

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2015

Lenka Baková

**Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů**



**Deriváty cytokininů a jejich vliv na délku života
*Caenorhabditis elegans***

Bakalářská práce

Lenka Baková

Studijní program: Biologie
Obor: Experimentální biologie
Forma studia: denní

Olomouc 2015

vedoucí práce: Kadlecová Alena, Mgr.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Lenka Baková
Název práce	Deriváty cytokininů a jejich vliv na délku života <i>Caenorhabditis elegans</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Alena Kadlecová
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	<i>Caenorhabditis elegans</i> je modelový organismus, využívaný mimo jiné i v oblasti výzkumu stárnutí. Fytohormon kinetin je schopen pozitivně ovlivňovat známky stárnutí v různých experimentálních systémech - mj. prodlužuje život některých bezobratlých včetně modelové hlístice <i>C. elegans</i>. V této práci jsem testovala vliv 32 cytokininů substituovaných v pozici 8 purinu na délku života <i>C. elegans</i>. V iniciálním skřínkku jsem identifikovala 8 potenciálně aktivních derivátů a aktivitu některých z nich potvrdila v následném experimentu na rozsáhlých populacích.
Klíčová slova	<i>Caenorhabditis elegans</i> , stárnutí, cytokininy, skřínk
Počet stran	57
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Lenka Baková
Title of thesis	Derivatives of cytokinins and their impact on the life expectancy of <i>Caenorhabditis elegans</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Alena Kadlecová
The year of presentation	2015
Abstract	<i>Caenorhabditis elegans</i> is a model organism used among others in the field of aging research. Phytohormone kinetin slows down aging related changes in various experimental systems. It prolongs lifespan of certain invertebrates including model nematode <i>C. elegans</i>. In this study, effect of 32 cytokinins substituted in position 8 of purine ring on <i>C. elegans</i> lifespan was evaluated. The activity of several compounds among 8 hits from primary screen was confirmed on large populations
Keywords	<i>Caenorhabditis elegans</i> , aging, cytokinins, screening
Number of pages	57
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že tato práce je mým původním dílem, které jsem vytvořila sama. Všechny zdroje, které jsem použila při zpracování této práce, jsou řádně citovány a uvedeny v odkazech.

V Olomouci,

Lenka Baková

Chtěla bych poděkovat Mgr. Aleně Kadlecové za její čas, ochotu a trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Jiřímu Vollerovi, Ph.D. za jeho odborné rady, které mi poskytl při řešení zadané problematiky. Také bych ráda poděkovala zaměstnancům Laboratoře růstových regulátorů, kteří mi vždy byli nápomocni.

Obsah

Cíle práce	8
Úvod.....	9
1 Současný stav řešené problematiky	10
1.1 Ceanorhabditis elegans.....	10
1.1.1 Vývoj a rozmnožování.....	11
1.2 Historie.....	13
1.3 Stárnutí.....	15
1.3.1 Teorie volných radikálů.....	15
1.3.2 Genetická teorie stárnutí.....	16
1.3.3 Pacemakerové teorie stárnutí.....	16
1.4 „Lifespan“ a „Healthspan“.....	17
1.5 Výhody využívání <i>C. elegans</i> ve výzkumu.....	18
1.6 Skrínink látek na <i>C. elegans</i>	19
1.6.1 Skrínink látek s potenciálním uplatněním v medicíně.....	19
1.6.2 Význam <i>C. elegans</i> pro vývoj antibiotik a antimykotik.....	20
1.6.3 Význam <i>C. elegans</i> pro vývoj anthelmintik.....	20
1.7 Cytokininy.....	21
2 Materiál.....	22
2.1 Materiál.....	22
2.2 Testované látky.....	22
2.3 Média.....	23
2.4 Metody.....	26
2.4.1 Příprava bakterií.....	26
2.4.2 Příprava suspenze bakterií <i>E. coli</i> OP50 v S-complete.....	26
2.4.3 Příprava NGM misek.....	26
2.4.4 Transfer háďátek.....	26
2.4.5 Sjednávání věku háďátek.....	26
2.4.6 Krystalizace látek v S-kompletním médiu.....	27
2.4.7 Ověřování vlivu amfotericinu B na <i>C. elegans</i>	27
2.4.8 Vliv amfotericinu B v kombinaci s DMSO na <i>C. elegans</i>	28
2.4.9 Určení vlivu vybraných látek na délku <i>C. elegans</i>	28
3 Výsledky a diskuse.....	29
3.1 Ověřování vlivu amfotericinu B na <i>C. elegans</i>	29

3.2	Vliv amfotericinu B k kombinaci s DMSO na <i>C. elegans</i>	29
3.3	Precipitace látek v S kompletním médiu.....	30
3.4	Testování vybraných látek	31
3.5	Opakování experimentu s potencionálně aktivními látkami.....	33
Závěr		50
Seznam zkratk:		51

Cíle práce

Cílem této práce bylo vypracování literární rešerše o možnostech využití *C. elegans* při vývoji léčiv. Dalším cílem byla optimalizace podmínek pro testování efektu látek na délku života *C. elegans* a testování vybraných derivátů fytohormonů cytokininů.

Úvod

Ceanorhabditis elegans je volně žijící, neparazitická, asi 1mm velká půdní hlístice. Využívání hád'átka v laboratoři má řadu výhod. Náklady spjaté s jeho kultivací jsou nízké, má rychlý životní cyklus a rychle se množí, je průhledné, dobře diferencované atd. Genom *C. elegans* je malý a byl plně zmapován. K dispozici je velké množství mutantních, modelových či reportérových linií. Díky tomu našla *C. elegans* využití v oblastech základního výzkumu jako je například studium buněčné smrti, diferenciace a stárnutí. Používá se ale také pro skrínink potenciálních léčiv a dalších studium jejich mechanismu účinku.

V této práci byl testován vliv cytokininů substituovaných v pozici 8 purinu na délku života *C. elegans* a podařilo se mi identifikovat několik potenciálně aktivních látek.

1 Současný stav řešené problematiky

1.1 *Ceanorhabditis elegans*

Ceanorhabditis elegans (*C. elegans*), česky háďátka obecné, patří do říše *Animalia*, kmen *Nematoda*, třída *Chromadorea*, řád *Rhabditida*, čeleď *Rhabditidae* rod *Ceanorhabditis*. Běžně žije v půdě a kompostu. Na rozdíl od jiných háďátek, např. řepného, není parazit, ale živí se bakteriemi. Dorůstá délky asi 1 mm. Přirozeně se vyskytuje v mírných podmínkách. Vývoj *C. elegans* probíhá vysoce reprodukovatelně. Výsledkem jsou jedinci, kteří mají vždy stejný počet somatických buněk. Buňky se dělí a procházejí apoptózou v určených časových bodech a je možné tento proces přesně zmapovat [1].

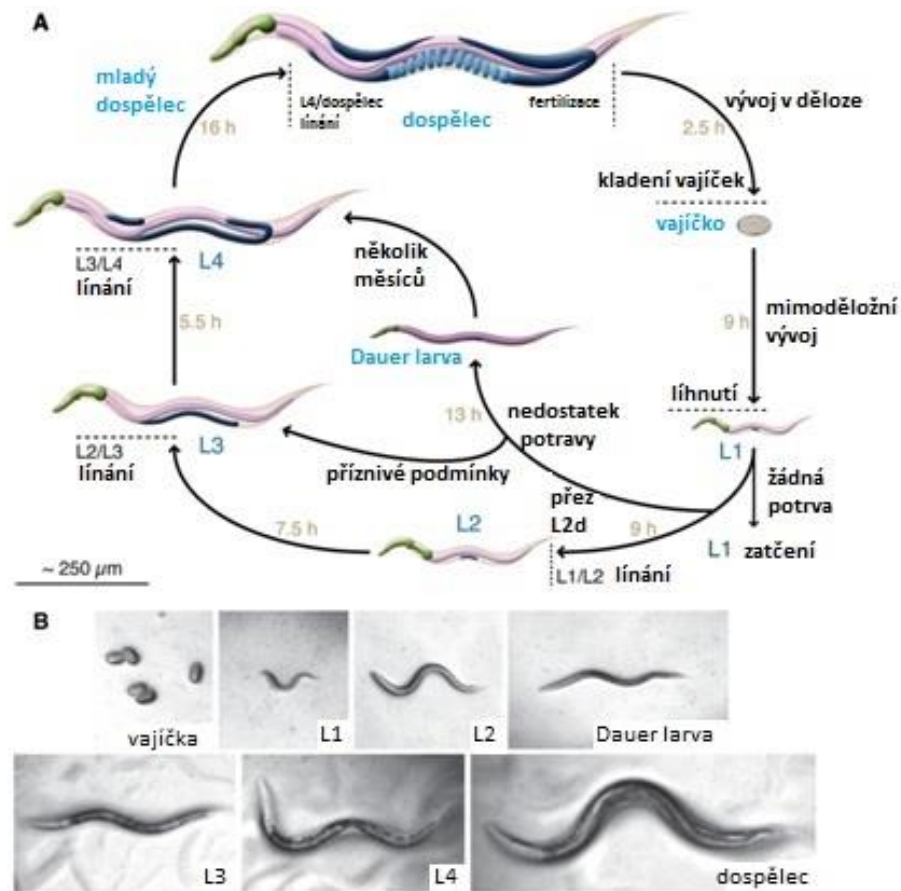
Háďátka postrádají dýchací a oběhový systém [2]. Tělo je bilaterálně symetrické, pokryté pokožkou a kutikulou. Mezi tělní stěnou a trávicím traktem je pseudocoelom (tělní dutina vyplněná tekutinou). Tato tekutina nahrazuje oběhovou soustavu a slouží také jako hydrostatická kostra. Kromě orgánů trávicí soustavy jsou v pseudocoelomu také uloženy pohlaví orgány[3].

Trávicí soustava je úplná, trubicovitá. Potrava je získávána nasáváním tekutiny pomocí pharyngeálního svalu z okolí spolu se suspendovanými částicemi a bakteriemi[4]. Pharyngeální sval je schopen fungovat i bez nervových signálů, ale za normálních okolností jej ovlivňují dva typy hltanových hybných neuronů [5]. Hltan je složen z 60 buněk: 34 svalových buněk, 20 neuronů, 4 žlázových buněk, 9 epitelových buněk a 9 marginálních imunitních buněk. Další posun potravy zajišťují kontrakce šijových svalů, které ovlivňuje motorický neuron. *C. elegans* je schopno rozlišit, které bakterie jsou výživnější a vybírat si [6].

Tyto hlístice mají nervový systém složený z 302 neuronů. Jednoduchost nervové soustavy byla klíčovým prvkem pro S. Brennera, aby *C. elegans* vybral jako nový modelový organizmus [7]. Neurony jsou shromážděny v přední části těla v primitivním mozku zvaném nervový kruh. Všechna spojení, která tyto neurony tvoří, byla zmapována v kompletní schémata. Jejich hlavní funkcí je inervovat svaly, které vedou podélně tělem ve čtyřech kvadrantech, což vede k sinusovému typu pohybu. Nervový systém přispívá k různému chování, které lze pozorovat, včetně reakce na mírné a drsné doteky, pohyb směrem k potravě a dalším atraktantům i pohyb od nežádoucího prostředí, například chemických látek[8].

