navázané na uhlíkovém skeletu. Podle počtu uhlíkových atomů rozlišujeme tyto prekurzory steroidů: gonan (C₁₇), estran (C₁₈), androstan (C₁₉), pregnan (C₂₁), cholan (C₂₄) a cholestan (C₂₇). Podle funkce se steroidy dělí na steroly, žlučové kyseliny (ŽK), srdeční steroidy a steroidní hormony, které se dále dělí na androgeny, kortikoidy, estrogeny, progesteron a vitamín D a jeho metabolity (Shimada *et al.*, 2001; Makin & Gower, 2010; Koolman & Röhm, 2012).

Steroidní alkoholy neboli steroly jsou látky, pro které je charakteristická přítomnost hydroxylové skupiny v poloze β na třetím uhlíkovém atomu. Steroly rostlinného původu jsou označovány jako fytosteroly a jsou důležitou složkou membrán rostlinných buněk a

uplatňují se u rostlin také jako přirozené insekticidy a růstové hormony. Fytosteroly digoxin a digitoxin patří do skupiny tzv. srdečních glykosidů a jsou využívány pro léčbu srdečních chorob. Cholesterol je nejvýznamnějším zástupcem živočišných sterolů (viz Obr. 4). Tvoří nepostradatelnou složku buněčných membrán a je také prekurzorem pro syntézu mnoha dalších steroidních látek (Shimada *et al.*, 2001; Koolman & Röhm, 2012).



Obr. 4: Chemická struktura a) steranu, b) cholesterolu.

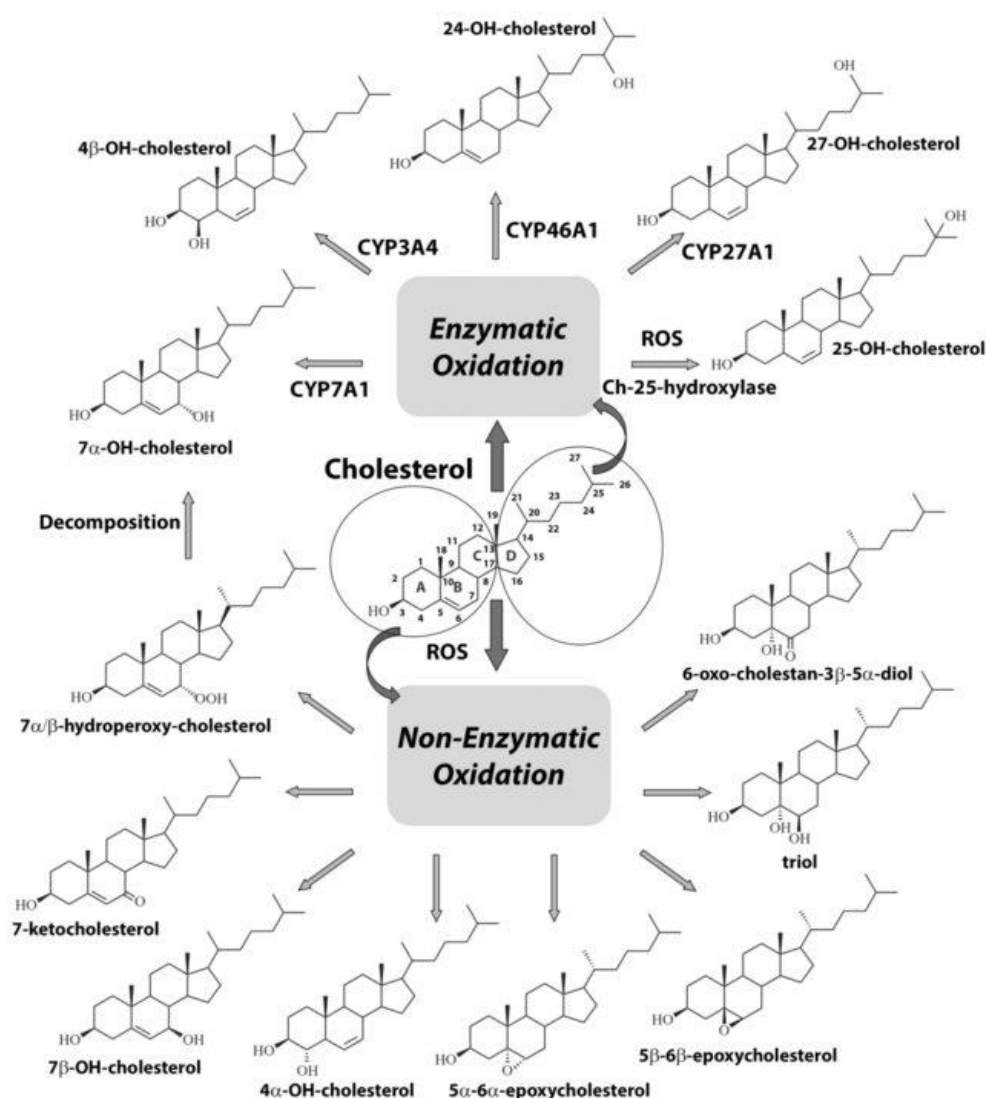
Jednou skupinou látek odvozených od cholesterolu jsou právě ŽK, což jsou nasycené karboxylové kyseliny o délce nejčastěji 24 uhlíkových atomů, které mají velký podíl na trávení lipidů z potravy. Podle způsobu vzniku se dělí na primární a sekundární. Primární ŽK vznikají enzymatickými úpravami cholesterolu v játrech. Ve střevě jsou pak primární ŽK přeměňovány na sekundární činností mikroorganismů (Shimada *et al.*, 2001; Koolman & Röhm, 2012).

2.4.2 Biosyntéza oxysterolů

V lidském organismu existují dvě cesty biosyntézy oxysterolů (viz Obr. 5). První cesta zahrnuje enzymatickou oxidaci cholesterolu, zatímco druhá cesta spočívá v oxidaci cholesterolu bez účasti enzymů (Jessup & Brown, 2005). Při enzymatické oxidaci dochází ve většině případů k oxidaci postranního řetězce cholesterolu za katalýzy cholesterolhydroxylázami z mitochondrií nebo endoplazmatického retikula, které patří do rodiny cytochromu P450 (Luoma, 2007; Schroepfer, 2000). Mnoho oxysterolů vznikajících enzymatickou cestou se účastní biosyntézy ŽK a steroidních hormonů a také fungují jako signální molekuly regulující biosyntézu samotného cholesterolu, buněčnou cirkulaci a intracelulární transport (Massey, 2006). Mezi nejdůležitější oxysteroly vznikající enzymaticky patří například 7 α -hydroxycholesterol, 27-hydroxycholesterol, 24S-hydroxycholesterol a 4 β -hydroxycholesterol (Luoma, 2007).

Neenzymatická oxidace cholesterolu je způsobena činností reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) nebo syntázy oxidu dusnatého, které nejčastěji interagují se sterolovým

kruhem (Iuliano, 2011; Ryan *et al.*, 2005). Radikál po napadnutí molekuly cholesterolu způsobí přerušení vazby mezi uhlíkem a vodíkem v poloze 7 a následné uvolnění vodíku. Po reakci s kyslíkem vzniká cholesterolový peroxidradikál, čímž je spouštěna řetězová reakce končící vznikem hydroperoxidů cholesterolu. Ty mohou za příznivých podmínek dále neenzymaticky reagovat za vzniku stabilnějších hydroxyproduktů, tedy oxysterolů (Brown & Jessup, 2009). Oxysteroly vznikající tímto způsobem vykazují významné cytotoxické a proapoptotické vlastnosti (Lordan *et al.*, 2009). Ze skupiny neenzymaticky vznikajících oxysterolů se ve tkáních nejvíce objevují $7\alpha/\beta$ -hydroxycholesterol a 7-ketocholesterol (Brown & Jessup, 1999). U některých oxysterolů byly zaznamenány dokonce obě možné cesty biosyntézy. Jedná se o 25-hydroxycholesterol a 7α -hydroxycholesterol (Brown & Jessup, 2009).



Obr. 5: Cesty biosyntézy oxysterolů včetně struktur nejvýznamnějších zástupců pro jednotlivé cesty (Samadi *et al.*, 2021).

2.4.3 Biologické funkce oxysterolů

Oxysteroly se v lidském organismu nachází v poměrně velmi nízkých koncentracích v porovnání například s cholesterolem, i přesto se ale podílí na mnoha důležitých fyziologických procesech. Jsou proto nově označovány také jako bioaktivní lipidy. Jejich aktivity by se daly rozdělit dle chování v buňkách na ovlivnění dynamiky membrán, interakce s proteiny a vazba na jaderné receptory (De Boussac *et al.*, 2013; Guillemot-Legris *et al.*, 2016). Těmito mechanismy se oxysteroly zapojují do procesu apoptózy, syntézy ŽK a steroidních hormonů, regulace homeostázy cholesterolu, transkripční kontroly metabolismu, buněčné signalizace, vývoje a diferenciací, zánětlivých procesů a fungování imunity (Olkkonen *et al.*, 2012).

Oxysteroly jako součásti buněčných membrán mohou provádět modifikace jejich vlastností, což představuje jeden z aspektů cytotoxických vlastností (Olkkonen & Hynynen, 2009). Nicméně největší roli zde hraje schopnost oxysterolů indukovat apoptózu a to jak vnitřní, tak vnější cestou. Nelze ale stanovit přesný mechanismus indukce, jelikož zvolená cesta se odvíjí podle daného derivátu (Lordan *et al.*, 2009). Podle Meynier *et al.* (2005) a Ryan *et al.* (2005) byl největší cytotoxický efekt pozorován u derivátů 7-ketocholesterol (7-KC), 7-hydroxycholesterol a triol. Prunet *et al.* (2005) ve své práci potvrdili, že 7-KC a 7-hydroxycholesterol spouštějí apoptózu aktivací kaspázy 3, ale zároveň mohou indukovat apoptózu také dalšími mechanismy, které jsou na její aktivitě nezávislé. Speciálně 7-KC je schopný podle publikací aktivovat více různých apoptotických drah (Rosa Fernandes *et al.*, 2017). Triol pravděpodobně rovněž aktivuje apoptózu prostřednictvím kaspázy 3, což popisují Silva *et al.* (2017) ve své práci, kde detekovali metodou imunodetekce její významné štěpení.

Regulace homeostázy cholesterolu úzce souvisí s kontrolou exprese genů v metabolismu lipidů. Oxysteroly mohou metabolismus lipidů ovlivňovat interakcemi s jadernými receptory a to konkrétně jaterní X receptor (LXR), orphan receptor související s retinoidy (ROR) a estrogenový receptor (ER), z nichž všechny se podílí na kontrole hladin cholesterolu a homeostázy glukózy. Oxysteroly jsou tak označovány jako senzory a regulátory hladin cholesterolu ve tkáních, zejména v mozku, kde je soustředěna čtvrtina celkového tělesného cholesterolu (Samadi *et al.*, 2021). Jak již bylo řečeno výše, hlavním enzymem metabolismu cholesterolu je HMG-CoA reductáza. Některé deriváty mohou při

vysokých hladinách cholesterolu indukovat zrychlenou degradaci tohoto enzymu, aby bylo zamezeno další syntéze cholesterolu (Sever *et al.*, 2003).

Role oxysterolů v buněčné signalizaci a diferenciaci spočívá ve schopnosti některých derivátů ovlivnit transkripci genu Hedgehog mechanismem interakce s proteiny. Tento gen má velký význam při vývoji embrya a pro správnou funkci a opravu tkání. Narušení jeho dráhy bylo zaznamenáno u vrozených vývojových vad a některých nádorů (Dwyer *et al.*, 2007; Luu *et al.*, 2016; Nachtergaele *et al.*, 2012). Oxysteroly zasahují také do imunitního systému ovlivněním produkce zánětlivých mediátorů a správného fungování cytotoxických lymfocytů, NK buněk a makrofágů (Vejuh & Lizard, 2009). V souvislosti se zánětlivými procesy je studována možná negativní role oxysterolů v ateroskleróze, metabolickém syndromu a dalších onemocněních (Samadi *et al.*, 2021).

V experimentální části práce jsou současně se syntetickými deriváty testovány také cytotoxické vlastnosti přírodních derivátů ketodiolu a triolu. Obě zmíněné látky vznikají v metabolické dráze cholesterolu, přičemž ketodiol vzniká oxidací molekuly triolu (Silvente-Poirot & Poirot, 2012; Voisin *et al.*, 2014). U triolu byly zaznamenány genotoxické vlastnosti, které mohou být způsobeny zvýšenou tvorbou ROS (Cheng *et al.*, 2005). Naproti tomu u ketodiolu byly potvrzeny karcinogenní vlastnosti spojené s nádorem prsu a schopnost ovlivnit fungování imunitního systému inhibicí T lymfocytů a NK buněk (Kucuk *et al.*, 1992; Küçük *et al.*, 1994; Voisin *et al.*, 2017).

2.4.4 Uplatnění oxysterolů v terapii nádorů

Díky svým specifickým biologickým funkcím nachází oxysteroly uplatnění v medicíně a to především v terapii nádorových onemocnění. V současné době je studováno jejich zapojení v hormonální terapii nádorů, chemoterapii a zároveň potenciální uplatnění jako biomarkery úspěšnosti léčby. Existují také málopočetné publikace zmiňující nepřímo možnou roli oxysterolů v imunoterapii a radioterapii (Kloudova-Spalenkova *et al.*, 2021).

Lanterni *et al.* (2016) popisují výrazné zvýšení účinnosti aplikované imunoterapie při současném podávání látky, která blokuje syntézu cholesterolu a oxysterolů. Tavazoie *et al.* (2018) uvádějí, že aktivací LXR byla pozorována zvýšená odpověď CD8⁺ T lymfocytů u pacientů s různými typy nádorů. Oxysteroly by tak mohly být vhodnými kandidáty pro aktivaci tohoto receptoru. Gaffney *et al.* (1991) využili 25-hydroxycholesterol pro inhibici biosyntézy cholesterolu, čímž docílili zvýšené citlivosti k radioterapii.

Oxysteroly mohou přispívat k úspěšnosti hormonální terapie ovlivněním aktivity ER, což je významné především v terapii prsních karcinomů. Testovaný derivát cholesterolu 25-hydroxycholesterol prokázal na modelech nádorů prsu a vaječníku podobný efekt jako běžně aplikovaný 17 β -estradiol (Lappano *et al.*, 2011). Významnou modulaci ER vykazují i další látky ze skupiny oxysterolů jako například 27-hydroxycholesterol a 7-ketocholesterol (DuSell & McDonnell, 2008; C.-W. Wang *et al.*, 2017)

Kromě již zmíněných cytotoxických a proapoptotických vlastností oxysterolů bylo zjištěno, že při současné aplikaci s jiným chemoterapeutikem mohou oxysteroly ovlivňovat cytostatické účinky daného léčiva. Pozorovaný efekt se ale liší podle testovaného derivátu a nádorové buněčné linie. Testování bylo prováděno s doxorubicinem, vincristinem, daunorubicinem a dalšími. Společná inkubace 7-KC buď s daunorubicinem, nebo vincristinem byla testována na dvou liniích myeloidní leukémie, přičemž největší pozorovaný rozdíl byl u daunorubicinu na linii Lucena (Rosa Fernandes *et al.*, 2017; C.-W. Wang *et al.*, 2017).

3. Experimentální část

3.1 Buněčné linie a testované deriváty

V experimentální části byla pro testování antiproliferačních vlastností vybraných derivátů oxysterolů vybrána adherentní buněčná linie HeLa odvozená od lidského cervikálního karcinomu (European Collection of Authenticated Cell Cultures, Velká Británie). Testované látky byly rozpuštěny v DMSO. Buněčná linie byla ovlivněna po dobu 24 hodin testovanými látkami v koncentracích 3 μM , 10 μM a 30 μM .

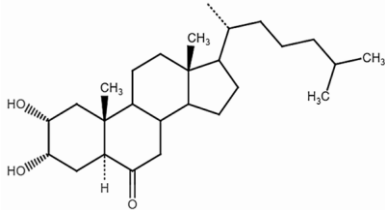
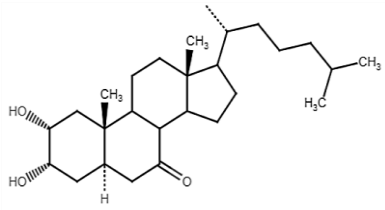
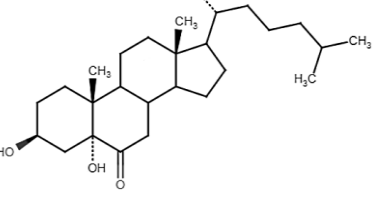
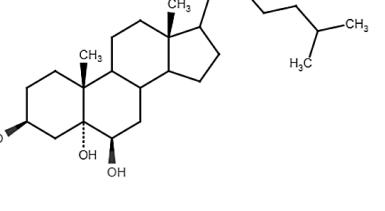
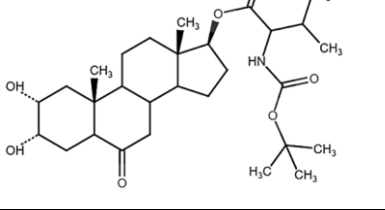
K testování byly použity tyto deriváty oxysterolů (Tab. 3):

- MK 238 (RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D., LRR) – připravena podle Kohout & Strnad (1986)
- MK 238-7 (RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D., LRR) – připravena podle Kohout (1994)
- Ketodiol (RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D., LRR)
- Triol (RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D., LRR)

Pro porovnání účinků testovaných látek byl využit tento standard (Tab. 3):

- MK 349 v koncentraci 10 μM (RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D., LRR)

Tab. 3: Základní informace popisující testované látky: název látky, strukturální vzorec, MW – molekulová hmotnost, ZK – zásobní koncentrace, IC₅₀/72 hod – poloviční inhibiční koncentrace za 72 hod. Hodnoty IC₅₀ byly měřeny laboratoří KEB.

Látka	Vzorec	MW	ZK [mM]	IC ₅₀ /72 hod [μM]
MK 238		418,65	7.5	<50
MK 238-7		418,65	7.5	34,8 ± 0.9
Ketodiol		418,652	10	-
Triol		420	10	-
MK 349		521	7.5	3,3 ± 0.3

3.2 Chemikálie

- Aceton (Lach-Ner, Česká republika)
- Akrylamid (VWR Chemicals, USA)
- Aprotinin (Sigma-Aldrich, USA)
- Bisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA)

- Buthanol (Lach-Ner, Česká republika)
- Coomassie brilliant blue (Sigma-Aldrich, USA)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) (Lachema, Česká republika)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Pancreac Applichem, USA)
- Dithiothreitol (DTT) (Serva, Německo)
- Dodecylsírán sodný (SDS) (Lach-Ner, Česká republika)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Sigma-Aldrich, USA)
- Ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA) (Sigma-Aldrich, USA)
- Ethanol 96%, 70% (Lach-Ner, Česká republika)
- Fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich, USA)
- Fetální telecí sérum 10% (Biowest, Francie)
- Fluorid sodný (NaF) (Sigma-Aldrich, USA)
- Fluorsave reagent (Millipore, USA)
- Glycin (Calbiochem, USA)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (Biowest, Francie)
- Hydrogenfosforečnan sodný ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) (Penta, Česká republika)
- Chemiluminiscenční substrát SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Chlorid draselný (KCl) (Penta, Česká republika)
- Chlorid sodný (NaCl) (Penta, Česká republika)
- Kyselina fosforečná (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina octová (Penta, Česká republika)
- Leupeptin (Sigma-Aldrich, USA)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich, USA)
- Methanol (Penta, Česká republika)
- Penicilin (Sigma-Aldrich, USA)
- Peroxodisírán amonný (APS) (BioRad, USA)
- Ponceau S (Serva, Německo)
- Propidium jodid (Sigma-Aldrich, USA)
- Proteinový marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)
- Tetramethyletylendiamin (TEMED) (BioRad, USA)

- Tris (hydroxymethyl) aminomethan (TRIS) (Serva, Německo)
- Trypsin (Serana, Německo)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)
- Tween 20 (MP Biomedicals)
- Vanadičitan sodný (Na_2VO_3) (Sigma-Aldrich, USA)

3.2.1 Roztoky

- 1M TRIS/HCL pH 6,8: 24,23 g TRIS / 200 ml H_2O pH 6,8
- 1M TRIS/HCL pH 8,8: 24,23 g TRIS / 200 ml H_2O pH 8,8
- 1% BSA v PBS + Tween 20: 0,5 g BSA / 50 ml PBS + Tween 20
- 10% APS: 0,1 g / 1 ml H_2O
- 10% DMEM: 10% fetální sérum, 2mM L-glutamin, 0,1 mg/ml streptomycin, 100 U/ml penicilin
- 10% SDS: 5 g SDS / 50 ml H_2O
- 5% BSA v TBS + Tween 20: 2,5 g BSA / 50 ml TBS + Tween 20
- 5% sušené mléko: 2,5 g sušené mléko / 50 ml TBS + Tween 20
- AA + Bis: 30% Akrylamid (AA), 0,8% Bisakrylamid (Bis AA): 58,4 g AA, 1,6 g N'N Bis AA / 200 ml
- Činidlo Bradford: 0,01% Coomassie brilliant blue, 95% ethanol, 85% kyselina o-fosforečná
- Dělicí gel 12,5%: 3,9 ml AA + Bis, 1,94 ml destilované vody, 3,5 ml TRIS pH 8,8, 94 μl SDS 10%, 6,25 μl TEMED, 37,5 μl APS
- Elektroforetický pufr: 37,8 g TRIS, 180 g glycin, 12,5 g SDS / 2,5 l H_2O
- Fixační roztok methanol:aceton (1:1)
- Chemiluminiscenční činidlo peroxid:luminol (1:1)
- PBS 10x: 80 g NaCl, 2 g KCl, 23,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 2 g KH_2PO_4 pH 7,4
- PBS + 0,1% Tween 20: 500 ml PBS 1x, 500 μl Tween 20
- Ponceau S: 0,1 g rozpustit v 0,5 ml 98 % CH_3COOH a doplnit do 800 ml H_2O
- Pufr na western blotting 10x: 30,3 g TRIS, 144 g glycin / 1 l H_2O
- RIPA pufr: 20 mM TRIS-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 2 mM EGTA; 0,2% Nonidet P-40 pH 7,4, před použitím přidáno: 10 mM PMSF, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 2 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 1 mM DTT, 2 mM NaF, 1 mM Na_2VO_3
- TBS 10x pH 7,6: 24,2 g TRIS, 80 g NaCl, HCl podle pH (asi 14 ml)

- TBS + 0,1% Tween 20: 500 ml TBS 1x, 500 μ l Tween 20
- Trypsin/EGTA (1:1): 0,1% trypsin, 0,25% EGTA
- Zaostrřovací gel 5%: 0,84 ml AA+Bis, 3,51 ml destilované vody, 0,63 ml TRIS pH 6,8, 50 μ l SDS 10%, 5 μ l TEMED, 30 μ l APS

3.2.2 Protilátky

Tab. 4: Seznam použitých primárních protilátek popisujících: číslo protilátky, cílovou strukturu, zdroj protilátky, klon, ředění a výrobce. WB – western blotting, IF – imunofluorescence.

		Zdroj	Klon	Ředění	Výrobce
160	β -aktin	myš	C4	WB: 5000x	Santa Cruz Biotechnology (USA)
204	Kaspáza 7	králík	-	WB: 250x	Cell Signaling Technology (USA)
275	HSP60	králík	D307	WB: 500x	Cell Signaling Technology (USA)
278	HSP90	králík	C45G5	WB: 1000x	Cell Signaling Technology (USA)
291	PARP-1	králík	46D11	WB: 500x	Cell Signaling Technology (USA)
522	LXR α/β	myš	G10	WB: 300x IF: 500x	Santa Cruz Biotechnology (USA)

Tab. 5: Seznam použitých sekundárních protilátek popisujících: číslo protilátky, zdroj, ředění a výrobce. WB – western blotting, IF – imunofluorescence, RAM – králíčí proti myši značená křenovou peroxidázou, SWAR – prasečí proti králíčí značená křenovou peroxidázou.

		Zdroj	Ředění	Výrobce
	RAM/Px	králík	WB: 1000x	Sigma-Aldrich (USA)
	SWAR/Px	prase	WB: 1000x	Cell Signaling Technology (USA)
430	RAM Alexa fluor 488	králík	IF: 1000x	Thermo Fisher Scientific (USA)

3.3 Přístrojové vybavení

- Aparatura pro vertikální elektroforézu (BioRad, USA)
- Aparatura pro western blotting (BioRad, USA)
- Centrifuga CompactStar CS4 (VWR International, USA)
- CO₂ inkubátor MLO-19AICLE (Panasonic, Japonsko)
- Fluorescenční mikroskop IX51 (Olympus, Japonsko)
- Chlazená centrifuga Heraeus Megafuge 16R (ThermoFisher Scientific, USA)
- Chemiluminiscenční kamera LAS 4000 (Fujifilm, Japonsko)
- Kývačka Mini Rocker-Shaker MR-1 (Biosan, Litva)
- Laboratorní váhy Kern PCB (Kern, Německo)

- Laminární box (Telstar)
- Magnetická míchačka (VELP Scientifica, Itálie)
- Minicentrifuga MyFuge (Benchmark Scientific, USA)
- Optický mikroskop Axiovert 40 CFL (Zeiss, Německo)
- Průtokový cytometr BD FACS Verse (Becton Dickinson, USA)
- Termoblok (ThermoFisher Scientific, USA)
- Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls (Bandelin, Německo)
- UV-VIS spektrofotometer UV-1800 (Schimadzu, Japonsko)
- Vakuová pumpa Vacusafe comfort (Integra Biosciensis, Švýcarsko)
- Vodní lázeň (GFL, Německo)
- Vortex Wizard Advancer IR Vortex Mixer (VELP Scientifica, Itálie)
- Zdroj napětí PowerPac Basic (BioRad, USA)

3.4 Metody

3.4.1 Kultivace buněčné linie a její ovlivnění testovanou látkou

Buněčné kultury byly pěstovány ve sterilních Petriho miskách o průměru 100 mm (TPP, Švýcarsko) v 10% kultivačním médiu DMEM. Petriho misky byly umístěny v inkubátoru, kde byla udržována stálá teplota 37 °C, atmosféra obohacená o 5,5 % CO₂ a 100% vlhkost. Kultivační médium bylo připraveno smícháním 440 ml DMEM, 50 ml fetálního séra, 5 ml antibiotik penicilin-streptomycin a 5 ml glutaminu. Před použitím bylo médium vždy ohřáto ve vodní lázni na 37 °C.