1.1.1 Vývoj a rozmnožování

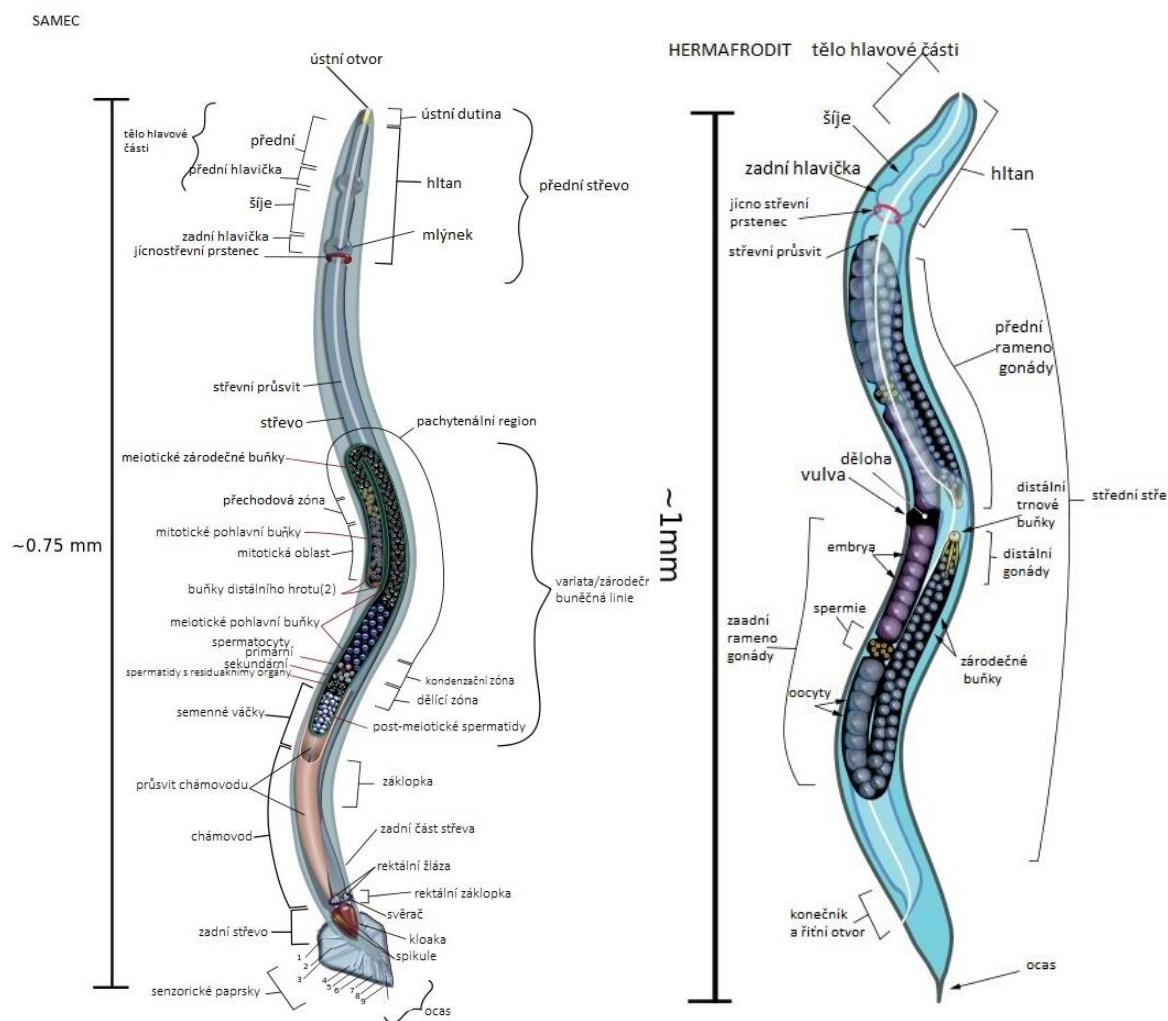
Rychlost vývoje trvá za optimálních podmínek pouhé tři dny. Hád'átko prochází čtyřmi larválními stádii, než doroste v rozmnožování schopného dospělého (obr.1)[9].



Obr. 1: životní cyklus *C. elegans* (Zdroj: Erkut, Cihan (2014): *C. elegans* life cycle and developmental stages. figshare. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1096220>

Životní cyklus *C. elegans* se skládá z několika fází. Vývoj začíná uvnitř hermafrodita. Hermafrodit naklade vajíčka, jakmile je embryo ve stádiu, kdy má přibližně 28-30 buněk. Embryogeneze je pak dokončena mimo tělo rodiče v průběhu asi 13 hodin. Těsně před vylíhnutím vajíčko obsahuje larvu složenou z 556 buněk a dvou primordiálních zárodečných buněk. Larva dále prochází vývojovými stádii L1 – L4 a za příznivých podmínek se vyvine až v dospělého [10]. Za nepříznivých podmínek se vývoj larvy může zastavit ve stádiu L1, starší larvy mohou také vytvořit tzv. *dauer* larvu. *Dauer* larvy jsou vysoce odolné proti nepříznivým vlivům okolí a vydrží bez potravy až několik měsíců. Pokud se podmínky v okolí zlepší, jedinec pokračuje ve vývoji [9]. Geny, které řídí rozhodnutí vstoupit do *dauer* dráhy jsou homology inzulinové signální dráhy obratlovců a mnoho z nich hraje roli v dlouhověkosti *C. elegans*. Pokud jsou

okolní podmínky příznivé (např. přítomnost potravy) larva prochází prostřednictvím čtyř etap, které jsou přerušovány línáním [11].



Obr. 3: *C. elegans* hermafrodit – popis stavby těla: hermafrodit vytváří vajíčka a později i spermie, v jeho těle dochází samooplození, nebo oplození samčími spermii.

Obr. 2: *C. elegans* samec – popis stavby těla: samec je menší a štíhlejší než hermafrodit, má vějířovitý ocas, který se skládá ze struktur potřebných k páření.

Jsou známy dva typy pohlaví, samci a hermafroditi. Hermafroditi ve čtvrtém larválním stádiu tvoří a ukládají spermie. Mezi dozráním vajíček a spermií u hermafrodita je prodleva, u samců dozrávají spermie o něco dříve a proto když je v okolí samec, oplodní hermafrodita preferenčně. Při páření se samcem vzniká také více potomstva. Schopnost samooplození je nicméně evoluční výhoda, díky níž stačí pouze jedno

háďátko pro kolonizaci nového území. Samci jsou užiteční jako dárci nové kombinace genů, která zaručí vitalitu populace. To je nejspíše důvod udržení samčího pohlaví, které by jinak bylo pro reprodukci postradatelné [12].

Hermafroditi jsou diploidní, s pěti páry autozomů a dvěma chromozómy X. Samci mají také pět párů autozomů, ale pouze jeden chromozóm X (X0). Téměř všechny gamety, vajíčka i spermie produkované hermafrodity jsou haploidní s chromozómem X a to vede ke tvorbě dalších hermafroditů XX. Spontánní ztráta chromosomu X vede k produkci samčích jedinců, embrya XXX jsou letální. Samci produkují gamety s chromozómem X ale i gamety bez X v poměru 1:1, proto při oplodnění samcem vzniká polovina samců a polovina hermafroditů [13]. Důležitým znakem je, že jejich embryogeneze probíhá přesným, druhově-specifickým způsobem po každou generaci. Při larválním vývoji se ze somatických základových buněk tvoří různé typy tkání s konstantním počtem buněk. Vývoj každé somatické buňky může být rekonstruován pomocí sledování dělení zárodečných linií za použití vitálních markerů, jako jsou fluorescenční barviva, protilátky a reportérové geny. Roli jednotlivých buněk ve vývoji tkáně je možné zkoumat i jejich odstraněním nebo zničením buněk laserem. Samci i hermafroditi mají společných asi 650 buněk. Samci mají v dospělosti 1031 somatických buněk, hermafroditi 959 somatických buněk [14].

Většina struktur potřebných k páření je dimorfní. Samci mají vysoce specializované reprodukční struktury v ocasní části. Gonády každého pohlaví mají různé struktury a funkce, dimorfní neurony a svaly. Ronald Ellis a jeho tým z New Jersey zjistili, že v závislosti na počtu chromozomů X buňky pohlavních orgánů aktivují signální dráhu řídící vývoj odpovídajících pohlavních orgánů. Klíčový je protein je TRA-2. U samců je neaktivní, samčí geny se mohou projevit. Pro projev genů hermafroditů je nezbytné, aby byl TRA-2 naopak aktivní. Během krátkého období však i u hermafroditů dochází k potlačení aktivity TRA-2, konkrétně při tvorbě spermií, které pak stačí na zbytek života. K předčasné aktivaci spermií brání protein SWM-1 [15].

1.2 Historie

Před zhruba půl stoletím se začal háďátkem zabývat jihoafrický vědec, syn ševce, Sydney Brenner. Zasloužil se o to, že se tato hlístice zařadila mezi modelové organismy, mezi které dále patří například octomilka, myš nebo huseníček. Zmapoval spoje všech 303 neuronů [16,17].

V roce 2002 dostal Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství spolu s Robertem Horvitzem a Johnem Sulstonem za své objevy „genetické regulace vývoje orgánů a buněčné smrti“. John Sulston sledoval vývoj všech buněk a zjistil, že vzniká 1090 somatických jader. Dospělec má 959 jader, 131 jich umírá programovanou smrtí. Pokud se tento jev naruší, vznikají vývojové deformace. Robert Horovitz se zabýval apoptózou, zkoumal receptor pro epidermální růstový faktor (EGF) a protein RAS. Tato dráha se vyskytuje i u člověka, kde má přímou souvislost s rakovinou [18].

Další Nobelova cena spjatá s tímto organismem byla v roce 2006 za fyziologii a lékařství, kterou získali Andrew Z. Fire a Craig C. Mello za výzkum RNA interference [19].

Zatím poslední Nobelova cena, ke které háďátko přispělo, byla udělena v roce 2008 za chemii, konkrétně za objev a výzkum zeleného fluorescenčního proteinu, na kterém se podíleli Osamu Šimomura, Roger Y. Tsien a Martin Chalfie, který háďátko používal [20].

Dnes se využívá i v oblasti molekulární biologie, pro metody reverzní genetiky, neurobiologie, ekologie, evoluční biologie, biofyziky a ve výzkumu týkajícím se nemocí jako je rakovina [21], metabolické poruchy [22] nebo neurodegenerativní onemocnění [23].

V roce 1998 se tato hlístice stala prvním mnohobuněčným organismem, jehož DNA byla plně sekvenována [24].

C. elegans je důležitý zdroj informací i při zkoumání procesů stárnutí [25]. Prvním výrazným objevem v této oblasti byl objev mutace v genu *daf-2*, která prodloužila délku života *Caenorhabditis elegans* na dvojnásobek v porovnání s divokým kmenem. Gen *daf-2* kóduje receptorovou tyrosin kinázu [26]. Pro efekt mutace v *daf-2* je vyžadována aktivita dalšího genu, *daf-16*. *Daf-16* patří do rodiny FOXO transkripčních faktorů a jeho mutace nejenže ruší efekt mutace v genu *daf-2*, ale sama o sobě také délku života u *C. elegans* snižuje. Oběgeny patří do dráhy nazývané „insulin/insulin-like growth factor pathway“ (IIS) a regulují také tvorbu *dauer* larev. Mutace v dalších komponentách IIS také ovlivňují délku života, například mutace v genu *age-1*, kódujícím fosfatidylinositol-3 kinázu, může prodloužit délku života *C. elegans* až na desetinásobek [27]. Mutace v IIS jsou spjaté se stárnutím i u jiných organismů, jako jsou kvasinky, octové mušky, hlodavci a pravděpodobně i opice a lidé [28].