Podle potřeby byly buněčné kultury několikrát týdně pasážovány s cílem výměny média a naředění narostlých buněk. Před pasážováním byl stav buněk na misce vždy zkontrolován pod mikroskopem. Následně bylo staré médium odsáto a miska s buňkami byla opláchnuta 2 ml roztoku EGTA. Po jeho odsátí bylo na misku napipetováno 1,5 ml trypsinu a miska byla vrácena na několik minut do inkubátoru. Po vytáhnutí z inkubátoru byla miska opláchnuta 5 ml ohřátého kultivačního média a obsah misky s buňkami byl přenesen do zkumavky, která byla vložena do centrifugy na 5 min při pokojové teplotě a 1000 × rpm. Po centrifugaci byl supernatant odsán a vzniklý pelet byl resuspendován v definovaném objemu média, který byl následně přenesen do nové misky. Na misku bylo poté přidáno kultivační médium, aby celkový objem činil 10 ml.

Při zakládání nového pokusu byl pelet resuspendován v 5 ml média a 10 μ l suspenze bylo přeneseno na Bürkerovu komůrku, kde byly ve 4x4 čtvercích ohraničených trojitou čarou spočítány buňky. Výsledný počet byl vynásoben faktorem 10 000, čímž byl zjištěn počet buněk v 1 ml. Pro western blotting bylo potřeba alespoň 700 000 buněk na misku (10 ml), pro analýzu na průtokovém cytometru 350 000 buněk na misku (5 ml) a pro imunofluorescenční analýzu 15 000 buněk do jedné jamky (250 μ l). Vysázené misky (8-12 misek) byly ponechány v inkubátoru 24 hod. Druhý den byly do 5 ml, 3 ml a 250 μ l média naředěny testované látky a médium bylo vyměněno za staré. V případě kontrolních vzorků bylo vyměněno médium obsahující DMSO (pozitivní kontrola, KO⁺) nebo pouze čisté médium (negativní kontrola, KO⁻). Po 24 hod inkubace byly buňky sklizeny nebo fixovány v případě imunofluorescenční analýzy.

3.4.2 Sklizení a lyzace buněk pro western blotting

Vzorky pro western blotting byly sklizeny pomocí škrabek. Po seškrábání bylo médium s buňkami přeneseno do připravené zkumavky na ledu a na prázdnou misku byl napipetován 1 ml studeného PBS. Povrch misky byl opět seškrábán a PBS se zbytky buněk byl přenesen do zkumavky na ledu. Vzorky byly následně 10 min centrifugovány při 1000 \times g a 4 °C. Vzniklý supernatant byl odsán vakuovou pumpou, do zkumavky byl přidán 1 ml studeného PBS a obsah zkumavky byl promíchán na vortexu. Poté byly vzorky opět 10 min centrifugovány při 1000 \times g a 4 °C. Supernatant byl znovu odsán a do zkumavky byl přidán 1 ml PBS. Obsah zkumavky byl promíchán pipetou a poté přenesen do mikrozkušavky, která byla následně vložena do původní zkumavky. Takto byly vzorky opět centrifugovány za stejných podmínek. Supernatant v mikrozkušavce byl odsán a mikrozkušavka s peletem byla umístěna do -80 °C do dalšího dne. Po celou dobu byly vzorky umístěny na ledu.

Pře každou lyzaci byl připraven čerstvý lyzační pufr (LP) smícháním 984 μ l RIPA pufru, 10 μ l PMSF, 1 μ l leupeptinu a 1 μ l aprotininu, 1 μ l DTT, 2 μ l NaF a 1 μ l Na₂VO₃. Vzorky byly umístěny na led. Podle velikosti peletu bylo do každé mikrozkušavky přidáno 20-30 μ l LP a obsah byl silně promíchán pipetou. Takto byly vzorky 30 min inkubovány na ledu, přičemž byly vždy po 10 min promíchány. Po skončení inkubace byly vzorky ultrazvukovány a 30 min centrifugovány při 14 000 \times g a 4 °C. Vzniklý supernatant byl přenesen do nové nachlazené mikrozkušavky, a současně byl pomocí pipety odměřován jeho objem.

Koncentrace proteinů ve vzorcích byla zjišťována Bradfordovou metodou, přičemž měření bylo prováděno vždy v duplikátech. Do skleněné zkumavky byl přidán 1 ml činidla Bradford a do každé zkumavky byl napipetován 1 μ l příslušného vzorku. Po promíchání byly vzorky 10 min inkubovány při pokojové teplotě. Na spektrofotometru bylo poté provedeno měření absorbance při 595 nm, čímž byla zjištěna celková koncentrace proteinů ve vzorcích. Aby byly koncentrace proteinů stejné, bylo k jednotlivým vzorkům přidáno dané množství LP. Na závěr bylo v poměru 1:4 k objemu vzorků přidáno 5x SDS, které vyvolá denaturaci při zvýšené teplotě a udělí proteinům uniformní negativní náboj, a všechny vzorky byly umístěny do termobloku na 5 min a 95-98 °C. Takto připravené vzorky na SDS-PAGE byly uchovány v -20 °C.

3.4.3 SDS-PAGE a western blotting

Pro separaci proteinů byl připravován vhodný polyakrylamidový gel, a to 12,5% dělicí a 5% zaostřovací. Po složení byl mezi skla napipetován dělicí gel, který byl převrstven malým množstvím butanolu, aby došlo k jeho vyrovnání. Jakmile byl dělicí gel ztuhlý, zhruba po 45 min, byl butanol odsán pomocí filtračního papíru, gel byl opláchnut vodou a mezi skla byl napipetován gel zaostřovací. Téměř ihned po nalití byl do zaostřovacího gelu vložen hřebínek tvořící jamky. Po zatuhnutí byl gel uchován ve vlhku v lednici do dalšího dne.

Gely byly umístěny do elektroforetické aparatury a mezi ně a do okolí byl nalit elektroforetický pufr. Po nalití pufru byly vytaženy hřebínky. Vzorky byly po rozmrazení vloženy do termobloku na 2 min a 96 °C. Do první jamky gelu byly nanесeny 3 μ l proteinové markeru a do dalších vždy 30 nebo 35 μ g příslušného vzorku. Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji s napětím 90 V. Jakmile došlo k zasetí vzorků do dělicího gelu a začalo dělení markeru, bylo napětí zvýšeno na 120 V. Elektroforetické dělení probíhalo přibližně 1,5 hod. Přidaný SDS během lyzace udělil všem proteinům uniformní záporný náboj, který byl úměrný jejich molekulové hmotnosti. Proteiny po připojení zdroje napětí migrovali ke kladně nabitě elektrodě různou rychlostí v závislosti na jejich velikosti, čímž docházelo k separaci.

Během elektroforetického dělení byla blotovací kazeta s porézními podložkami, filtračními papíry a nitrocelulózovou membránou (BioRad, USA) chlazena v připraveném blotovacím pufru v lednici. Po skončení elektroforézy byl pomocí špachtle gel uvolněn ze skel a byl odstraněn zaostřovací gel. Na negativní pól kazety byly pokládány v tomto pořadí porézní podložka, 2 blotovací papíry, gel, membrána, 2 filtrační papíry a

porézní podložka. Z prostoru mezi gelem a membránou byly postupným stlačováním odstraněny vzduchové bubliny směrem od středu na kraj. Všechny součásti byly stlačeny a uzavřeny do blotovací kazety pod hladinou blotovacího pufru. Kazety byly vloženy do blotovací aparatury a spolu s míchátkem byly zality blotovacím pufrem. Při správné orientaci elektrod byl připojen zdroj proudu s nastavenými 270 mA po dobu 3 hod. Celá aparatura byla průběžně chlazena chladícími vložkami, které byly v polovině času vyměňovány. Po skončení byla membrána barvena v roztoku Ponceau S po dobu 5 min za účelem vizualizace proteinů. Na závěr byla membrána promývána přibližně 5 min v destilované vodě a poté usušena.

3.4.4 Imunodetekce proteinů

V obarvené membráně byly dle detekovaných proteinů vyřezány odpovídající proužky. Podle velikosti proužků bylo odhadnuto množství protilátek potřebné na úplné pokrytí proužků. Nařezané proužky membrány byly 5 minut promývány v 1x TBS za účelem odbarvení. Poté byly proužky 1 hod blokovány na kývačce v roztoku 5% sušeného mléka v 1x TBS s Tweenem nebo 5% BSA v 1x TBS s Tweenem za účelem blokace nespecifických vazeb v místech, kam se nenavázaly proteiny. Během blokace byly odpovídající primární protilátky naředěny do 5% mléka nebo 5% BSA a do krabičky s malým množstvím vody byla umístěna podložka potažená parafilmem. Po skončení blokace byly proužky následně promyty 5 min v 1x TBS a postupně byly přeneseny na filtrační papír k osušení přebytečné tekutiny. Poté byly opatrně umístěny na podložku s parafilmem a byly převrstveny příslušnou primární protilátkou. Do dalšího dne byly proužky takto inkubovány v lednici.

Následující den byly proužky promývány 5 min v TBS, 5 min v TBS s Tweenem, 5 min v TBS a 10 min v novém TBS za účelem odmytí nenavázaných protilátek. Mezitím byly naředěny sekundární protilátky 1000x do 5% mléka v 1x TBS s Tweenem nebo 5% BSA v 1x TBS s Tweenem. Po posledním promytí byly proužky umístěny opět na podložku s parafilmem do krabičky s vodou. Zde byly převrstveny sekundárními protilátkami a inkubovány 1 hod při laboratorní teplotě. Poté byly proužky opět promývány 10 min v TBS, 5 min v TBS s Tweenem, 5 min v TBS a 10 min v novém TBS. V poměru 1:1 byl nachystán chemiluminiscenční substrát peroxid:luminol, který byl nanesen na seřazené proužky na podložce s parafilmem. Po 5 minutách bylo možné provést chemiluminiscenční analýzu proteinů. Analýza probíhala na principu enzymatické reakce křenové peroxidázy navázané

na sekundární protilátce a peroxidu vodíku, která vyvolala oxidaci luminolu, což způsobilo emisi světla, která byla detekována kamerou.

3.4.5 Analýza buněčného cyklu průtokovým cytometrem

Vzorky na průtokovou cytometrii byly sklizeny za pomoci trypsinu. Po vizuální kontrole buněk pod mikroskopem bylo médium z misky přeneseno do zkumavky umístěné na ledu. Miska byla opláchnuta 1 ml nahřátého trypsinu a byla vrácena na chvíli do inkubátoru. Jakmile se buňky začaly odlepovat z povrchu misky, byla miska opláchnuta 4 ml ohřátého kultivačního média a poté 1 ml PBS. Vzorky byly centrifugovány 10 min při $1000 \times g$ a 4°C . Vzniklý supernatant byl odsán a k peletu byl přidán 1 ml studeného PBS. Obsah zkumavek byl promíchán na vortexu a vzorky byly znovu centrifugovány za stejných podmínek. Po centrifugaci byl supernatant opět odsán, k peletu byl přidán 1 ml studeného PBS a obsah zkumavky byl přenesen do zamrazovací zkumavky. Takto byly vzorky opět centrifugovány za stejných podmínek. Supernatant byl odsán a pelet byl resuspendován ve 100 μl PBS. Za stálého míchání na vortexu byl ke vzorku pomalu po kapkách přidáván 1 ml vychlazeného 70% ethanolu z -20°C . Takto zafixované buněčné suspenze byly uskladněny v -20°C .

Před analýzou byl připraven roztok smícháním 10 μl propidium jodidu (PI), 1 μl Tritonu X-100 a 1000 μl studeného PBS. Toto množství odpovídalo 1 vzorku. Připravený roztok byl zabalen do alobalu. Vzorky byly centrifugovány 10 min při $1000 \times g$ a 4°C . Supernatant byl odsán a k peletu byl přidán 1 ml studeného PBS. Vzorky byly promíchány na vortexu a centrifugovány za stejných podmínek. Supernatant byl znovu odsán a k peletu byl přidán 1 ml připraveného roztoku. Po důkladném promíchání pipetou a následně také na vortexu byly vzorky inkubovány 30 min ve tmě. Po skončení inkubace byly vzorky přeneseny do vialek a byly analyzovány pomocí průtokového cytometru. Analýza buněčného cyklu probíhá na základě vazby PI na DNA. Průchodem buněk skrze kapiláru dochází k ozáření navázaného PI paprskem o vlnové délce 488 nm, což vyvolá emisi záření o vlnové délce 610 nm, která je zaznamenána detektorem. Emitované záření odpovídá obsahu DNA v buňkách.

3.4.6 Imunofluorescenční analýza

Z jamek v 8-jamkovém panelu bylo odstraněno kultivační médium a jamky byly upláchnuty nahřátým PBS. Po odstranění PBS bylo do každé jamky nanášeno 200 μ l fixačního roztoku methanol:aceton (1:1) a panel se vzorky byl umístěn na 10 min do -20 °C. Následně byl fixační roztok odsán a panel se vzorky byl ponechán ve flowboxu. Po zaschnutí byl panel se vzorky uskladněn v -20 °C.

Zafixované vzorky v panelu byly oplachovány 3 min 300 μ l PBS s 0,1% Tweenem. Následovalo blokování nespecifických vazeb pomocí 1% BSA v PBS s 0,1% Tweenem po dobu 30 min na kývačce. Poté byly vzorky opět promývány na kývačce po dobu 3 min v PBS s 0,1% Tweenem. Do 1% BSA v PBS s 0,1% Tweenem byla naředěna primární protilátka. Do každé jamky bylo přidáno 150 μ l primární protilátky a panel byl ponechán inkubovat při 4 °C do druhého dne.

K odmytí nenavázaných protilátek byly vzorky další den promývány na kývačce v PBS s 0,1% Tweenem po dobu 3 min v 5 sériích. Mezitím byla do 1% BSA v PBS s 0,1% Tweenem naředěna sekundární protilátka. Po promytí bylo do každé jamky aplikováno 150 μ l sekundární protilátky a panel byl po dobu 90 min inkubován na kývačce ve tmě. Následně byly vzorky ve tmě na kývačce promývány nejprve v PBS s 0,1% Tweenem 3 min v 5 sériích, v PBS 3 min ve 2 sériích a v destilované vodě 3 min ve 2 sériích. Na závěr byly aplikovány 2 kapky vodního média Fluorsave, které má za úkol uchovat fluorescenčně obarvené buňky.

4. Výsledky

Antiproliferační aktivita vybraných derivátů oxysterolů byla testována na adherentní nádorové buněčné linii HeLa odvozené od lidského cervikálního karcinomu pomocí tří metod. Prostřednictvím western blottingu a následné imunodetekce byly sledovány hladiny proteinů souvisejících s apoptózou a hladina vybraného jaderného receptoru. Interakce derivátů s jaderným receptorem byla pozorována také metodou imunofluorescence. Buněčný cyklus po ovlivnění testovanými látkami byl analyzován pomocí průtokové cytometrie.

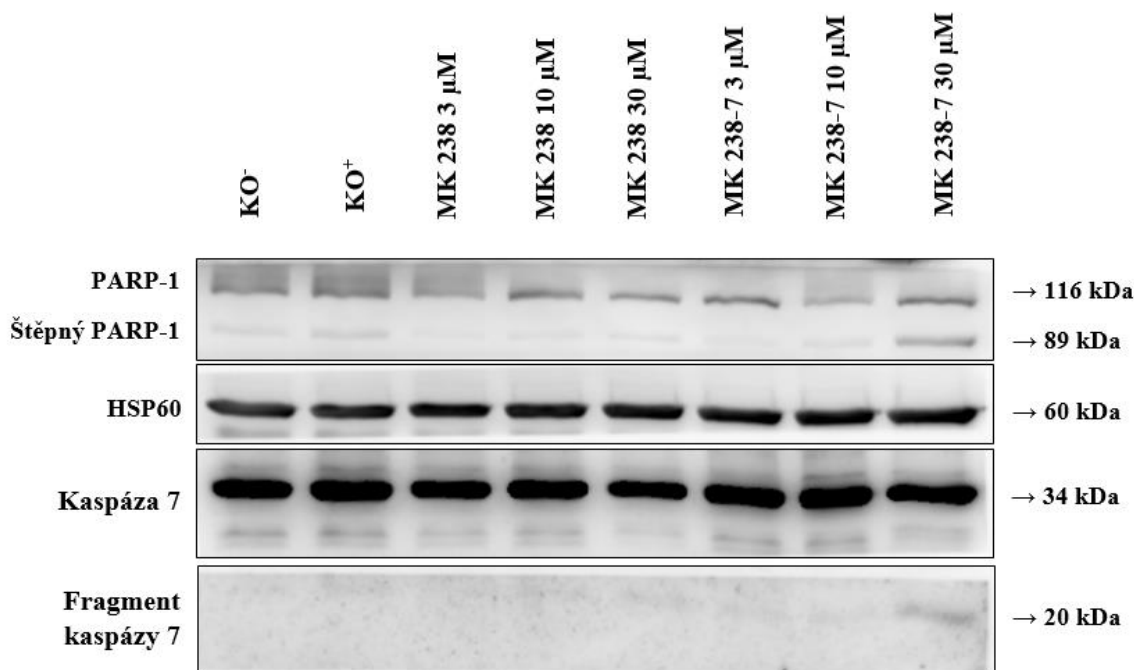
4.1 Western blotting

Změny v expresi proapoptotických proteinů a jaderného receptoru byly analyzovány metodou western blottingu, kdy byla rozdělená směs proteinů podle velikosti po SDS-PAGE přenesena na nitrocelulózovou membránu a následně byly vybrané proteiny detekovány pomocí specifických protilátek. Buněčná linie HeLa byla při prvním pokusu (Obr. 6) ovlivněna po dobu 24 hod syntetickými deriváty oxysterolů MK 238 a MK 238-7. Působení látek bylo testováno ve třech koncentracích (3 μM , 10 μM a 30 μM), které byly vybrány na základě hodnot IC_{50} , které byly měřeny dříve laboratoří KEB. Změny exprese proteinů byly porovnávány s kontrolními neovlivněnými buňkami KO^- , ke kterým bylo přidáno čisté kultivační médium, a KO^+ , ke kterým bylo přidáno kultivační médium s přídatkem DMSO. Sledovány byly změny hladin proteinů PARP-1, kaspázy 7 a jejich štěpných fragmentů. Pro kontrolu rovnoměrného nanesení vzorků byla stanovena hladina proteinu HSP60, jehož exprese by měla být stabilní a neovlivněná testovanými látkami.

Protein PARP-1 je jaderný enzym o velikosti 116 kDa, jehož úlohou je provádění oprav poškozené DNA. Během apoptózy dochází k jeho štěpení efektorovými kaspázami 3 a 7, čímž vzniká fragment o velikosti 89 kDa. Na Obr. 6 je celkový protein PARP-1 viditelný u všech vzorků a štěpný fragment je patrný u vzorku MK 238-7 při nejvyšší koncentraci 30 μM .

Kaspázy jsou vysoce specifické endoproteázy, které se v buňce nachází v neaktivním stavu jako pro-kaspázy neboli zymogeny. Pokud je aktivován proces apoptózy, dochází k jejich rozštěpení na aktivní fragmenty, které dále štěpí dané substráty jako například PARP-1. Tyto děje se tak společně stávají významným znakem probíhající apoptózy. Fragment kaspázy 7 je viditelný rovněž u vzorku MK 238-7 v koncentraci 30 μM . Aktivní

kaspáza 7 tedy provedla štěpení proteinu PARP-1, z čehož lze usoudit, že v tomto vzorku byla indukována apoptóza.

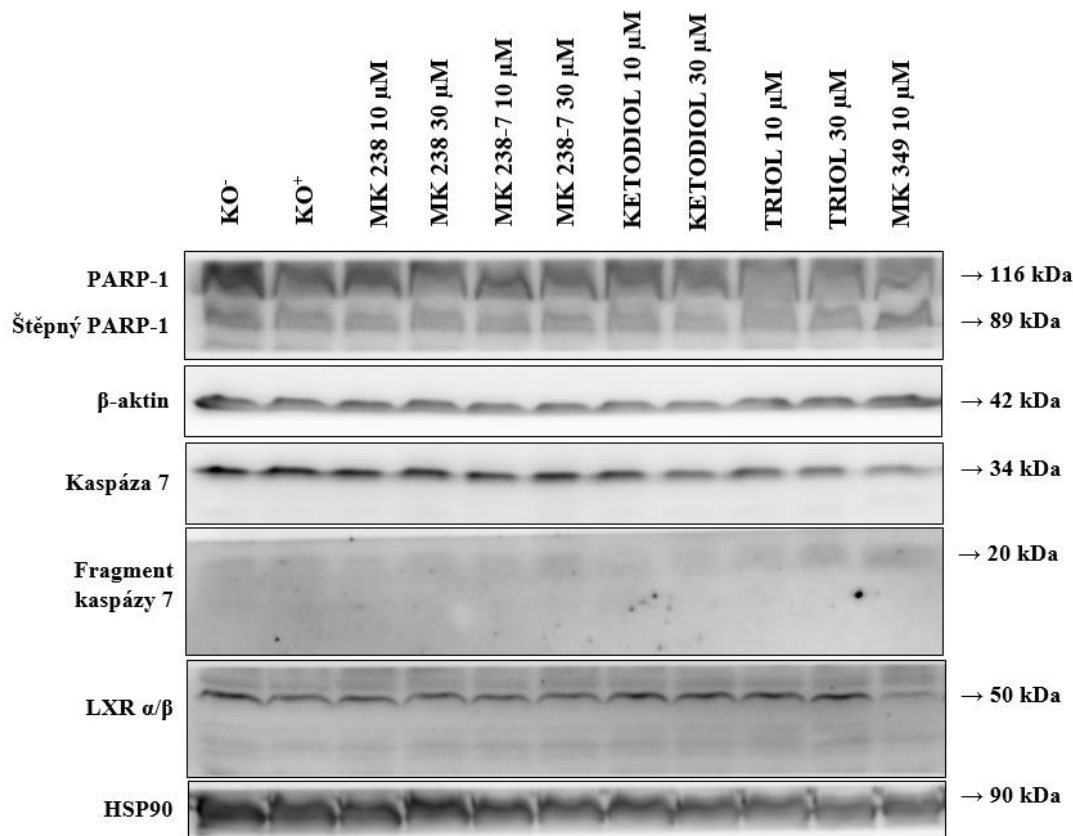


Obr. 6: Imunodetekce proapoptotických proteinů v nádorové buněčné linii HeLa po 24-hodinovém ovlivnění deriváty oxysterolů MK 238 a MK 238-7 v koncentracích 3 μM, 10 μM a 30 μM. Pro porovnání pozorovaného efektu slouží neovlivněné vzorky KO⁻ a KO⁺.

Při další sérii pokusů (Obr. 7) byla buněčná linie HeLa ovlivněna po dobu 24 hod dvěma syntetickými (MK 238, MK 238-7) a dvěma přírodními deriváty (ketodiol, triol). Testovány byly již pouze dvě koncentrace 10 μM a 30 μM. Změny exprese proteinů byly porovnávány s kontrolními neovlivněnými buňkami KO⁻, ke kterým bylo přidáno čisté kultivační médium, a KO⁺, ke kterým bylo přidáno kultivační médium s přídavkem DMSO. Pro ověření správnosti postupu byla přidána strukturně odlišná látka MK 349 v koncentraci 10 μM, u které bylo v dřívějších studiích potvrzeno, že způsobuje apoptózu (Rárová *et al.*, 2018). Sledovány byly změny hladin proteinů PARP-1, kaspázy 7, jejich štěpných fragmentů a jaderného receptoru LXR α/β. Pro kontrolu rovnoměrného nanesení vzorků byla stanovena hladina β-aktinu a HSP90 (pro porovnání s LXR α/β), jejichž exprese by měla být stabilní a neovlivněná testovanými látkami.

Na obr. 7 se celkový protein PARP-1 nachází u všech vzorků. Štěpný fragment proteinu PARP-1 a kaspázy 7 je viditelný prakticky ve všech vzorcích, což značí, že u buněk docházelo během kultivace nebo následného sklizení ke stresu. U látky MK 349 je exprese

fragmentů výraznější, což splňuje očekávání, že proces apoptózy by zde měl probíhat. Zároveň je v tomto vzorku mírně snížená exprese zymogenu kaspázy 7, což by mohlo značit její zvýšené štěpení na aktivní fragment. Lehce zvýšené hladiny fragmentu kaspázy 7 jsou viditelné také u vzorků MK 238-7 30 μM a triol 30 μM .