1.3 Stárnutí

Stárnutí (senescence) je proces, který se projevuje chátráním tělesné schránky a snižováním efektivity a účinnosti fungování organismu, hromaděním různých defektů v organismu a jeho klesající schopností tyto defekty opravovat a nahrazovat vadné či odumřelé buňky novými. Dochází k vyšší náchylnosti k různým nemocem a může skončit smrtí, pokud daný jedinec nezemře z jiných důvodů již dříve. Můžeme ho chápat jako interakci prostředí a genů.

Existuje několik teorií, které se pokoušejí stárnutí vysvětlit. Několik z nich je rozebráno níže. V současné době je ve výzkumu v oblasti teoretické gerontologie typické rostoucí množství dílčích poznatků. Prozatím však neexistuje jedna univerzální teorie. Žádná ze současných teorií nevysvětluje všechny stránky procesu stárnutí a nedává do přímých souvislostí změny během stárnutí pro hlavní organizační úroveň celého organismu. Teorie se navzájem nevyvracejí, všechny tedy mohou být alespoň částečně pravdivé a nejbližší reálnému stavu bude nějaká jejich kombinace.

1.3.1 Teorie volných radikálů

Volné radikály jsou velmi reaktivní atomy nebo molekuly. Vysoká reaktivita je způsobena přítomností nespárovaného elektronu. Předpokládá se, že se mohou podílet na vzniku různých chorob, jako je například rakovina. Podle profesora Denhama Harmana začíná organismus stárnout kvůli poškození buněk způsobeným právě nestabilními volnými kyslíkovými radikály, takzvanými ROS (reactive oxygen species).

Toxické kyslíkové radikály vznikají při metabolismu buňky. Obecně jsou syntetizovány mitochondriálními procesy, peroxizomy a cytoplasmickými enzymy jako výsledek různých metabolických aktivit [29]. Tělo má však antioxidační enzymy deaktivující volné radikály, jako jsou například superoxiddismutáza, glutathion peroxidáza a kataláza. S přibývajícím věkem tělo ztrácí schopnost produkovat tyto enzymy. Volné radikály se kumulují a poškozují jednotlivé buňky a tkáně. Harman dále uvádí, že degenerativní nemoci nejsou samostatná onemocnění, ale různé formy exprese stárnutí organismu způsobené oxidativním stresem, podmíněné také genetickou výbavou a okolním prostředím organismu [30].

Pozorováním bylo zjištěno, že dlouhověkost je nepřímě úměrná rychlosti metabolismu. Dlouhověkost pozitivně koreluje s poměrem superoxiddismutázy (SOD), která je považována za hlavní intracelulární enzym pro ochranu proti toxicitě

kyslíkových radikálů. Dokáže katalyticky odstranit superoxidové radikály. Nejvyšší aktivita u člověka byla zjištěna v mozku, játrech a srdci. Při zkoumání různých druhů savců bylo zjištěno, že aktivita SOD je specifická pro daný druh. U déle žijících druhů je aktivita vyšší. Tento fakt může ovlivňovat délku života i na úrovni jedince. Tato korelace naznačuje, že druhy, které mají vyšší stupeň ochrany proti ROS, se dožívají vyššího věku [31].

Zajímavé je, že také kalorická restrikce, tedy dietní omezení bez toho, aby došlo k podvýživě, zvyšuje SOD a katalázovou aktivitu. Omezení potravy konzervativně zvyšuje délku života u celé řady organismů [32] včetně *C. elegans*. Hádátka, u kterých byl omezen příjem potravy, vykazují mj. zvýšenou antioxidační obranu a odolnost vůči oxidativnímu stresu [33].

Existuje však řada pozorování, která nejsou s touto teorií v jejím původním znění v souladu. Je však pravděpodobné, že ROS ve stárnutí nějakou roli hrají. Proto je poslední době zkoumána i varianta, že pevně kontrolované koncentrace ROS a kolísání redoxního potenciálu mohou být důležitými mediátory signalizačních procesů [34].

1.3.2 Genetická teorie stárnutí

Genetické teorie se dají rozdělit na dvě skupiny. První z nich je mutační teorie, podle které je důvodem stárnutí hromadění stochastických mutací v somatických buňkách.

Druhá varianta, teorie programovaného stárnutí, předpokládá aktivní roli jednotlivých konkrétních genů a skupin genů. Podle genetické teorie stárnutí je tedy stárnutí geneticky determinováno [35].

1.3.3 Pacemakerové teorie stárnutí

Tyto teorie stárnutí hledají řídicí časovací systém (pacemaker) v orgánových systémech. Jedním z orgánů hojně diskutovaným v této souvislosti je epifýza produkující melatonin. Melatonin je podle jedné z těchto teorií hlavní protistárnoucí agens a proto by měl pozitivně ovlivňovat celkový stav organismu. Z toho by vyplývalo, že epifýza je řídicím orgánem stárnutí [36].

V souvislosti se stárnutím se často hovoří o několika signálních drahách. Centrální z nich je IIS dráha, která již byla zmíněna výše (kapitola 1.2.).

Dalším jevem, který výrazně a konzervativně prodlužuje délku života, je kalorická restrikce. I ta již byla stručně zmíněna výše (kapitola 1.2.)

Na stárnutí má vliv také aktivita některých kináz, například TOR (target of rapamycin) kinázy, která je zodpovědná mj. za růst buněk. Snížení její aktivity prodlužuje délku života a i tento efekt je konzervativní u řady organismů, od kvasinek po myši [37]. Dalším příkladem mohou být například JUN kináza nebo sirtuiny [38,39]. Dalšími jevy ovlivňujícími stárnutí je například mitochondriální signalizace nebo signály z germinálních buněk[40,41].

Řada výše zmíněných drah a jevů spolu úzce souvisí a navzájem spolu interagují. Komplexní představu o molekulárních procesech doprovázejících stárnutí zatím ovšem nemáme.

1.4 „Lifespan“ a „Healthspan“

Stárnutí je charakterizováno kumulací progresivních, často škodlivých změn v buňkách a tkáních organismu. Takové změny mohou vést k poklesu v kvalitě života[42]. Studie u modelových organismů jako je *Caenorhabditis elegans* poskytly cenný vhled do anatomických i funkčních aspektů stárnutí, a vedly k identifikaci několika genetických drah, které určují délku života (anglicky „lifespan“) [43]. Velká část těchto výzkumů používá délku života jako měřítko míry stárnutí. Délka života je univerzální a přesně měřitelný parametr. Cílem farmakologických intervencí však primárně není prodloužit délku života jako takovou, ale pokud možno oddálit degenerativní změny a prodloužit období života, kdy je organismus zdravý a plně funkční. Proto je kromě délky života někdy posuzován také healthspan [44]. Healthspan se dá definovat například jako "období středního věku vitality, které předchází statisticky významnému funkčnímu poklesu" [45]. Vyhodnocování healthspanu obvykle zahrnuje měření vlastností, které zpětně reflektují změny přicházející s rostoucím věkem jedince. Některé z těchto změn jsou sdílené mezi organizmy, jiné jsou druhově specifické [46].

K analýze healthspanu se používá například fluorescenční mikroskopie, konfokální a elektronová mikroskopie, GFP reportéry[47].

U starých hád'átek můžeme pozorovat nepravidelnosti v jaderných hranicích svalových buněk, ztrátu cytoplazmatické textury nebo vznik nekrotických dutin. Mitochondriální sítě jsou narušeny a sarkomery ztrácí svoji systematickou organizaci. Myozinová filamenta jsou scvrklá a rozbitá [48,49]. Tyto vady jsou výrazně podobné

sarkopenii u člověka [50]. Lipidy se hromadí ve svalových buňkách, zatímco cytoplazmatický obsah je snížen.

Ve střevních buňkách, je narušena jaderná architektura a jsou patrné zlomy mikrokvlků [51].

Dalším charakteristickým rysem starých hádátek je přirůstek tzv. pigmentů stárnutí jako je autofluorescenční pigment lipofuscin, který je pokročilým koncovým produktem glykace [52]. Lipofuscin se nachází ve střevních buňkách ale i v jiných tkáních [53]. Akumulace lipofuscinu je jevem, který se vyskytuje jak u *C. elegans* tak u člověka. Dalším snadno kvantifikovatelným parametrem je u hádátek celkový pokles pohyblivosti organismu a snižování frekvence pumpování hltnu.

1.5 Výhody využívání *C. elegans* ve výzkumu

Hádátka se rychle množí a je schopno vyprodukovat i stovky potomků za jediný týden. Díky schopnosti samooplození je snadné udržet zajímavý fenotyp a fixovat v populaci žádoucí mutace. Jeho délka života je relativně krátká, v průměru okolo 2-3 týdnů při kultivaci ve 20°C [10]. Kultivace v laboratoři je nenáročná a levná. Průhledné tělo umožňuje snadné pozorování biologických procesů nebo fluorescenční značení žádaných struktur. Má malý genom a 60-80% genů je homologních s geny savčími, včetně řady genů spojených s lidskými nemocemi [21,22,23]. Je vhodným modelem pro genetické studie a výzkum funkce genů díky velmi jednoduché metodice RNA interference i díky relativně snadno proveditelné mutagenезi [8]. Díky popularitě tohoto organismu je možné snadno sehnat řadu nástrojů, modelových linií a mutantů užitečných pro řadu oblastí výzkumu.

Velkou výhodou například pro farmaceutický výzkum je také možnost provádět vysokokapacitní experimenty *in vivo*. Experimenty na celém organismu mohou poskytnout komplexnější obraz biologických procesů než *in vitro* experimenty na buněčných kulturách, oproti savčím modelům je ovšem mnohem levnější a jednodušší na údržbu. Díky tomu, že tato hlístice patří mezi bezobratlé, také odpadá složitá legislativa, která je vyžadována u pokusů na obratlovcích. Využívání *C. elegans* má tedy do určité míry výhody obou těchto přístupů.

Očividnou nevýhodou je ovšem značná odlišnost a evoluční vzdálenost *C. elegans* od člověka a savců všeobecně. Navzdory mnohým podobnostem je zde i mnoho výrazných rozdílů. Výsledky experimentů s *C. elegans* je tedy vždy potřeba brát

s rezervou. Pro počáteční fáze farmaceutického výzkumu by však využívání *C. elegans* i přes to mohlo být výhodné, jak bylo navrženo například zde [54].

1.6 Skríňink látek na *C. elegans*

1.6.1 Skríňink látek s potenciálním uplatněním v medicíně

C. elegans se hojně využívá pro modelování lidských onemocnění, jako jsou například neurodegenerativní onemocnění [23], diabetes [22] nebo rakovina [21]. Je možné sledovat celou řadu ovlivňovaných parametrů, od změn v pohyblivosti, vzhledu, délce života až po reprodukční kapacitu atd. Pro účely medicínského výzkumu existuje také řada mutantů a transgenních a reportérových linií.

Pro vyhodnocování vlivu látek na *C. elegans* se dříve využíval světelný mikroskop a manuální vyhodnocování. Podobné experimenty jsou náročné, proto bylo dříve *C. elegans* k hledání aktivních látek využíváno spíše okrajově. S rozvojem metodiky pro vysokokapacitní skríňinky se však situace změnila. Moderní metody jsou nejčastěji založeny na automatické mikroskopii a analýze obrazu, na využívání sorterů schopných analyzovat větší částice nebo na fluorescenčním značení [55].

Pro tuto práci jsou důležité hlavně pokroky v metodách vyhodnocování délky života. Úmrtnost hád'átek je obvykle vyhodnocována pomocí jejich pohybu, který je stimulován buď dotekem pomocí speciálních nástrojů zvaných „wormpicker“ (starší a manuálně náročnější, nicméně stále hojně rozšířený postup) nebo intenzivním světlem. Jedinci, kteří na tento stimulus nereagují a nepohybují se, jsou vyhodnocováni jako mrtví [56].