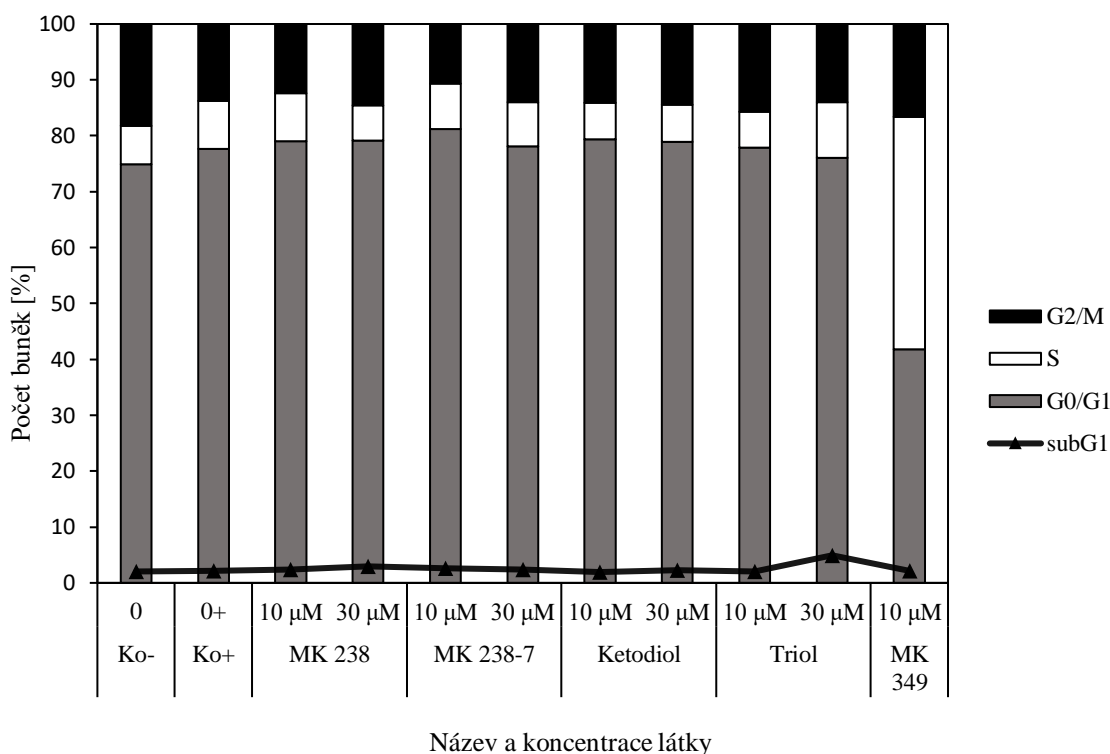


Obr. 7: Imunodetekce proapoptotických proteinů (PARP-1, kaspáza 7) a jaderného receptoru LXR α/β v nádorové buněčné linii HeLa po 24-hodinovém ovlivnění syntetickými (MK 238, MK 238-7) a přírodními (ketodiol, triol) deriváty oxysterolů v koncentracích 10 μM a 30 μM . Pro porovnání slouží neovlivněné vzorky KO⁻, KO⁺ a pozitivní kontrola způsobující apoptózu látka MK 349 v koncentraci 10 μM .

Jaderný receptor LXR α/β funguje jako transkripční faktor genů, které regulují metabolismus lipidů a zánětlivé procesy. Oxysteroly jsou jeho přirozenými ligandy a v současné době je studován vliv tohoto receptoru na regulaci růstu různých typů nádorů (Lo Sasso *et al.*, 2013; W. Zhang *et al.*, 2014). Na Obr. 7 je možné pozorovat, že kromě látky MK 349, která ovšem nepatří mezi oxysteroly, nedošlo v expresi LXR α/β k žádné změně v porovnání s kontrolními vzorky.

4.2 Průtoková cytometrie

Analýza průběhu buněčného cyklu po ovlivnění testovanými látkami byla prováděna pomocí metody průtokové cytometrie. Tato metoda využívá vazby fluorescenčního barviva PI na DNA. Detekovaný signál je úměrný obsahu DNA v buňkách, z čehož je poté stanoveno procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu (G_0/G_1 ; S; G_2/M) a zastoupení buněk v procesu apoptózy a jejich fragmentů (sub G_1).



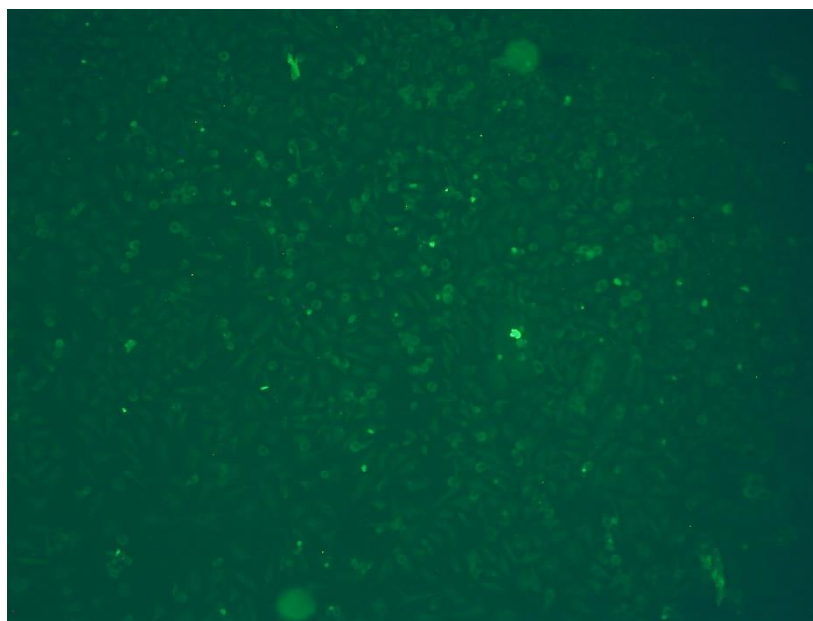
Obr. 8: Procentuální zastoupení buněk nádorové buněčné linie HeLa ve fázích buněčného cyklu (sub G_1 ; G_0/G_1 ; S; G_2/M) po 24-hodinovém ovlivnění syntetickými (MK 238, MK 238-7) a přírodními (ketodiol, triol) deriváty oxysterolů v koncentracích 10 μM a 30 μM . Pro porovnání slouží neovlivněné vzorky KO^- , KO^+ a pozitivní kontrola způsobující apoptózu látka MK 349.

Buněčná linie HeLa byla ovlivněna po dobu 24 hod dvěma syntetickými (MK 238, MK 238-7) a dvěma přírodními deriváty oxysterolů (ketodiol, triol) v koncentracích 10 μM a 30 μM . Použita byla také látka MK 349 v koncentraci 10 μM a kontrolní neovlivněné vzorky KO^- a KO^+ . Na obr. 8 je viditelné, že u testovaných derivátů oxysterolů nedošlo k téměř žádným výrazným změnám v buněčném cyklu. Látka MK 349 naproti tomu způsobila významný blok buněk ve fázi S, což znamená, že buňky následkem velkého poškození nemohly vstoupit do další fáze cyklu. Pro látky MK238 a MK 238-7 v koncentraci 10 μM došlo k mírnému zvýšení počtu buněk v G_0/G_1 fázi a snížení v G_2/M oproti

kontrolním vzorkům. K mírně zvýšenému zastoupení apoptotických buněk v subG₁ fázi došlo u triolu v koncentraci 30 μM.

4.3 Imunofluorescenční analýza

Imunofluorescenční analýza byla použita pro sledování translokace receptoru LXR α/β do jádra buněk. Buněčná linie HeLa byla po dobu 24 hod ovlivněna syntetickými (MK 238, MK 238-7) a přírodními deriváty oxysterolů (ketodiol, triol). Účinek látek byl testován pouze v koncentraci 30 μM, jelikož u nižších koncentrací nebyl v předchozích analýzách pozorován žádný efekt. Pro porovnání byly použity kontrolní vzorky KO⁻, KO⁺ a látka MK 349 v koncentraci 10 μM. Reprezentativní snímek zobrazující četné buňky linie HeLa po obarvení příslušnými protilátkami se nachází na Obr. 9. Bohužel kvůli velkému signálu pozadí nebylo možné vyhodnotit, zda po ovlivnění testovanými látkami k translokaci receptoru došlo či nikoliv. Zároveň při analýze kontrolních vzorků nebyl detekován téměř žádný fluorescenční signál, který by umožňoval provést porovnání.



Obr. 9: Reprezentativní snímek z fluorescenčního mikroskopu zobrazující buňky linie HeLa po 24 hodinách ovlivnění testovanými látkami po obarvení primární myší protilátkou pro detekci jaderného receptoru LXR α/β a sekundární králičí protilátkou RAM Alexa fluor 488 při zvětšení 100x.

5. Diskuze

Cílem experimentální části mé diplomové práce bylo provést testování antiproliferačních účinků a schopností ovlivnit aktivitu jaderných receptorů u vybraných unikátních derivátů oxysterolů *in vitro* na nádorové buněčné linii HeLa metodami western blottingu, průtokové cytometrie a imunofluorescence. Současně bylo také cílem získat praktické a teoretické znalosti v rámci výše zmíněných metod a v oblasti kultivace buněčných kultur.

Buněčná linie HeLa byla vybrána díky významné citlivosti na látky steroidní povahy a pro své méně náročné podmínky na kultivaci oproti jiným kulturám. Buněčná linie byla ovlivněna po dobu 24 hod celkem čtyřmi testovanými deriváty oxysterolů, z nichž dva byly syntetické a dva přírodní. Testované koncentrace látek (3 μM , 10 μM a 30 μM) byly zvoleny na základě testů cytotoxicity a hodnot IC_{50} , které byly měřeny dříve laboratoří KEB. Koncentrační řada testovaných látek byla vytvořena tak, aby následující látka měla vždy přibližně 3x vyšší koncentraci. Pro porovnání byla do testování zařazena strukturně odlišná pozitivní kontrola MK 349 v koncentraci 10 μM , u které byla v dřívější studii potvrzena schopnost indukovat apoptózu (Rárová *et al.*, 2018). Pomocí tří nezávislých metod tak byla zkoumána schopnost derivátů indukovat apoptózu a schopnost ovlivnit aktivitu jaderného receptoru.

Metodou western blottingu byly sledovány změny exprese proteinu PARP-1, kaspázy 7, jejich štěpných fragmentů a jaderného receptoru LXR α/β . V prvním experimentu (obr. 6) bylo pozorováno štěpení kaspázy 7 na její aktivní fragment po ovlivnění látkou MK 238-7 v koncentraci 30 μM . Aktivní fragment kaspázy 7 také provedl štěpení dalších substrátů, což je podloženo detekcí štěpného fragmentu PARP-1. Oproti tomu u látky MK 238 nebyl v testovaných koncentracích pozorován žádný efekt, což bylo možné očekávat vzhledem k výrazně vyšší hodnotě IC_{50} . Podobný experiment provedli You *et al.* (2020) u derivátu cholesterolu 25-hydroxycholesterolu v modelu spinocelulárního karcinomu hlavy a krku. Derivát aktivoval apoptózu vnější i vnitřní dráhou za současné aktivace efektorové kaspázy 3. Cytotoxická aktivita látky narůstala se zvyšující se koncentrací, přičemž nejvyšší koncentrace 20 μM způsobila pokles životaschopných buněk přibližně o 66 %. Vzhledem k tomu, že u značného množství derivátů oxysterolů je popsána aktivace kaspázy 3, bylo by zajímavé provést analýzu její aktivity po ovlivnění testovanými látkami v této práci.

Při dalších testováních (obr. 7) nebyly u žádného ze vzorků pozorovány výrazné změny v expresi v porovnání s kontrolními vzorky. Štěpné fragmenty a náznak probíhající apoptózy byly patrné pouze u látky MK 349. Výsledky těchto pokusů však nesouhlasí s předešlým, protože nebylo detekováno štěpení u látky MK 238-7. Jelikož se jedná o poměrně stabilní látky, není pravděpodobné, že by došlo k degradaci testované látky a snížení jejího účinku. Chyba mohla nastat během procesu ředění testovaných derivátů do kultivačního média, kterým byla buněčná linie následně ovlivněna. Při úplně prvním testování mohlo být díky prvotnímu neodbornému zacházení připraveno médium s vyšší koncentrací daného derivátu, proto zde byl pozorován efekt, který se v dalších testováních nepodařilo replikovat.

Syntetické látky MK 238 a MK 238-7 byly součástí knihovny 70 syntetických cholestanů příbuzných brassinosteroidům, jejichž aktivita byla testována na panelu nádorových buněčných linií a primárních buňkách fibroblastů BJ v publikaci Rárová *et al.* (2016). Látky MK 238 a MK 238-7 u většiny buněčných linií, s výjimkou linie akutní lymfoblastické leukémie CEM, vykazovaly spíše nízkou aktivitu v porovnání s jinými deriváty. Dále byly testovány také přírodní deriváty triol a ketodiol a interní standard 7-KC. Zatímco 7-KC patřil k nejvíce cytotoxickým látkám, triol a ketodiol byly toxické pouze mírně nebo vůbec. Na biologickou aktivitu látek má dle autorů velký vliv přítomnost 3-hydroxy nebo 3-oxo skupiny, 2,3- nebo 3,4-vicinálního diolu, hydroxylových skupin na postranním řetězci a šestičlenného kruhu B. Všechny testované látky v této diplomové práci splňují podmínku šestičlenného kruhu B, nesou 3-hydroxy skupinu a syntetické látky navíc obsahují vicinální 2,3- diolové skupiny, takže mají teoretický předpoklad pro dobrou biologickou aktivitu. Látka MK 238-7 stejně jako 7-KC nese v poloze 7 -oxo skupinu, která by mohla být důvodem její vyšší aktivity oproti látce MK 238.