Plná automatizace takovýchto experimentů je relativně náročná. Je možné použít například automatickou mikroskopii [57] nebo sortery [56], nicméně zjevnou nevýhodou této metody je nákladnost potřebného vybavení. Častěji se využívají částečně automatizované postupy. Mezi takovéto postupy patří například metodika popsána doktorem Petrascheckem, kterou jsem použila v této práci, kdy jsou hád'átka v tekutém médiu nanášeny na 96-ti jamkovou desku a v pravidelných intervalech počítány v mikroskopu [58]. Další zajímavou metodou je WormScan, který je založen na fotografování misek s hád'átkou na kancelářském skeneru a následné obrazové analýze [59]. Na stejném principu je založena také metoda Lifespan machine, kdy navíc odpadá nutnost manuálního skenování umístěním skeneru přímo do inkubátoru a

naprogramováním k automatickému pořizování snímků. Lifespan machine však do určité míry omezuje kapacitu a množství látek, jež je možné paralelně testovat, protože s miskami umístěnými na skeneru není možné po celou dobu experimentu manipulovat. K vyhodnocování délky života je možné také využít speciální čipy, kvůli potenciálně vysoké spotřebě testovaných látek však ani tento postup pro skrínink látek není úplně ideální[60].

1.6.2 Význam *C. elegans* pro vývoj antibiotik a antimykotik

C. elegans může být také využito při hledání nových antibiotik nebo fungicidů. Při těchto experimentech je hád'átko použito jako hostitel pro patogenní mikroorganismus. I zde je výhodou sledování účinku látek na patogen v širším kontextu než u *in vitro* experimentů a jsou brány v úvahu i parametry jako je vstřebávání nebo metabolizace látky hostitelem. Tímto způsobem lze také možno hledat i látky, které nejsou přímo toxické pro patogen, ale ovlivňují interakce mezi hostitelem a patogenem a snižují tím virulenci [61].

1.6.3 Význam *C. elegans* pro vývoj anthelmintik

Do třídy nematoda patří celá řada parazitů rostlin, zvířat i lidí. Pěstování parazitických hlístů může být technicky velice náročné (potřeba mezi/hostitelů) a potenciálně rizikové. Skrínink na *C. elegans*, které je snadno kultivovatelné, samo neparazitické, ale zároveň parazitům blízce příbuzné, pomáhá řadu těchto problémů řešit.

Kvůli výrazným rozdílům ve způsobu života, které se projevují i na genetické úrovni, je i zde třeba brát v potaz omezenou relevanci *C. elegans* jakožto modelu. Nicméně například nervová soustava, která bývá častým cílem antihelmintik, je u *C. elegans* i mnoha jeho parazitických příbuzných obdobná[56]. Většina v současné době využívaných nematicidních látek působí i na *C. elegans*[62].

Kromě hledání nových látek je *C. elegans* také hojně využívaným nástrojem pro objasňování mechanismů resistance, která je u antihelmintik častým problémem. I při hledání antihelmintik je možné využít například reportérové linie, jak naznačuje práce [63], ve které autoři hledali látky snižující aktivitu genu *skn-1*. Gen *skn-1* je transkripční faktor, který mj. reguluje geny zodpovědné za odolnost vůči stresu a II. fázi detoxikace xenobiotik a snížení funkce tohoto genu by mohlo pomoci překonat rezistenci parazitů k existujícím nematocidům [64].

1.7 Cytokininy

Cytokininy jsou rostlinné hormony odvozené od adeninu. Jsou primárně zodpovědné za růst a diferenciaci rostlin, dále se podílejí například také na apikální dominanci, formaci pupenů nebo chloroplastů. V rostlinách jsou rozpoznávány specifickými receptory. Podle substituentu v N6 poloze je dále dělíme na aromatické nebo izoprenoidní. V rostlinách se vyskytují jako volné báze, ale i jako ribosidy a ribotidy.

Tyto látky však mají také řadu zajímavých účinků v živočiších. Cytokinin kinetin byl schopen oddálit stárnutí v buněčných kulturách [65] a prodloužit délku života u octomilky [66]. Kinetin byl dále také schopen ochránit myši před stresem vyvolaným vysokou koncentrací galaktózy [67] a dokáže také snižovat glykaci proteinů *in vitro* [68]. Další zajímavou vlastností kinetinu je jeho schopnost korigovat alternativní sestřih a tím napravit projevy některých onemocnění [69]. Ve formě ribosid trifosfátu dokáže kinetin také interagovat s kinázou PINK1, jejíž mutace jsou spojeny s dědičnými formami Parkinsonovy choroby, a zvýšit její funkci na úroveň nemutované varianty [70].

Také další cytokinin, 5'-*trans*-zeatin, byl schopen oddálit stárnutí v buněčných kulturách [71]. Dále také prokázal schopnost potlačit formaci amyloidních plaků a zlepšit paměť u skopolaminem indukovaných krysích modelů Alzheimerovy choroby [72].

Mechanismy účinku zatím nejsou přesně objasněny. Protistárnoucí a ochranné vlastnosti cytokininů jsou často připisovány jejich schopnosti snižovat oxidativní stres, a to jak přímým antioxidačním účinkem, tak indukcí antioxidačních enzymů [73]. Cytokininy by také mohly fungovat jako hormetiny – tedy látky schopné indukovat vlastní obranné mechanismy organismu a tím zvýšit jeho celkovou odolnost [74].

Veškeré účinky popisované výše jsou spíše cytoprotektivního charakteru, některé formy cytokininů však disponují i cytotoxickými účinky. Příkladem jsou protirakovinné účinky řady cytokininových-ribosidů [75].

2 Materiál

2.1 Materiál

- *Caenorhabditis elegans* linie fem-1/HT17

Tato linie má teplem indukovatelnou mutaci. Při pěstování ve 25°C se všichni jedinci vyvinou v samice, což zabrání další reprodukci.

- Linie bakterií *Escherichia coli* OP50

Jedná se o uracil auxotrofní kmen. Při přidání do médií sloužících ke kultivaci *C. elegans*, která nejsou obohacena o uracil, se bakterie dále nedělí. Tím se zabrání jejich přerůstání, jež by zhoršovalo viditelnost a mohlo ovlivňovat výsledky experimentů.

Obojí zakoupeno z *Caenorhabditis* genetic center (CGC).

(<https://www.cbs.umn.edu/research/resources/cgc>)

2.2 Testované látky

Bylo otestováno celkem 32 cytokininů substituovaných v pozici 8 purinu. Jednalo se o následující látky v těchto koncentracích: LRR 1796 10μM, 1796 100μM, 1828 1μM, 1830 10μM, 1830 100μM, 1852 10μM, 1888 10μM, 1888 100μM, 1889 10μM, 1889 100μM, 1890 10μM, 1891 10μM, 1891 100μM, 1892 10μM, 1892 100μM, 1895 10μM, 1895 100μM, 1896 10μM, 1896 100μM, 1914 10μM, 1924 10μM, 1924 100μM, 1925 10μM, 1925 50μM, 1926 10μM, 1926 50μM, 1927 10μM, 1927 25μM, 1974 10μM, 1974 50μM, 1999 10μM, 1999 100μM, 2000 10μM, 2000 100μM, 2001 10μM, 2001 100μM, 2018 1μM, 2018 5μM, 2018 10μM, 2019 10μM, 2019 50μM, 2041 10μM, 2041 100μM, 2044 10μM, 2044 100μM, 2106 10μM, 2106 100μM, 2107 10μM, 2107 100μM, 2108 10μM, 2108 100μM, 2221 10μM, 2221 100μM, 2537 10μM, 2537 100μM.

Jako pozitivní kontrola byl využíván cytokinin kinetin, který v předchozích experimentech v naší laboratoři reprodukovatelně prodloužil délku života *C. elegans* (nepublikovaná data).

2.3 Média

Všechny uvedená média a pufry byly připraveny v souladu s [58], knihou *Caenorhabditis elegans: Modern biological analysis of an organism* [76] nebo podle internetového zdroje WormBook. Pokud není přímo uvedeno jinak, roztoky byly skladovány při pokojové teplotě.

LB medium

Na 1000 ml:

- 10 g trypton
- 5 g kvasinkový extrakt
- 5 g NaCl
- pro pevné médium navíc 15 g agaru
- deionizovaná voda do 1000 ml
- upravit pH na 7,5 a autoklávovat

M9 pufr

Na 1000 ml:

- 6 g Na_2HPO_4
- 3 g KH_2PO_4
- 5 g NaCl
- 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- deionizovaná voda do 1000 ml, autoklávovat

Puf fosfátu draselného

Na 1000 ml:

- 136 g KH_2PO_4
- deionizovaná voda do 900 ml
- upravit na pH 6,0
- deionizovaná voda do 1000 ml, autoklávovat

Roztok stopových prvků

Na 1000 ml:

- 1,86 g Na_2EDTA
- 0,69 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,20 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 0,29 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,016 g CuSO_4
- deionizovaná voda do 1000 ml, autoklávovat, skladovat ve tmě

Růstové médium pro hlístice (NGM)

Na 1000 ml:

- 3,0 g NaCl
- 2,5 g pepton
- 17 g agar
- deionizovaná voda do 1000 ml, autoklávovat
- po ochlazení na 55°C , přidat:
- 0,5 ml sterilního 1M CaCl_2
- 1 ml cholesterolu (5 mg/ml v ethanolu)
- 1 ml sterilního 1M MgSO_4
- 25 ml sterilního fosfát draselného pufru
- použít okamžitě po přípravě, znovu ohřátí není možné

S-základní médium

Na 1000 ml:

- 5,9 g NaCl
- 50 ml 1M fosfát draselný
- deionizovaná voda do 1000 ml, autoklávovat

Citrát draselný, 1M

Na 1000 ml:

- 268,8 g citrát tridraselný
- 26,3 g kyselina citronová monohydrát
- 900 ml deionizovaná vody
- upravit pH na 6,0
- deionizovaná voda do 1000 ml, autoklávovat

S-kompletní médium

Na 1000 ml:

- 974 ml předem připravený S-základní médium
- 10 ml sterilní 1M citrát draselný
- 10 ml sterilní roztok stopových prvků
- 3 ml sterilní 1M CaCl_2
- 3 ml sterilní 1M MgSO_4
- skladovat ve tmě

Roztok pro sjednocování věku háďátek

Na 10 ml:

- 1,5ml 14% HClO (zásobní roztok pro sjednocení věku háďátek)
- 0,5ml 10M NaOH
- 8,5ml deionizovaná voda
- roztok se musí chystat vždy čerstvý

2.4 Metody

2.4.1 Příprava bakterií

- Bylo připraveno sterilní kapalné LB médium.
- LB médium bylo naočkováno kmenem *E. coli* OP50
- Suspenze byla pěstována přes noc na třepačce při 37 °C.
- Suspenze byla převedena do sterilních centrifugačních zkumavek (15 ml nebo 50 ml) a skladována v lednici.

2.4.2 Příprava suspenze bakterií *E. coli* OP50 v S-complete

- Předem připravená bakteriální suspenze v LB médiu byla napipetována do předem zvážených centrifugačních zkumavek, následovala centrifugace (3000 x g) po dobu 10 min.
- Přebytek kapaliny byl opatrně odstraněn, zkumavky byly znovu zváženy a pelety byly resuspendovány v S kompletním médiu tak, aby se dosáhlo zásobního roztoku s 60 mg bakterií v 1 ml.
- Suspenze byla uložena v ledničce (ne déle než jeden nebo dva týdny), nebo ve zmrazeném stavu při -20 °C.