Cytotoxické vlastnosti triolu byly studovány v práci Carvalho *et al.* (2010). Triol při základním screeningu cytotoxicity na buněčné linii karcinomu tlustého střeva HT-29 po 48 hod vykazoval jedny z nejlepších výsledků ($IC_{50} 12,9 \pm 0,3 \mu M$). Oxidací jeho funkční skupiny v poloze 6 došlo k poklesu aktivity. Při dalším testování na rozšířeném panelu buněčných linií byl po 48 hod vůči triolu nejcitlivější model myeloidní leukémie LAMA-84 ($IC_{50} 5 \pm 0,2 \mu M$). V tomto případě měl triol dokonce vyšší aktivitu než konvenční léčivo cisplatina. Nízké dávky triolu při společné aplikaci s doxorubicinem dokonce zvýšili účinnost léčiva vůči linii HT-29. Aktivitu triolu na jiné buněčné linii a jeho potenciální využití při léčbě karcinomu prostaty popisuje práce Lin *et al.* (2013), kde triol výrazně

inhiboval růst buněk všech 3 testovaných linií po 48 hod při koncentraci 40 μM . Z těchto studií vyplývá, že aktivita triolu se výrazně liší v závislosti na buněčné linii, což může být důvodem negativních výsledků na linii HeLa, která mohla být vůči triolu méně citlivá.

Výsledky analýzy na průtokovém cytometru ukázaly, že žádná z testovaných látek nezpůsobila výrazné změny v buněčném cyklu v porovnání s kontrolními neovlivněnými vzorky, čímž se shodují s výsledky z western blot analýzy. K velmi mírnému zvýšení množství apoptotických buněk v subG₁ fázi došlo u triolu v koncentraci 30 μM . Lin *et al.* (2013) po 48 hod působení triolu na buněčné linie karcinomu prostaty výrazné zvýšení počtu apoptotických buněk v subG₁ fázi nepozorovali. V jejich experimentu došlo po ovlivnění triolem v koncentraci 10-20 μM podle zvolené linie k akumulaci buněk v G₁ fázi a snížení počtu buněk v S a G₂/M fázi. Podobný výsledek získali Levy *et al.* (2018), kteří zkoumali proapoptotické vlastnosti a ovlivnění buněčného cyklu ketodiolem, triolem a 7-KC na modelu lidského karcinomu prsu, normálních plicních fibroblastů, endotelové linii a modelu myšího melanomu. Indukce apoptózy ve všech liniích byla po 24 hod pozorována u ketodiolu v koncentraci 100 μM a u 7-KC a triolu při koncentraci 50 a 100 μM , přičemž triol indukoval apoptózu u nádorových linií i v koncentraci 25 μM . U všech zmíněných látek bylo pozorováno snížení množství buněk v S fázi cyklu a zvýšení buď v G₂/M fázi v případě 7-KC a ketodiolu, nebo G₀/G₁ v případě triolu, což koreluje s výsledky v práci Lin *et al.* (2013). Jelikož námi testovaná nejvyšší koncentrace látek byla 30 μM , bylo by vzhledem k výsledkům uvedeným v této publikaci pravděpodobně nutné aplikovat vyšší koncentrace látek k dosažení požadovaného efektu. Autoři zdůrazňují, že cytotoxické vlastnosti a schopnost ovlivnit buněčný cyklus jsou velmi závislé na zvolené látce a buněčné linii, což souhlasí s předešlým pozorováním rozdílné aktivity triolu. Cytometrická analýza dalších derivátů oxysterolů 7 β -hydroxycholesterolu a 25-hydroxycholesterolu byla provedena na panelu buněčných linií leukémie, kdy se vůči testovaným látkám ukázala být nejcitlivější linie monocytární leukémie THP-1. V případě obou látek byla zaznamenána akumulace buněk ve fázi G₂/M způsobená pravděpodobně snížením aktivity cyklinu B1 (Lim *et al.*, 2003).

Součástí western blot analýzy bylo pozorování hladin LXR α/β po ovlivnění testovanými deriváty oxysterolů, které jsou jejich přirozenými ligandy. Ani jedna z testovaných látek neměla výrazný vliv na aktivitu tohoto receptoru. Pouze u látky MK 349 bylo viditelné snížení exprese. Významnými agonisty receptoru LXR α/β , jejichž pozitivní vliv na snížení proliferace nádorových buněk byl testován na různých modelech, jsou

syntetický agonista T0901317 a přírodní derivát 22(R)-hydroxycholesterol (Chuu & Lin, 2010; El Roz *et al.*, 2012). Antiproliferační účinky syntetického agonisty byly prokázány například na modelech karcinomu prsu (El Roz *et al.*, 2012), melanomu (W. Zhang *et al.*, 2014), blastického plazmacytoidního novotvaru dendritických buněk (Ceroi *et al.*, 2016) a mnoho dalších. Účinek syntetického agonisty byl testován mimo jiné i na linii HeLa, kde došlo po 96 hod k bloku buněk v G₁ fázi a tím pádem snížení počtu buněk v S fázi (Chuu & Lin, 2010).

Metodou imunofluorescence měl být pozorován vliv testovaných látek na translokaci receptoru LXR α/β do jádra buněk linie HeLa. Bohužel při pořizování snímků nebylo možné daný efekt vyhodnotit z důvodu špatného obarvení buněk protilátkami. Jelikož imunofluorescenční analýza tohoto receptoru nebyla v laboratoři KEB dříve prováděna, není optimalizován její postup. Důvodem neúspěchu tak může být například způsob použité fixace vzorku nebo jakýkoliv jiný krok. Důkladná optimalizace postupu a vyloučení všech možností neúspěchu by vyžadovalo provést několik dalších opakování pokusu. Na základě výše popsaných výsledků z imunodetekce, kdy nebyly detekovány žádné změny v expresi, a časové náročnosti optimalizace nejsou další opakování zahrnuta do této práce.

Dosud byl pouze v jedné publikaci popsán pokus o sledování receptoru LXR α/β po ovlivnění oxysteroly metodou imunofluorescence. Levy *et al.* (2019) studovali interakci cholesterolu, 7-KC, ketodiolu a triolu s jadernými receptory v buněčné linii prsního karcinomu MDA-MB-231, která byla ovlivněna po dobu 24 hod látkami o koncentraci 30 μM . Po ovlivnění 7-KC a triolem pozorovali významné zvýšení fluorescence LXR α . Na základě hypotézy, že antiproliferační účinky LXR spočívají v eliminaci cholesterolu z membrán buněk prostřednictvím zvýšené exprese ABC transportérů, provedli testování změn exprese transportérů ABCA1 a ABCG1, kde detekovali zvýšení exprese u totožných látek (Ceroi *et al.*, 2016; El Roz *et al.*, 2012).

6. Závěr

V této diplomové práci byly studovány antiproliferační účinky vybraných syntetických a přírodních derivátů oxysterolů na nádorové buněčné linii HeLa odvozené od nádoru děložního hrdla. V teoretické části práce byla vypracována rešerše shrnující informace o cervikálním karcinomu včetně jeho původce, klasifikace a metod léčby, o buněčném cyklu a jeho kontrolním systému, programované buněčné smrti a oxysterolech, zejména jejich zařazení v systému steroidních látek, způsobech vzniku, biologických funkcích a možném uplatnění v terapii nádorů.

Antiproliferační a proapoptotické vlastnosti vybraných oxysterolů byly sledovány po 24 hod působení metodami western blottingu a průtokové cytometrie. Metodami western blottingu a imunofluorescence byla navíc analyzována schopnost oxysterolů ovlivnit aktivitu jaderného receptoru LXR α/β . Po ovlivnění látkou MK 238-7 v koncentraci 30 μM byl pomocí imunodetekce při prvním pokusu detekován aktivní fragment efektorové kaspázy 7 a štěpný fragment proteinu PARP-1 indikující spuštění procesu apoptózy. U přírodních derivátů ve stejné koncentraci nebyl detekován žádný významný efekt. Bohužel při několika dalších opakováních se nepodařilo dosáhnout stejného výsledku. Při analýze průběhu buněčného cyklu nebyly u žádné testované látky zaznamenány výrazné změny v porovnání s kontrolními vzorky. Současně dle výsledků imunodetekce pravděpodobně žádná z testovaných látek neovlivňovala aktivitu receptoru LXR α/β . Translokaci receptoru LXR α/β metodou imunofluorescence nebylo možné vyhodnotit pravděpodobně kvůli špatnému označení protilátkami.

Přestože syntetické i přírodní látky, analyzované v této práci, neukázaly významnou proapoptotickou aktivitu na buněčné linii HeLa v testovaných koncentracích, není vyloučena jejich možná aktivita při vyšších koncentracích nebo vůči jiné nádorové buněčné linii, protože dle literatury jsou u této skupiny látek cytotoxické vlastnosti velmi závislé na konkrétní látce a testované buněčné linii.

7. Použitá literatura

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M. C., Roberts, K., Walter, P. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Přeložil Bouzek, B., přeložil Hozák, P., přeložil Kotyk, A. Ústí nad Labem: Espero, 2001, 1 sv. ISBN 8090290604.
- Amundson, S. A., Myers, T. G., & Fornace, A. J. (1998). Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: Putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene*, *17*(25), 3287–3299. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202576>
- Avigan, J., Williams, C. D., & Blass, J. P. (1970). Regulation of sterol synthesis in human skin fibroblast cultures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *218*(2), 381–384. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(70\)90162-1](https://doi.org/10.1016/0005-2760(70)90162-1)
- Bartek, J., Bartkova, J., & Lukas, J. (1996). The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Current Opinion in Cell Biology*, *8*(6), 805–814. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(96\)80081-0](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(96)80081-0)
- Bhatla, N., Aoki, D., Sharma, D. N., & Sankaranarayanan, R. (2018). Cancer of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, *143*, 22–36. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12611>
- Bhatla, N., Berek, J. S., Cuello Fredes, M., Denny, L. A., Grenman, S., Karunaratne, K., Kehoe, S. T., Konishi, I., Olawaiye, A. B., Prat, J., Sankaranarayanan, R., Brierley, J., Mutch, D., Querleu, D., Cibula, D., Quinn, M., Botha, H., Sigurd, L., Rice, L., ... Natarajan, J. (2019). Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, *145*(1), 129–135. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12749>
- Boabang, P., Kurbacher, C. M., Kohlhagen, H., Waida, A., & Amo-Takyi, B. K. (2000). Anti-neoplastic activity of topotecan versus cisplatin, etoposide and paclitaxel in four squamous cell cancer cell lines of the female genital tract using an ATP-Tumor Chemosensitivity Assay. *Anti-Cancer Drugs*, *11*(10), 843–848. <https://doi.org/10.1097/00001813-200011000-00008>

- Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., Ghissassi, F. El, Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., & Coglianò, V. (2009). A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *The Lancet Oncology*, *10*(4), 321–322. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70096-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70096-8)
- Brenner, D., & Mak, T. W. (2009). Mitochondrial cell death effectors. *Current Opinion in Cell Biology*, *21*(6), 871–877. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.09.004>
- Brown, A. J., & Jessup, W. (1999). Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, *142*(1), 1–28. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(98\)00196-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(98)00196-8)
- 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>
- Carnevali, I., Di Lauro, E., Pensotti, V., Sahnane, N., Leoni, E., Formenti, G., Ghezzi, F., Sessa, F., & Tibiletti, M. G. (2020). HPV nonrelated endocervical adenocarcinoma in hereditary cancer syndromes. *Tumori*, *106*(6), NP67–NP72. <https://doi.org/10.1177/0300891620936752>
- Carvalho, J. F. S., Silva, M. M. C., Moreira, J. N., Simões, S., & Sá E Melo, M. L. (2010). Sterols as anticancer agents: Synthesis of ring-B oxygenated steroids, cytotoxic profile, and comprehensive SAR analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, *53*(21), 7632–7638. <https://doi.org/10.1021/jm1007769>
- Ceroi, A., Masson, D., Roggy, A., Roumier, C., Chagué, C., Gauthier, T., Philippe, L., Lamarthée, B., Angelot-Delettre, F., Bonnefoy, F., Perruche, S., Biichle, S., Preudhomme, C., Macintyre, E., Lagrost, L., Garnache-Ottou, F., & Saas, P. (2016). LXR agonist treatment of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm restores cholesterol efflux and triggers apoptosis. *Blood*, *128*(23), 2694–2707. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-724807>
- Chen, K., & Shi, W. (2016). Autophagy regulates resistance of non-small cell lung cancer cells to paclitaxel. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *37*(8), 10539–10544. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4929-x>

- Cheng, Y. W., Kang, J. J., Shih, Y. L., Lo, Y. L., & Wang, C. F. (2005). Cholesterol-3-beta, 5-alpha, 6-beta-triol induced genotoxicity through reactive oxygen species formation. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 43(4), 617–622. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.01.007>
- Chuu, C.-P., & Lin, H.-P. (2010). Antiproliferative effect of LXR agonists T0901317 and 22(R)-hydroxycholesterol on multiple human cancer cell lines. *Anticancer Research*, 30(9), 3643–3648. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20944148>
- Cutts, F. T., Franceschi, S., Goldie, S., Castellsague, X., De Sanjose, S., Garnett, G., Edmunds, W. J., Claeys, P., Goldenthal, K. L., Harper, D. M., & Markowitz, L. (2007). Human papillomavirus and HPV vaccines: A review. *Bulletin of the World Health Organization*, 85(9), 719–726. <https://doi.org/10.2471/BLT.06.038414>
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., & Poirier, G. G. (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *The Biochemical Journal*, 342 (Pt 2(2), 249–268. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3420249>
- Darzynkiewicz, Z., Gong, J., Juan, G., Ardelt, B., & Traganos, F. (1996). Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry*, 25(1), 1–13. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19960901\)25:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19960901)25:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-N)
- Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- De Boussac, H., Alioui, A., Viennois, E., Dufour, J., Trousson, A., Vega, A., Guy, L., Volle, D. H., Lobaccaro, J.-M. A., & Baron, S. (2013). Oxysterol receptors and their therapeutic applications in cancer conditions. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17(9), 1029–1038. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.820708>
- de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
- DuSell, C. D., & McDonnell, D. P. (2008). 27-Hydroxycholesterol: a potential endogenous regulator of estrogen receptor signaling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(10), 510–514. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.07.003>

- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8959–8968. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611741200>
- Eckhart, L., Ballaun, C., Hermann, M., VandeBerg, J. L., Sipos, W., Uthman, A., Fischer, H., & Tschachler, E. (2008). Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Molecular Biology and Evolution*, 25(5), 831–841. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn012>
- El Roz, A., Bard, J.-M., Huvelin, J.-M., & Nazih, H. (2012). LXR agonists and ABCG1-dependent cholesterol efflux in MCF-7 breast cancer cells: relation to proliferation and apoptosis. *Anticancer Research*, 32(7), 3007–3013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753765>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Fehrmann, F., & Laimins, L. A. (2003). Human papillomaviruses: Targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*, 22(33 REV. ISS. 2), 5201–5207. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206554>
- Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H.-P., & Novotny, W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(5), 391–400. <https://doi.org/10.1038/nrd1381>
- Florea, A.-M., & Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers*, 3(1), 1351–1371. <https://doi.org/10.3390/cancers3011351>
- Fokdal, L., Sturdza, A., Mazon, R., Haie-Meder, C., Tan, L. T., Gillham, C., Šegedin, B., Jürgenliemk-Schultz, I., Kirisits, C., Hoskin, P., Pötter, R., Lindegaard, J. C., & Tanderup, K. (2016). Image guided adaptive brachytherapy with combined intracavitary and interstitial technique improves the therapeutic ratio in locally advanced cervical cancer: Analysis from the retroEMBRACE study. *Radiotherapy and Oncology*, 120(3), 434–440. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2016.03.020>

- Frattini, A., Fabbri, M., Valli, R., De Paoli, E., Montalbano, G., Gribaldo, L., Pasquali, F., & Maserati, E. (2015). High variability of genomic instability and gene expression profiling in different HeLa clones. *Scientific Reports*, 5, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep15377>
- Friedl, F., Kimura, I., Osato, T., & Ito, Y. (1970). Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma of uterus. I. Its establishment and morphology. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 135(2), 543–545. <https://doi.org/10.3181/00379727-135-35091a>
- Gaffney, D. K., Feix, J. B., Schwarz, H. P., Struve, M. F., & Sieber, F. (1991). Cholesterol content but not plasma membrane fluidity influences the susceptibility of L1210 leukemia cells to merocyanine 540-sensitized irradiation. *Photochemistry and Photobiology*, 54(5), 717–723. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1991.tb02080.x>
- Giaccia, A. J., & Kastan, M. B. (1998). The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes & Development*, 12(19), 2973–2983. <https://doi.org/10.1101/gad.12.19.2973>
- Graña, X., Garriga, J., & Mayol, X. (1998). Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene*, 17(25), 3365–3383. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202575>
- Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Harris, C. C., & Hollstein, M. (1994). Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. *Cancer Research*, 54(18), 4855–4878.
- Grilo, A. L., & Mantalaris, A. (2019). Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology Advances*, 37(3), 459–475. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.012>
- Guillemot-Legrís, O., Mutemberezi, V., & Muccioli, G. G. (2016). Oxysterols in Metabolic Syndrome: From Bystander Molecules to Bioactive Lipids. *Trends in Molecular Medicine*, 22(7), 594–614. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.05.006>

- Haie-Meder, C., Morice, P., Castiglione, M., & ESMO Guidelines Working Group. (2010). Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 21 Suppl 5(SUPPL. 5), v37-40. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq162>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Heng, H. H. (2013). HeLa genome versus donor's genome. *Nature*, 501(7466), 167–167. <https://doi.org/10.1038/501167d>
- Hengstschläger, M., Braun, K., Soucek, T., Miloloza, A., & Hengstschläger-Otnad, E. (1999). Cyclin-dependent kinases at the G1-S transition of the mammalian cell cycle. *Mutation Research*, 436(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(98\)00022-2](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(98)00022-2)
- Hiebert, S. W., Packham, G., Strom, D. K., Haffner, R., Oren, M., Zambetti, G., & Cleveland, J. L. (1995). E2F-1:DP-1 induces p53 and overrides survival factors to trigger apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 15(12), 6864–6874. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.12.6864>
- Horowitz, J. M., Park, S. H., Bogenmann, E., Cheng, J. C., Yandell, D. W., Kaye, F. J., Minna, J. D., Dryja, T. P., & Weinberg, R. A. (1990). Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(7), 2775–2779. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.7.2775>
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2007). Human papillomaviruses. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 90, 1–636. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Monographs+on+the+Evaluation+of+Carcinogenic+Risks+to+Humans+VOLUME+90+Human+Papillo+maviruses#0>

- Ichim, G., & Tait, S. W. G. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews. Cancer*, *16*(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.58>
- Iuliano, L. (2011). Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. *Chemistry and Physics of Lipids*, *164*(6), 457–468. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.06.006>
- Jauniaux, E. (2018). Special Session Abstracts. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, *143*(July), 43–157. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12584>
- 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>
- Kandutsch, A A, Chen, H. W., & Heiniger, H. J. (1978). Biological activity of some oxygenated sterols. *Science (New York, N.Y.)*, *201*(4355), 498–501. <https://doi.org/10.1126/science.663671>
- Kandutsch, Andrew A., & Chen, H. W. (1978). Inhibition of cholesterol synthesis by oxygenated sterols. *Lipids*, *13*(10), 704–707. <https://doi.org/10.1007/BF02533749>
- Kerr, J. F. R. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, *181–182*, 471–474. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00457-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00457-2)
- Kim, M. Y., Zhang, T., & Kraus, W. L. (2005). Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: “PAR-laying” NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes & Development*, *19*(17), 1951–1967. <https://doi.org/10.1101/gad.1331805>
- Kloudova-Spalenkova, A., Holy, P., & Soucek, P. (2021). Oxysterols in cancer management: From therapy to biomarkers. *British Journal of Pharmacology*, *178*(16), 3235–3247. <https://doi.org/10.1111/bph.15273>
- Koh, W.-J., Greer, B. E., Abu-Rustum, N. R., Apte, S. M., Campos, S. M., Cho, K. R., Chu, C., Cohn, D., Crispens, M. A., Dorigo, O., Eifel, P. J., Fisher, C. M., Frederick, P., Gaffney, D. K., Han, E., Huh, W. K., Lurain, J. R., Mutch, D., Fader, A. N., ... Scavone, J. L. (2015). Cervical Cancer, Version 2.2015. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, *13*(4), 395–404; quiz 404. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2015.0055>

- Kohout, L. (1994). 7-Oxo-7 α -oxa-brassinosteroids with Cholestane Side-Chain. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 59(5), 1219–1225. <https://doi.org/10.1135/cccc19941219>
- Kohout, L., & Strnad, M. (1986). Brassinosteroids with a cholestane side chain. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 51(2), 447–458. <https://doi.org/10.1135/cccc19860447>
- Kubbutat, M. H. G., Jones, S. N., & Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 387(6630), 299–303. <https://doi.org/10.1038/387299a0>
- Kucuk, O., Stoner-Picking, J., Yachnin, S., Gordon, L. I., Williams, R. M., Lis, L. J., & Westerman, M. P. (1992). Inhibition of NK cell-mediated cytotoxicity by oxysterols. *Cellular Immunology*, 139(2), 541–549. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(92\)90091-3](https://doi.org/10.1016/0008-8749(92)90091-3)
- Küçük, O., Stoner-Picking, J., Yachnin, S., Gordon, L. I., Williams, R. M., Lis, L. J., & Westerman, M. P. (1994). Inhibition of cytolytic T lymphocyte activity by oxysterols. *Lipids*, 29(9), 657–660. <https://doi.org/10.1007/BF02536101>
- Lantern, C., Musumeci, A., Raccosta, L., Corna, G., Moresco, M., Maggioni, D., Fontana, R., Doglioni, C., Bordignon, C., Traversari, C., & Russo, V. (2016). The administration of drugs inhibiting cholesterol/oxysterol synthesis is safe and increases the efficacy of immunotherapeutic regimens in tumor-bearing mice. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 65(11), 1303–1315. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1884-8>
- Lappano, R., Recchia, A. G., de Francesco, E. M., Angelone, T., Cerra, M. C., Picard, D., & Maggiolini, M. (2011). The cholesterol metabolite 25-Hydroxycholesterol activates estrogen receptor α -Mediated signaling in cancer cells and in cardiomyocytes. *PLoS ONE*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016631>
- Levy, D., Correa de Melo, T., Ohira, B. Y., Fidelis, M. L., Ruiz, J. L. M., Rodrigues, A., & Bydlowski, S. P. (2018). Oxysterols selectively promote short-term apoptosis in tumor cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 505(4), 1043–1049. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.008>

- Levy, D., de Melo, T. C., Oliveira, B. A., Paz, J. L., de Freitas, F. A., Reichert, C. O., Rodrigues, A., & Bydlowski, S. P. (2019). 7-Ketocholesterol and cholestane-triol increase expression of SMO and LXRA signaling pathways in a human breast cancer cell line. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *19*(November 2018), 100604. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.12.008>
- Lim, H.-K., Kang, H.-K., Yoo, E.-S., Kim, B.-J., Kim, Y.-W., Cho, M., Lee, J.-H., Lee, Y.-S., Chung, M.-H., & Hyun, J.-W. (2003). Oxysterols induce apoptosis and accumulation of cell cycle at G(2)/M phase in the human monocytic THP-1 cell line. *Life Sciences*, *72*(12), 1389–1399. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)02377-9](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(02)02377-9)
- Lin, C.-Y., Huo, C., Kuo, L.-K., Hiipakka, R. A., Jones, R. B., Lin, H.-P., Hung, Y., Su, L.-C., Tseng, J.-C., Kuo, Y.-Y., Wang, Y.-L., Fukui, Y., Kao, Y.-H., Kokontis, J. M., Yeh, C.-C., Chen, L., Yang, S.-D., Fu, H.-H., Chen, Y.-W., Tsai, K. K. C., Chang, J.-Y., Chuu, C.-P. (2013). Cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol suppresses proliferation, migration, and invasion of human prostate cancer cells. *PloS One*, *8*(6), e65734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065734>
- Lipinski, M. M., & Jacks, T. (1999). The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene*, *18*(55), 7873–7882. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203244>
- Lo Sasso, G., Bovenga, F., Murzilli, S., Salvatore, L., Di Tullio, G., Martelli, N., D’Orazio, A., Rainaldi, S., Vacca, M., Mangia, A., Palasciano, G., & Moschetta, A. (2013). Liver X receptors inhibit proliferation of human colorectal cancer cells and growth of intestinal tumors in mice. *Gastroenterology*, *144*(7), 1497–1507, 1507.e1-13. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.02.005>
- Lopez, J., & Tait, S. W. G. (2015). Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within. *British Journal of Cancer*, *112*(March), 957–962. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.85>
- 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>

- Lucey, B. P., Nelson-Rees, W. A., & Hutchins, G. M. (2009). Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *133*(9), 1463–1467. <https://doi.org/10.5858/133.9.1463>
- Luoma, P. V. (2007). Cytochrome P450--physiological key factor against cholesterol accumulation and the atherosclerotic vascular process. *Annals of Medicine*, *39*(5), 359–370. <https://doi.org/10.1080/07853890701379767>
- 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*, 447–467. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103233>
- Lyapun, I. N., Andryukov, B. G., & Bynina, M. P. (2019). HeLa Cell Culture: Immortal Heritage of Henrietta Lacks. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, *34*(4), 195–200. <https://doi.org/10.3103/S0891416819040050>
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *1*(3), 222–231. <https://doi.org/10.1038/35106065>
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews. Cancer*, *9*(3), 153–166. <https://doi.org/10.1038/nrc2602>
- Massey, J. B. (2006). Membrane and protein interactions of oxysterols. *Current Opinion in Lipidology*, *17*(3), 296–301. <https://doi.org/10.1097/01.mol.0000226123.17629.ab>
- Masters, J. R. W. (2000). Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *1*(3), 233–236. <https://doi.org/10.1038/35043102>
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(4), a008656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
- Meissner, J. D. (1999). Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *The Journal of General Virology*, *80* (Pt 7)(7), 1725–1733. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-7-1725>