2.4.3 Příprava NGM misek

- Čerstvé teplé NGM médium bylo napipetováno na Petriho misky (PM), přibližně 5-6 ml na 60mm PM (10-11 ml pro 90mm PM).
- Po ztuhnutí média byla na misky napipetována suspenze bakterií *E. coli* OP50 v LB médiu (30 µl na 60mm PM, 50 µl na 90mmPM) a rozetřena pomocí sterilní hokejky.
- Misky byly sterilně zabaleny a skladovány v ledničce.

2.4.4 Transfer hád'átek

- Z misky s přerostlou populací hád'átek byl pomocí sterilního skalpelu vykrojen asi 1cm² NGM agaru a přenesen na čerstvou misku.

2.4.5 Sjednecování věku hád'átek

- Na PM byl nepipetován 1 ml M9 pufru.
- Tento roztok i s hád'átkou byl přepipetován do mikrozkušavky a centrifugován asi 10 s na stolní centrifuze.
- Přebytečný roztok byl opatrně odpipetován, aby na dně zůstal pelet s hád'átkou.
- K peletu byl přidán 1 ml roztoku pro sjednocování věku hád'átek.

- Suspenze v mikrozkuhavce byla třepána na třepačce (1500 rpm, 20°C) dokud hádátka nepřestala být viditelná (asi 5 minut).
- Ihned po rozpadu těl hádátek byla suspenze v mikrozkuhavkách centrifugována 10 s na stolní centrifuze.
- Přebytný roztok byl ihned odpipetován.
- Byl přidán 1 ml M9 pufru.
- Suspenze byla znovu centrifugována 10 s na stolní centrifuze.
- Přebytný roztok byl odpipetován.
- Předchozí 3 kroky byly opakovány třikrát.
- Následně byl přidán 1 ml S-kompletního média.
- Suspenze byla centrifugována 10 sekund na stolní centrifuze.
- Roztok byl opět odpipetován.
- Znovu byl přidán 1 ml S-kompletního roztoku.
- Médium s vajíčky bylo naředěno a byl přidán zdroj potravy (2 ml suspenze, 1 ml suspenze bakterií v S-kompletním médiu 60 mg/ml, 7 ml S-kompletního média), suspenze byla umístěna na 90mm PD a skladována v inkubátoru

2.4.6 Krystalizace látek v S-kompletním médiu

- Testované látky rozpuštěné v DMSO byly smíchány S-kompletním médiem v takovém objemu, aby se dosáhlo požadované koncentrace.
- Suspenze byla rozpipetována po 200 μ l do 96 jamkové mikrotitrační destičky a kultivována ve 25°C.
- Míra precipitace byla pozorována pomocí inverzního světelného mikroskopu při 100x zvětšení.

2.4.7 Ověřování vlivu amfotericinu B na *C. elegans*

- Nesynchronizovaná populace hádátek v tekutém S kompletním médiu s bakteriemi byla rozdělena na dvě Petriho misky
- Do jedné misky byl přidán amfotericin B do finální koncentrace 0,1 μ g/ml.
- Misky byly sledovány po několik dní a byla vizuálně srovnávána úmrtnost a množení hádátek v médiu s i bez přídatku amfotericinu B.

2.4.8 Vliv amfotericinu B v kombinaci s DMSO na *C. elegans*

- Věkově synchronizovaná populace byla nanášena do media s různými koncentracemi DMSO (0; 0,1; 0,5%) a amfotericinu B (0; 0,05; 0,5 ug/ml) a rozpipetována na 96-ti jamkovou desku v triplicátech.
- Živá hád'átka byla počítána v mikroskopu okamžitě po nasazení, 3h po nasazení a dále 1, 2, 3 a 6 dní po nasazení.

2.4.9 Určení vlivu vybraných látek na délku *C. elegans*

- Suspenze s mladými dospělci byla naředěna na koncentraci přibližně 100 hád'átek na ml.
- Na 9 ml tohoto roztoku byl přidán 1 ml bakterií (*E. coli* OP50 v S-kompletním médiu).
- Suspenze byla přepipetována do mikrozkušavek po 2 ml.
- Do suspenze byly přidány 2 µl zásobního roztoku látky v DMSO.
- Suspenze byly rozpipetovány do mikrotitračních 96 jamkových desek po 200 µl.
- Jako pozitivní kontrola byl použit kinetin v koncentraci 100 a 10 µM.
- Jako negativní kontroly posloužily suspenze s přídavkem DMSO a čistá suspenze.
- Kultivace probíhala v inkubátoru při 25°C, při repetici při 16 °C.
- V pravidelných intervalech (2-3 dny) byli živé hlístice počítány pomocí inverzního světelného mikroskopu při 100× zvětšení.
- K analýze byl využit program OASIS [77]

3 Výsledky a diskuse

3.1 Ověřování vlivu amfotericinu B na *C. elegans*

Amfotericin B je fungicid. Byl testován, aby mohl být využit k zabránění potencionálním problémům s plísňovými kontaminacemi.

Tabulka 1: Vliv amfotericinu B na *C. elegans*

Den	Situace na miskách
0	Nepozorována žádná akutní toxicita
1	Úmrtnost i rozmnožování hád'átek na obou miskách srovnatelné.
4	Úmrtnost i rozmnožování hád'átek na obou miskách srovnatelné. Vývoj larev na misce s amfotericinem B normální.
6	Úmrtnost i rozmnožování hád'átek na obou miskách srovnatelné. Druhá generace dospělců pěstovaných na médiu s amfotericinem bez viditelných defektů v rozmnožování.

Z těchto výsledků vyplývá, že amfotericin B by neměl mít na *C. elegans* žádný výrazný vliv.

3.2 Vliv amfotericinu B k kombinaci s DMSO na *C. elegans*

Dále byl otestován vliv amfotericinu B v kombinaci s DMSO, které bylo použito jako rozpouštědlo pro látky. Je známo, že DMSO dokáže například zvyšovat permeabilitu membrán [78], proto bylo třeba se ujistit, zda ani kombinace těchto látek nemá na *C. elegans* vliv.

Průměrná velikost testované populace byla 20 hád'átek.

Tabulka 2: Vliv amfotericinu B v kombinaci s DMSO (% přeživších)

čas/ DMSO%+amp (μg/ml)	0+0	0+0.05	0+0.5	0.1+0	0.1+0.05	0.1+0.5	0.5+0	0.5+0.05	0.5+0.5
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3h	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1d	100	100	100	100	97	100	100	100	100
2d	100	100	100	100	97	100	100	100	100
3d	100	100	100	100	97	100	100	100	100
6d	100	100	86	100	93	95	100	93	86

Ani v tomto experimentu nebyla pozorována výraznější toxicita kombinace DMSO s amfotericinem B. Amfotericin B v požadované koncentraci by tedy měl být bezpečný pro využívání v dalších experimentech.

3.3 Precipitace látek v S kompletním médiu

Další věcí, jež bylo třeba ověřit, byla rozpustnost látek v S kompletním médiu. Použité koncentrace v prvním experimentu byly 10, 50 a 100 uM u všech látek s výjimkou látek 1974, 2018 a 2107, které jsou hůře rozpustné v DMSO a zásobní roztoky tedy byly v nižších koncentracích.

Tabulka 3: Krystalizace látek v S-kompletním médiu

Název látky	0h			24h		
	c1	c2	c3	c1	c2	c3
1796	-	-	-	-	-	-
1828	-	+	+	-	+	+
1830	-	-	-	-	-	-
1852	-	-	+	-	-	-
1853	-	-	-	-	-	-
1888	-	-	-	-	-	-
1889	-	-	-	-	-	-
1890	-	+	++	-	+	++
1891	-	-	-	-	-	-
1892	-	-	-	-	-	-
1895	-	-	-	-	-	-
1896	-	-	-	-	-	-
1913	-	-	-	-	-	-
1914	-	+	++	-	-	+
1924	-	-	-	-	-	-
1925	-	-	-	-	-	-
1926	-	+	+	-	-	-
1927	-	-	-	-	-	-
1974	-	-	-	-	-	-
1996	+	++	+++	++	++	+++
1999	-	-	-	-	-	-
2000	-	-	-	-	-	-
2001	-	-	-	-	-	-
2018	-	+	++	-	+	++
2019	+	+	++	-	+	++
2041	-	-	-	-	-	-
2044	-	-	-	-	-	-
2106	-	-	-	-	-	-
2107	+	+	++	-	-	+
2108	-	-	-	-	-	-
2221	-	-	-	-	-	-

-bez krystalů

+ krystaly

Většina látek byla bez problémů rozpustná. Část látek vytvořila po vnesení do média krystaly, které se do druhého dne rozpustily. Dvě látky, 1828 a 1996 nebylo možné rozpustit v žádné z testovaných koncentrací, byl tedy proveden ještě jeden test, kdy byly tyto dvě látky nanášeny v nižších koncentracích. Látku 1828 se podařilo rozpustit v koncentraci 1 uM, látka 1996 však formovala krystaly i v této koncentraci a byla tedy z dalších experimentů vyřazena.

Výsledné experimentální koncentrace zvolené na základě tohoto experimentu jsou shrnuty v podkapitole 2.2. Navzdory absenci krystalů v tomto experimentu, přímo při vyhodnocování délky života některé látky dodatečně ve vyšších koncentracích krystaly zformovaly, možná v důsledku malých změn pH způsobených metabolismem hád'átek a bakterií. Tyto látky byly z experimentu vyřazeny dodatečně a právě toto je důvodem, proč byly některé látky testovány zdánlivě pouze v jedné koncentraci i přes to, že v tomto experimentu krystaly netvořily.

3.4 Testování vybraných látek

Po určení vhodné koncentrace byly látky podány hád'átkům. Cytokinin kinetin byl použit jako pozitivní kontrola. Negativní kontrolou byly hád'átka v čistém médiu (NT) a hád'átka vystavena 0,1% DMSO, které bylo použito jako rozpouštědlo pro látky. Hodnotilo se prodloužení průměru a mediánu dožití a dále věk, ve kterém odumřelo 90% populace (Q90). Tuto hodnotu jsme použili namísto maximální délky života (tedy den úmrtí posledního jedince), která může být náchylná k extrémům. Výsledky experimentu jsou shrnuty v tabulce níže.

Tabulka 4: výsledky testovaných látek

Název / c	Počet		Sd. Er.	Medián	Q90
	hád'átek	Průměr			
K 10μM	43	17.05	1.29	15	31
K 100μM	48	13.17	1.01	12	22
1796 10μM	37	15.08	1.40	12	31
1796 100μM	51	18.39	1.44	17	37
2537 10μM	51	16.31	1.51	10	37

2537 100μM	52	16.83	1.61	10	37
2221 10μM	40	15.10	1.28	10	29
2221 100μM	49	10.71	0.70	10	19
DMSO	49	10.86	0.87	10	19
NT	45	14.20	1.29	10	29
2108 10μM	52	16.67	1.27	15	31
2108 100μM	47	19.34	1.77	15	40
2041 10μM	46	19.20	1.75	15	37
2041 100μM	47	20.04	1.49	17	37
2044 10μM	53	17.60	1.46	15	37
2044 100μM	53	17.87	1.38	15	37
2106 10μM	51	18.67	1.44	17	33
2106 100μM	57	19.14	1.51	17	40
2107 10μM	59	16.92	1.28	15	37
2107 100μM	46	16.02	1.30	15	26
DMSO	52	17.48	1.39	15	37
NT	43	20.05	1.38	17	33
2001 10μM	40	20.43	2.04	15	40
2001 100μM	42	16.93	1.83	12	37
2018 1μM	48	15.27	1.75	10	37
2018 5μM	54	19.81	1.70	15	37
2019 10μM	51	14.82	1.41	10	29
2019 50μM	51	17.75	1.59	12	37
2000 10μM	49	16.02	1.72	10	40
2000 100μM	61	13.72	1.40	10	33
1999 10μM	40	15.20	1.66	10	29
1999 100μM	53	14.13	1.45	10	37
DMSO	48	12.33	1.11	10	24
NT	43	15.33	1.62	12	29
1895 10μM	64	11.89	1.04	10	19
1895 100μM	48	12.08	1.23	10	19
1852 10μM	61	9.79	0.73	10	15
1896 10μM	52	11.48	0.98	10	22
1896 100μM	46	12.00	1.24	10	22
1924 10μM	55	10.75	1.31	8	31
1924 100μM	60	9.18	0.87	10	15
1892 10μM	64	10.50	0.93	8	26
1892 100μM	57	8.82	0.63	8	12
DMSO	55	9.25	0.75	8	12
NT	52	12.94	1.08	10	26
1926 10μM	53	14.62	1.18	15	22
1926 50μM	67	10.51	0.83	10	17
1891 10μM	66	12.65	0.96	10	19
1891 100μM	82	14.48	1.00	15	29
1890 10μM	67	15.36	1.42	12	33
1889 10μM	62	15.03	1.39	12	31

1889 100μM	59	15.88	1.33	12	33
1888 10μM	56	16.54	1.61	15	37
1888 100μM	81	11.83	0.96	8	22
1828 1μM	61	15.54	1.50	12	29
1830 10μM	53	16.68	1.65	12	33
1830 100μM	49	14.08	1.47	10	33
1925 10μM	52	14.52	1.58	10	31
1925 50μM	55	13.42	1.22	10	26
1927 10μM	64	12.19	1.13	8	24
1927 25μM	41	15.10	1.58	12	31
1914 10μM	44	16.98	1.87	10	33
2018 10μM	63	12.95	1.27	10	29
1974 10 μM	41	13.46	1.47	12	24
1974 50μM	56	14.93	1.37	10	31
DMSO av.	204	12.40	0.56	10	24
NT av.	183	15.46	0.70	15	29

Žádná z testovaných látek nebyla pro *C. elegans* akutně toxická.

Průměrná velikost populace byla 53 háďátek. Jednalo se tedy o poměrně malé populace. Látky byly proto srovnávány jak s deskovými negativními kontrolami, byly-li k dispozici, tak s celkovou populací negativních kontrol na všech deskách. Jako směrodatná byla brána ta kontrola, která byla přísnější. Z testovaných látek bylo vybráno 8 potenciálně aktivních k opakování experimentu na větších populacích: 1796 10 a 100μM; 1830 10μM, 1888 10μM; 1914 10μM; 2001 10μM; 2018 5μM; 2019 50μM; 2537 10 a 100μM. Látky byly vybrány hlavně na základě prodloužení průměru a mediánu délky dožití, v potaz však byla brána i statistická signifikance (P hodnota < 0,05) a tvar křivek přežití.

3.5 Opakování experimentu s potencionálně aktivními látkami

Druhé testování vybraných látek probíhalo obdobně jako první s následujícími rozdíly:

V tomto experimentu nebyl použit amfotericin B. V literatuře je možno dohledat [79], že DMSO samo o sobě je schopno mírně prodloužit délku života *C. elegans*. Tyto výsledky podporují i předchozí zkušenosti od nás z laboratoře. V prvním experimentu bylo však patrné, že délka života populace háďátek pěstované v 0,1% DMSO byla kratší než u populace pěstované v čistém médiu. Tento rozdíl může být vysvětlen přirozenou variabilitou v rámci populací, nicméně vznikla i obava, že navzdory výsledkům

z optimalizačních experimentů amfotericin B v kombinaci s DMSO přece jen vliv na *C. elegans* má. Raději byl tedy z dalších experimentů vynechán a při přípravě desek a výměně fólií bylo dbáno na přísné dodržování sterility.

Dalším rozdílem bylo to, že z technických důvodů byla pozměněna teplota kultivace. Hád'átka byla v 25°C pěstována jen do dosažení dospělosti, aby se projevila teplotou indukovatelná sterilita, a poté byla přemístěna do 16°C.

Pro větší robustnost výsledků byly napočítané hodnoty ještě upraveny, a to odečtením 4 nejextrémnějších jamek – tedy těch, kde byla v daný den napočítána nejvyšší a nejnižší úmrtnost (dvě od každého extrému). I po cenzuře 4 jamek je velikost populace stále dostatečně velká – průměrně 281 hád'átek.

Látky byly testovány na třech mikrotitračních deskách v následujícím uspořádání: první deska: K (100μM), 1796 (100μM), 2019 (50μM), 2537 (100μM), DMSO a NT, druhá deska: K (10μM), 1796 (10μM), 1830 (10μM), 2537(10μM), DMSO a NT a třetí deska: K(10μM), 1888 (10μM), 1914(10μM), 2001 (10μM), 2018 (5μM), DMSO a NT.

Výsledky pro jednotlivé látky jsou ukázány níže.

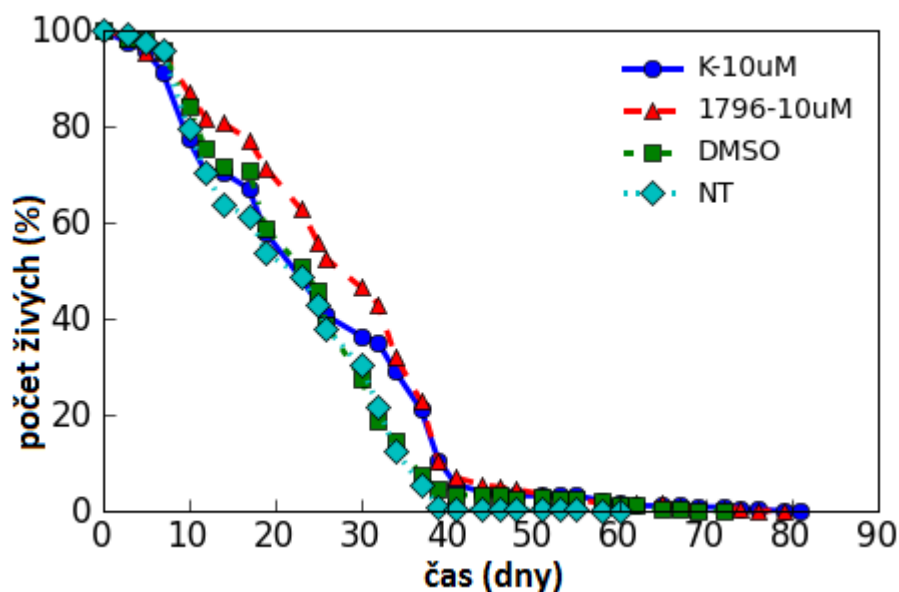
1) LRR 1796

Tabulka 5: Efekt látky 1796 v koncentraci 10μM

Název látky	Počet hád'átek	Průměr	Medián	Q90
K10μM	379	25.13	23	41
1796 10μM	202	28.21	30	41
DMSO	271	24.15	25	37
NT	311	22.62	23	37

Látka 1796 v koncentraci 10 μM prodloužila délku života ve všech sledovaných parametrech oproti negativním kontrolám. Prodloužila průměr a medián délky života i v porovnání s pozitivní kontrolou.

Průběh celého experimentu je možné přehledněji posoudit z Kaplan-Meierovy křivky přežití.



Obr 4: Kaplan-Meierova křivka přežití, látka 1796(10 μ M) v porovnání s kontrolami.

Z Kaplan-Meierovy křivky přežití byla vyhodnocena statistická významnost výsledků (P hodnota korigovaná podle Bonferroniho).

Tabulka 6: Bonferroniho P hodnoty - látka 1796, 10 μ M

	Bonferroni P-hodnota
1796 10μM v.s. K 10μM	1.6436
1796 10μM v.s. DMSO	3.36×10^{-4}
1796 10μM v.s. NT	$< 1 \times 10^{-7}$

Látka 1796 o koncentraci 10 μ M statisticky významně prodloužila délku života v porovnání s negativními kontrolami. V porovnání s pozitivní kontrolou navzdory numerickému prodloužení však efekt statisticky významný není.

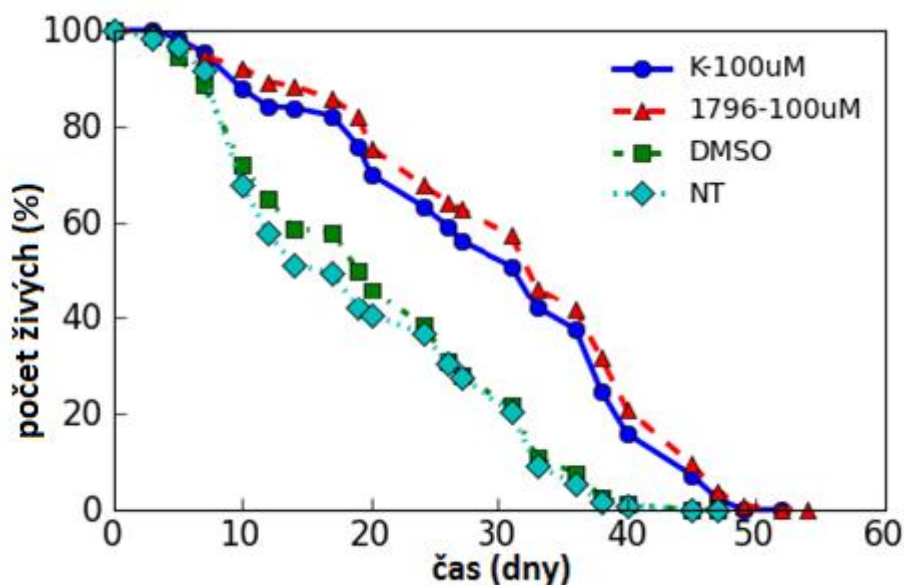
Tabulka 7: Efekt látky 1796 v koncentraci 100 μ M

Název látky	Počet háďátek	Průměr	Medián	Q90
K100μM	304	29.61	33	45
1796 100μM	336	31.48	33	45
DMSO	260	20.75	20	36
NT	399	19.75	17	33

Látka 1796 o koncentraci 10 μ M prodloužila délku života ve všech sledovaných parametrech

oproti negativním kontrolám. Prodloužila průměr délky života i v porovnání s pozitivní kontrolou.

Průběh celého experimentu je možné přehledněji posoudit z Kaplan-Meierovy křivky přežití.



Obr 5: Kaplan-Meierova křivka přežití, látka 1796 (100 μ M) v porovnání s kontrolami

Z Kaplan-Meierovy křivky přežití byla vyhodnocena statistická významnost výsledků (P-hodnota korigovaná podle Bonferroniho).

Tabulka 8: Bonferroniho P hodnoty - látka 1796, 100 μ M

	Bonferroni P-hodnota
1796 100μM v.s. K 100μM	0.6146
1796 100μM v.s. DMSO	$<1 \times 10^{-7}$
1796 100μM v.s. NT	$<1 \times 10^{-7}$

Látka 1796 o koncentraci 100 μ M statisticky významně prodloužila délku života v porovnání s negativními kontrolami. V porovnání s pozitivní kontrolou navzdory numerickému prodloužení však efekt statisticky významný není.

Pozitivní vliv na délku života z prvního experimentu se potvrdil i na větší populaci. Efekt látky i pozitivní kontroly je vyšší v koncentraci 100 μ M než v koncentraci 10 μ M. Můžeme tedy

předpokládat, že efekt je závislý na dávce látky.