- Meynier, A., Andre, A., Lherminier, J., Grandgirard, A., & Demaison, L. (2005). Dietary oxysterols induce in vivo toxicity of coronary endothelial and smooth muscle cells. *European Journal of Nutrition*, 44(7), 393–405. <https://doi.org/10.1007/s00394-005-0539-x>
- Moran, E. (1993). Interaction of adenoviral proteins with pRB and p53. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7(10), 880–885. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.10.8344487>
- Morgan, D. O. (2007). *Primers in Biology The Cell Cycle Primers in Biology : Protein Structure and Function Forthcoming titles :*
- Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., Snijders, P. J. F., & Meijer, C. J. L. M. (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(6), 518–527. <https://doi.org/10.1056/nejmoa021641>
- Murray, A. (1994). Cell cycle checkpoints. *Current Opinion in Cell Biology*, 6(6), 872–876. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90059-0)
- 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>
- Nevins, J. R. (1994). Cell cycle targets of the DNA tumor viruses. *Current Opinion in Genetics & Development*, 4(1), 130–134. [https://doi.org/10.1016/0959-437x\(94\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0959-437x(94)90101-5)
- Obeng, E. (2021). Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, 81(4), 1133–1143. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437>
- Olkkonen, V. M., Béaslas, O., & Nissilä, E. (2012). Oxysterols and their cellular effectors. *Biomolecules*, 2(1), 76–103. <https://doi.org/10.3390/biom2010076>
- Olkkonen, V. M., & Hynynen, R. (2009). Interactions of oxysterols with membranes and proteins. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(3), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.004>

- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(7), 552–565. <https://doi.org/10.1038/nrm1150>
- Ortega, S., Malumbres, M., & Barbacid, M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1602(1), 73–87. [https://doi.org/10.1016/s0304-419x\(02\)00037-9](https://doi.org/10.1016/s0304-419x(02)00037-9)
- Pandey, U. (2017). What is Cervical Cancer? *Journal of Gynecology and Womens Health*, 2(5), 1–9. <https://doi.org/10.19080/JGWH.2017.02.555599>
- Pattillo, R. A., Husa, R. O., Story, M. T., Ruckert, A. C., Shalaby, M. R., & Mattingly, R. F. (1977). Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. *Science (New York, N.Y.)*, 196(4297), 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.867042>
- Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S., & Piwnicka-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), 1501–1505. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1501>
- Pines, A., Mullenders, L. H., van Attikum, H., & Luijsterburg, M. S. (2013). Touching base with PARPs: moonlighting in the repair of UV lesions and double-strand breaks. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(6), 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.03.002>
- Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Advances in Cancer Research*, 66, 181–212. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60254-7](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60254-7)
- Prunet, C., Lemaire-Ewing, S., Ménétrier, F., Néel, D., & Lizard, G. (2005). Activation of caspase-3-dependent and -independent pathways during 7-ketocholesterol- and 7beta-hydroxycholesterol-induced cell death: a morphological and biochemical study. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19(5), 311–326. <https://doi.org/10.1002/jbt.20096>
- Kolář, Z., Kohout, L., Kvasnica, M., & Strnad, M. (2018). The novel brassinosteroid analog BR4848 inhibits angiogenesis in human endothelial cells and induces apoptosis in human cancer cells in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 178(January), 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.01.005>

- Rárová, L., Steigerová, J., Kvasnica, M., Bartůněk, P., Křížová, K., Chodounská, H., Kolář, Z., Sedlák, D., Oklestkova, J., & Strnad, M. (2016). Structure activity relationship studies on cytotoxicity and the effects on steroid receptors of AB-functionalized cholestanes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *159*, 154–169. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.017>
- Riedl, S. J., Fuentes-Prior, P., Renatus, M., Kairies, N., Krapp, S., Huber, R., Salvesen, G. S., & Bode, W. (2001). Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(26), 14790–14795. <https://doi.org/10.1073/pnas.221580098>
- Romero-Garcia, S., Lopez-Gonzalez, J. S., Báez-Viveros, J. L., Aguilar-Cazares, D., & Prado-Garcia, H. (2011). Tumor cell metabolism: an integral view. *Cancer Biology & Therapy*, *12*(11), 939–948. <https://doi.org/10.4161/cbt.12.11.18140>
- Rosa Fernandes, L., Stern, A. C. B., Cavaglieri, R. de C., Nogueira, F. C. S., Domont, G., Palmisano, G., & Bydlowski, S. P. (2017). 7-Ketocholesterol overcomes drug resistance in chronic myeloid leukemia cell lines beyond MDR1 mechanism. *Journal of Proteomics*, *151*, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.011>
- Rothblat, G. H., & Buchko, M. K. (1971). Effect of exogenous steroids on sterol synthesis in L-cell mouse fibroblasts. *Journal of Lipid Research*, *12*(6), 647–652. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)39451-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)39451-7)
- Ryan, E., Chopra, J., McCarthy, F., Maguire, A. R., & O'Brien, N. M. (2005). Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxic and apoptotic potential of phytosterol oxidation products with their corresponding cholesterol oxidation products. *The British Journal of Nutrition*, *94*(3), 443–451. <https://doi.org/10.1079/bjn20051500>
- Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W., & Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes & Development*, *12*(18), 2831–2841. <https://doi.org/10.1101/gad.12.18.2831>
- Samadi, A., Sabuncuoglu, S., Samadi, M., Isikhan, S. Y., Chirumbolo, S., Peana, M., Lay, I., Yalcinkaya, A., & Bjørklund, G. (2021). A Comprehensive Review on Oxysterols and Related Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, *28*(1), 110–136. <https://doi.org/10.2174/0929867327666200316142659>

- Sankaranarayanan, R. (2014). Screening for Cancer in Low- and Middle-Income Countries. *Annals of Global Health*, 80(5), 412. <https://doi.org/10.1016/j.aogh.2014.09.014>
- Satoh, M. S., & Lindahl, T. (1992). Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature*, 356(6367), 356–358. <https://doi.org/10.1038/356356a0>
- Schafer, K. A. (1998). The cell cycle: a review. *Veterinary Pathology*, 35(6), 461–478. <https://doi.org/10.1177/030098589803500601>
- Scheffner, M. (1998). Ubiquitin, E6-AP, and their role in p53 inactivation. *Pharmacology and Therapeutics*, 78(3), 129–139. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(98\)00003-5](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(98)00003-5)
- Schroepfer, G. J. (2000). Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiological Reviews*, 80(1), 361–554. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.361>
- Sever, N., Yang, T., Brown, M. S., Goldstein, J. L., & DeBose-Boyd, R. A. (2003). Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Molecular Cell*, 11(1), 25–33. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00822-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00822-5)
- Shimada, K., Mitamura, K., & Higashi, T. (2001). Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. *Journal of Chromatography A*, 935(1–2), 141–172. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)00943-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)00943-8)
- Silva, S. F., Levy, D., Ruiz, J. L. M., de Melo, T. C., Isaac, C., Fidelis, M. L., Rodrigues, A., & Bydlowski, S. P. (2017). Oxysterols in adipose tissue-derived mesenchymal stem cell proliferation and death. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 169, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.04.017>
- Silvente-Poirot, S., & Poirot, M. (2012). Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(6), 696–703. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.07.007>
- Small, W., Bacon, M. A., Bajaj, A., Chuang, L. T., Fisher, B. J., Harkenrider, M. M., Jhingran, A., Kitchener, H. C., Mileskin, L. R., Viswanathan, A. N., & Gaffney, D. K. (2017). Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer*, 123(13), 2404–2412. <https://doi.org/10.1002/cncr.30667>

- Soldani, C., Lazzè, M. C., Bottone, M. G., Tognon, G., Biggiogera, M., Pellicciari, C. E., & Scovassi, A. I. (2001). Poly(ADP-ribose) polymerase cleavage during apoptosis: when and where? *Experimental Cell Research*, 269(2), 193–201. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5293>
- Soung, Y. H., Lee, J. W., Kim, H. S., Park, W. S., Kim, S. Y., Lee, J. H., Park, J. Y., Cho, Y. G., Kim, C. J., Park, Y. G., Nam, S. W., Jeong, S. W., Kim, S. H., Lee, J. Y., Yoo, N. J., & Lee, S. H. (2003). Inactivating mutations of CASPASE-7 gene in human cancers. *Oncogene*, 22(39), 8048–8052. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206727>
- Tavazoie, M. F., Pollack, I., Tanqueco, R., Ostendorf, B. N., Reis, B. S., Gonsalves, F. C., Kurth, I., Andreu-Agullo, C., Derbyshire, M. L., Posada, J., Takeda, S., Tafreshian, K. N., Rowinsky, E., Szarek, M., Waltzman, R. J., Mcmillan, E. A., Zhao, C., Mita, M., Mita, A., ... Tavazoie, S. F. (2018). LXR/ApoE Activation Restricts Innate Immune Suppression in Cancer. *Cell*, 172(4), 825-840.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.026>
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(3), 231–241. <https://doi.org/10.1038/nrm2312>
- Tommasino, M. (2014). The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 26, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.11.002>
- Vakifahmetoglu-Norberg, H., & Zhivotovsky, B. (2010). The unpredictable caspase-2: what can it do? *Trends in Cell Biology*, 20(3), 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.12.006>
- 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>
- Vogt Sionov, R., & Haupt, Y. (1999). The cellular response to p53: The decision between life and death. *Oncogene*, 18(45), 6145–6157. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203130>

- Voisin, M., de Medina, P., Mallinger, A., Dalenc, F., Huc-Claustre, E., Leignadier, J., Serhan, N., Soules, R., Ségala, G., Mougel, A., Noguer, E., Mhamdi, L., Bacquié, E., Iuliano, L., Zerbinati, C., Lacroix-Triki, M., Chaltiel, L., Filleron, T., Cavallès, V., Al Saati, T., Rochaix, P., Duprez-Paumier, R., Franchet, C., Ligat, L. Lopez, F., Record, M., Poirot, M., Silvente-Poirot, S. (2017). Identification of a tumor-promoter cholesterol metabolite in human breast cancers acting through the glucocorticoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(44), E9346–E9355. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707965114>
- Voisin, M., Silvente-Poirot, S., & Poirot, M. (2014). One step synthesis of 6-oxo-cholestan-3 β ,5 α -diol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *446*(3), 782–785. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.138>
- Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., & Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, *369*(6481), 574–578. <https://doi.org/10.1038/369574a0>
- Waggoner, S. E., & Chernicky, C. L. (2004). Molecular Biology of Cervical and Vulvar Carcinoma. In *Gynecologic Cancer: Controversies in Management*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-07142-3.50008-7>
- Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5573), 1635–1636. <https://doi.org/10.1126/science.1071553>
- Wang, C.-W., Huang, C.-C., Chou, P.-H., Chang, Y.-P., Wei, S., Guengerich, F. P., Chou, Y.-C., Wang, S.-F., Lai, P.-S., Souček, P., & Ueng, Y.-F. (2017). 7-ketocholesterol and 27-hydroxycholesterol decreased doxorubicin sensitivity in breast cancer cells: estrogenic activity and mTOR pathway. *Oncotarget*, *8*(39), 66033–66050. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19789>
- Wang, X. W., Zhan, Q., Coursen, J. D., Khan, M. A., Kontny, H. U., Yu, L., Hollander, M. C., O'Connor, P. M., Fornace, A. J., & Harris, C. C. (1999). GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(7), 3706–3711. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3706>

- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., & McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9), 2325–2327. <https://doi.org/10.1021/ja00738a045>
- Watson, M., Saraiya, M., Benard, V., Coughlin, S. S., Flowers, L., Cokkinides, V., Schwenn, M., Huang, Y., & Giuliano, A. (2008). Burden of cervical cancer in the United States, 1998-2003. *Cancer*, 113(10 SUPPL.), 2855–2864. <https://doi.org/10.1002/cncr.23756>
- Weaver, B. A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*, 25(18), 2677–2681. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-04-0916>
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81(3), 323–330. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90385-2)
- Weinlich, R., Oberst, A., Beere, H. M., & Green, D. R. (2017). Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 18(2), 127–136. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.149>
- Wenzel, E. S., & Singh, A. T. K. (2018). Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer. *In Vivo*, 32(1), 1–5. <https://doi.org/10.21873/invivo.11197>
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.11.014>
- You, J.-S., Lim, H., Kim, T.-H., Oh, J.-S., Lee, G.-J., Seo, Y.-S., Kim, D. K., Yu, S.-K., Kim, H.-J., Kim, C. S., & Kim, J.-S. (2020). 25-Hydroxycholesterol Induces Death Receptor-mediated Extrinsic and Mitochondria-dependent Intrinsic Apoptosis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Anticancer Research*, 40(2), 779–788. <https://doi.org/10.21873/anticanres.14009>
- Zetterberg, A., Larsson, O., & Wiman, K. G. (1995). What is the restriction point? *Current Opinion in Cell Biology*, 7(6), 835–842. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80067-0](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80067-0)
- Zhang, D., Yang, R., Wang, S., & Dong, Z. (2014). Paclitaxel: new uses for an old drug. *Drug Design, Development and Therapy*, 8, 279–284. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S56801>

- Zhang, W., Jiang, H., Zhang, J., Zhang, Y., Liu, A., Zhao, Y., Zhu, X., Lin, Z., & Yuan, X. (2014). Liver X receptor activation induces apoptosis of melanoma cell through caspase pathway. *Cancer Cell International*, *14*(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-14-16>
- Zhu, L., & Chen, L. (2019). Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. *Cellular & Molecular Biology Letters*, *24*(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s11658-019-0164-y>
- zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, *2*(5), 342–350. <https://doi.org/10.1038/nrc798>