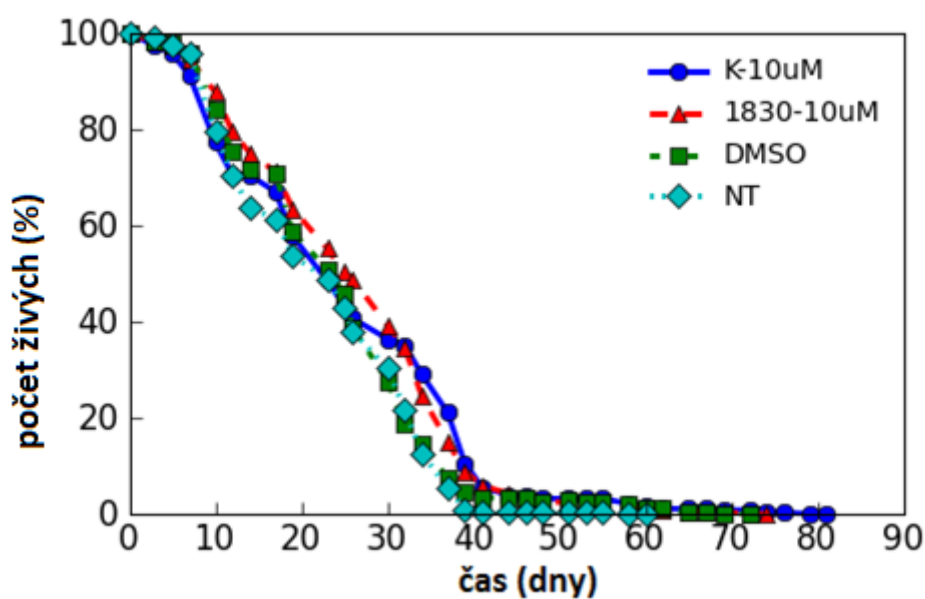
2) LRR 1830

Tabulka 9: Efekt látky 1830 v koncentraci 10 μ M

Název látky	Počet háďátek	Průměr	Medián	Q90
K10 μ M	379	25.13	23	41
1830 10 μ M	326	26.25	26	39
DMSO	271	24.15	25	37
NT	311	22.62	23	37

Látka 1830 o koncentraci 10 μ M prodloužila délku života ve všech sledovaných parametrech oproti negativním kontrolám. Prodloužila průměr a medián délky života i v porovnání s pozitivní kontrolou, hodnota Q90 je však nižší než u pozitivní kontroly.

Průběh celého experimentu je možné přehledněji posoudit z Kaplan-Meierovy křivky přežití.



Obr6: Kaplan-Meierova křivka přežití, látka 1830(10 μ M) v porovnání s kontrolami

Z Kaplan-Meierovy křivky přežití byla vyhodnocena statistická významnost výsledků (P- hodnota korigovaná podle Bonferroniho).

Tabulka 10: Bonferroniho P hodnoty - látka 1830, 10 μ M

	Bonferroni P-hodnota
1830 10μM_{v.s.}K 100μM	12.2458
1830 10μM_{v.s.}DMSO	0.0882
1830 10μM_{v.s.}NT	4.76×10^{-5}

Látka 1830 o koncentraci 10 μ M statisticky významně prodloužila délku života v porovnání s jednou z negativních kontrol (NT). V porovnání s populací vystavenou efektu DMSO a s pozitivní kontrolou navzdory numerickému prodloužení však efekt statisticky významný není.

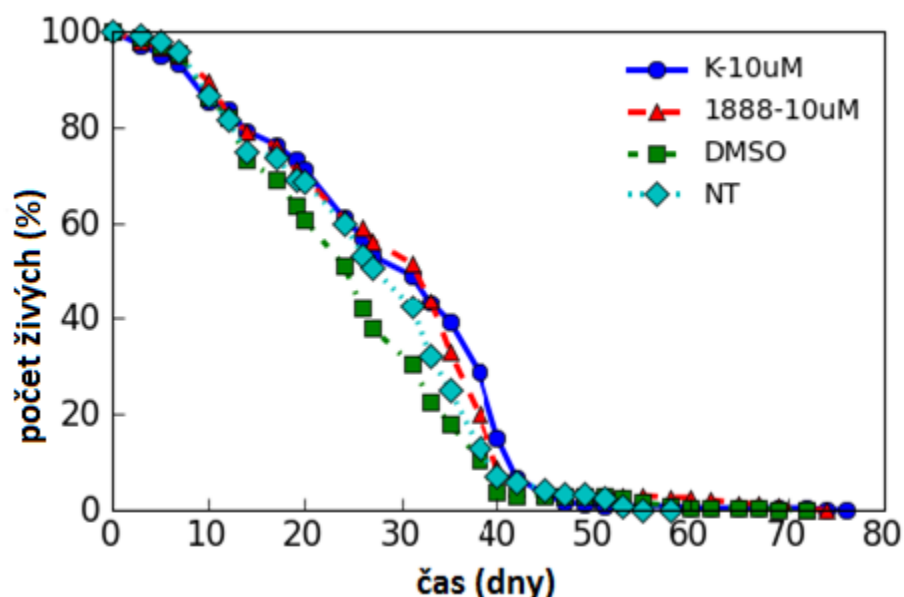
U této látky se pozitivní vliv na délku života háďátek nepodařilo plně potvrdit.

3) LRR 1888

Tabulka 11: Efekt látky 1888 v koncentraci 10 μ M

Název látky	Počet háďátek	Průměr	Medián	Q90
K10μM	250	28.79	31	42
1888 10μM	234	28.91	33	40
DMSO	257	25.12	26	40
NT	298	27.22	31	40

Látka 1888 o koncentraci 10 μ M prodloužila průměr a medián délky života oproti negativním kontrolám. Hodnota Q90 je u látky i negativních kontrol identická. Látka dále prodloužila průměr a medián délky života i v porovnání s pozitivní kontrolou, hodnota Q90 je však nižší než u pozitivní kontroly.



Obr7: Kaplan-Meierova křivka přežití, látka 1888(10 μ M) v porovnání s kontrolami

Z Kaplan-Meierovy křivky přežití byla vyhodnocena statistická významnost výsledků (P- hodnota korigovaná podle Bonferroniho).

Tabulka 12: Bonferroniho P hodnoty - látka 1888, 10 μ M

	Bonferroni P-hodnota
1888 10μM_{v.s.}K 10μM	4.5612
1888 10μM_{v.s.}DMSO	6.58x10 ⁻⁴
1888 10μM_{v.s.}NT	0.3948

Látka 1888 o koncentraci 10 μ M statisticky významně prodloužila délku života v porovnání s jednou z negativních kontrol (DMSO). V porovnání s populací v čistém médiu a s pozitivní kontrolou navzdory numerickému prodloužení však efekt statisticky významný není.

Ani u této látky se pozitivní vliv na délku života hád'átek nepodařilo plně potvrdit.

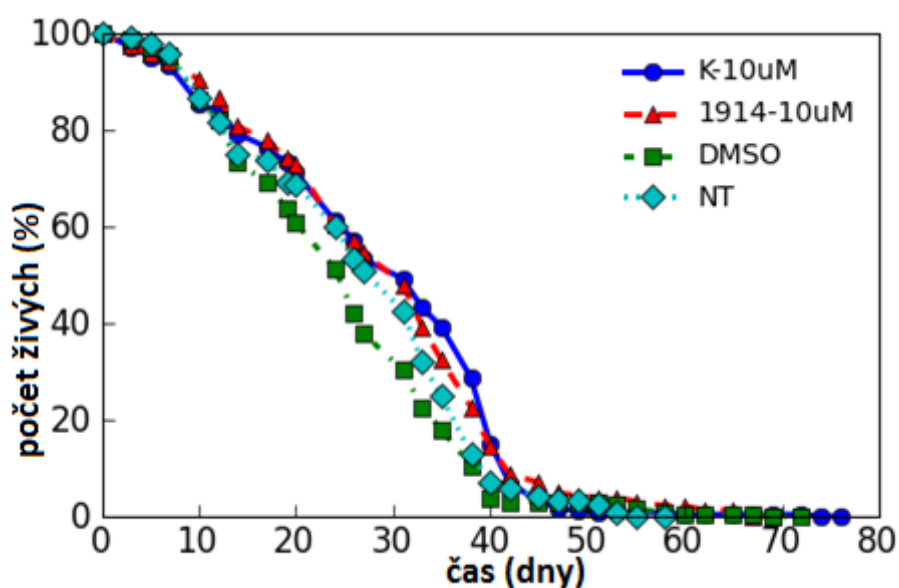
4) LRR 1914

Tabulka 13: Efekt látky 1914 v koncentraci 10 μ M

Název látky	Počet háďátek	Průměr	Medián	Q90
K10 μ M	250	28.79	31	42
1914 10 μ M	229	29.27	31	42
DMSO	257	25.12	26	40
NT	298	27.22	31	40

Látka 1888 o koncentraci 10 μ M prodloužila průměr délky života oproti negativním i pozitivní kontrole. Medián délky života je identický s pozitivní kontrolou a s jednou s negativních kontrol (NT). Látka dále prodloužila průměr a medián délky života i v porovnání s pozitivní kontrolou, hodnota Q90 je však nižší než u pozitivní kontroly.

Průběh celého experimentu je možné přehledněji posoudit z Kaplan-Meierovy křivky přežití



Obr8: Kaplan-Meierova křivka přežití, látka 1914(10 μ M) v porovnání s kontrolami

Z Kaplan-Meierovi křivky přežití byla vyhodnocena statistická významnost výsledků (P- hodnota korigovaná podle Bonferroniho).

Tabulka 14: Bonferroniho P hodnoty - látka 1914, 10 μ M

	Bonferroni P-hodnota
1914 10μM_{v.s.}K 10μM	13.3644
1914 10μM_{v.s.}DMSO	6.16x10 ⁻⁴
1914 10μM_{v.s.}NT	0.1554

Látka 1914 o koncentraci 10 μ M statisticky významně prodloužila délku života v porovnání s jednou z negativních kontrol (DMSO). V porovnání s populací v čistém médiu a s pozitivní kontrolou navzdory numerickému prodloužení však efekt statisticky významný není.

Ani u této látky se pozitivní efekt na délku života nepodařilo plně potvrdit.

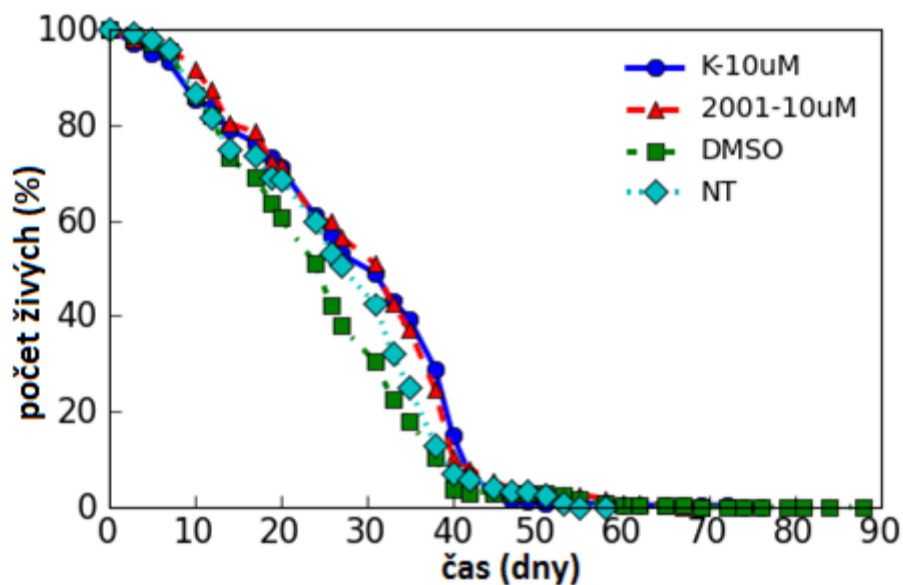
5) LRR 2001

Tabulka 15: Efekt látky 2001 v koncentraci 10 μ M

Název látky	Počet háďátek	Průměr	Medián	Q90
K10μM	250	28.79	31	42
2001 10μM	229	29.51	33	42
DMSO	257	25.12	26	40
NT	298	27.22	31	40

Látka 2001 v koncentraci 10 μ M prodloužila délku života ve všech sledovaných parametrech oproti negativním kontrolám. Prodloužila průměr a medián délky života i v porovnání s pozitivní kontrolou.

Průběh celého experimentu je možné přehledněji posoudit z Kaplan-Meierovy křivky přežití.



Obr9: Kaplan-Meierova křivka přežití, látka 2001(10 μ M) v porovnání s kontrolami

Z Kaplan-Meierovi křivky přežití byla vyhodnocena statistická významnost výsledků (P- hodnota korigovaná podle Bonferroniho).

Tabulka 16: Bonferroniho P hodnoty - látka2001, 10 μ M

	Bonferroni P-hodnota
2001 10μM_{v.s.}K 10μM	13.5926
2001 10μM_{v.s.}DMSO	1.96×10^{-4}
2001 10μM_{v.s.}NT	0.0588

Látka 2001 o koncentraci 10 μ M statisticky významně prodloužila délku života v porovnání s jednou z negativních kontrol(DMSO). V porovnání s pozitivní kontrolou a s populací v čistém médiu (i když zde je výsledek na hraně) navzdory numerickému prodloužení však efekt statisticky významný není.

Ani u této látky se nepodařilo efekt plně potvrdit.

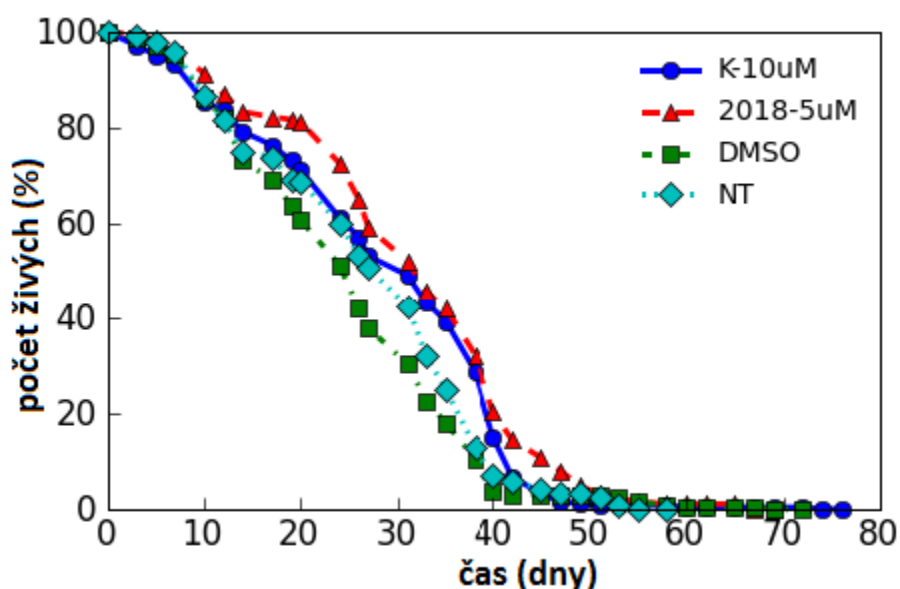
6) LRR 2018

Tabulka 17: Efekt látky 2018 v koncentraci 5 μ M

Název látky	Počet háďátek	Průměr	Medián	Q90
K10μM	250	28.79	31	42
2018 5μM	186	31.52	33	47
DMSO	257	25.12	26	40
NT	298	27.22	31	40

Látka 2018 v koncentraci 5 μ M prodloužila průměr a medián délky života i Q90 v porovnání s pozitivní i negativními kontrolami.

Průběh celého experimentu je možné přehledněji posoudit z Kaplan-Meierovy křivky přežití.



Obr10: Kaplan-Meierova křivka přežití, látka 2018(5 μ M) v porovnání s kontrolami

Z Kaplan-Meierovy křivky přežití byla vyhodnocena statistická významnost výsledků (P- hodnota korigovaná podle Bonferroniho).

Tabulka 18: Bonferroniho P hodnoty - látka 2018, 5 μ M

	Bonferroni P-hodnota
2018 5μM v.s. K 10μM	0.3752
2018 5μM v.s. DMSO	9.1×10^{-7}
2018 5μM v.s. NT	6.44×10^{-4}

Látka 2018 o koncentraci 5 μM statisticky významně prodloužila délku života v porovnání s negativními kontrolami. V porovnání s pozitivní kontrolou však efekt navzdory numerickému prodloužení statisticky významný není.

Pozitivní efekt látky 2018 se nám podařilo potvrdit na větší populaci. Látka numericky prodloužila délku života i v porovnání s pozitivní kontrolou navzdory tomu, že byla testována v o polovinu nižší koncentraci.

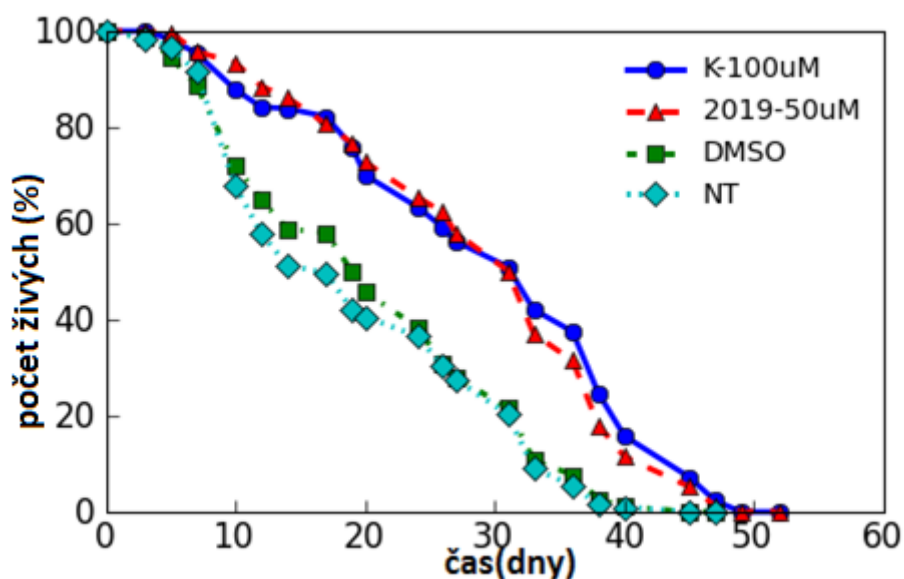
7) LRR 2019

Tabulka 19: Efekt látky 2019 v koncentraci 50 μM

Název látky	Počet háďátek	Průměr	Medián	Q90
K100μM	304	29.61	33	45
2019 50μM	305	29.45	33	45
DMSO	260	20.75	20	36
NT	399	19.75	17	33

Látka 2019 v koncentraci 50 μM prodloužila všechny sledované parametry v porovnání s negativními kontrolami. Průměrná délka života byla kratší než u pozitivní kontroly, v obou zbylých parametrech byl efekt stejný.

Průběh celého experimentu je možné přehledněji posoudit z Kaplan-Meierovy křivky přežití.



Obr11: Kaplan-Meierova křivka přežití, látka 2019(5 μ M) v porovnání s kontrolami

Z Kaplan-Meierovi křivky přežití byla vyhodnocena statistická významnost výsledků (P- hodnota korigovaná podle Bonferroniho).

Tabulka 20: Bonferroniho P hodnoty - látka 2019, 10 μ M

	Bonferroni P-hodnota
2019 50 μ M v.s. K 100 μ M	2.8379
2019 50 μ M v.s. DMSO	<1x10 ⁻⁷
2019 50 μ M v.s. NT	<1x10 ⁻⁷

Prodloužení délky života je statisticky významné v porovnání s negativními kontrolami.

V porovnání s pozitivní kontrolou efekt statisticky významný není.

Efekt této látky je patrný i v experimentu s větší populací.

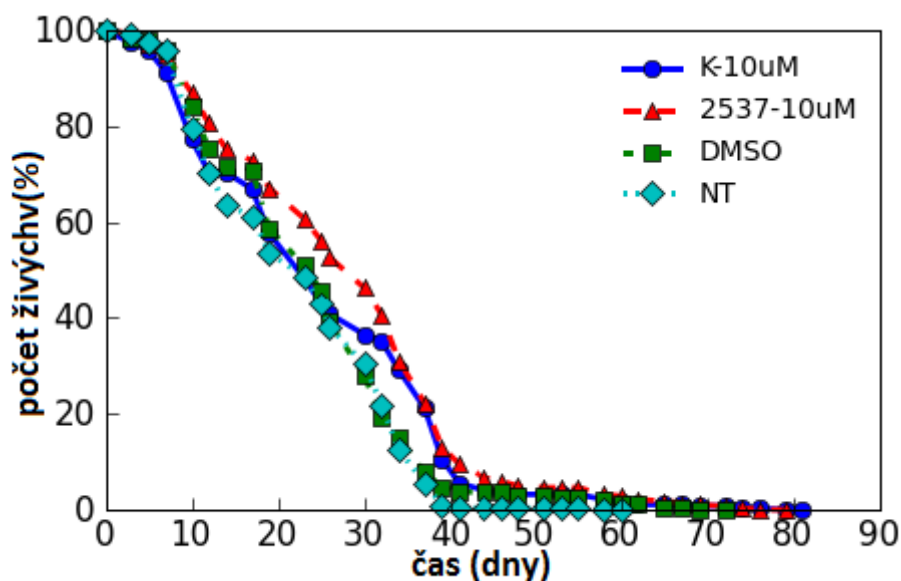
8) LRR 2537

Tabulka 21: Efekt látky 2537 v koncentraci 10 μ M

Název látky	Počet hád'átek	Průměr	Medián	Q90
K10 μ M	379	25.13	23	41
253710 μ M	284	28.12	30	41
DMSO	272	24.25	25	37
NT	311	22.62	23	37

Látka 2537 v koncentraci 10 μM prodloužila délku života ve všech sledovaných parametrech oproti negativním kontrolám. Prodloužila průměr a medián délky života i v porovnání s pozitivní kontrolou.

Průběh celého experimentu je možné přehledněji posoudit z Kaplan-Meierovy křivky přežití.



Obr11: Kaplan-Meierova křivka přežití, látka 2537(10 μM) v porovnání s kontrolami

Z Kaplan-Meierovy křivky přežití byla vyhodnocena statistická významnost výsledků (P- hodnota korigovaná podle Bonferroniho).

Tabulka 22: Bonferroniho P hodnoty - látka 2537, 10 μM

	Bonferroni P-hodnota
2537 10μM v.s. K 10μM	0.805
2537 10μM v.s. DMSO	1.288×10^{-4}
2537 10μM v.s. NT	$<10^{-7}$

Prodloužení délky života je statisticky významně v porovnání s negativními kontrolami. V porovnání s pozitivní kontrolou efekt statisticky významný není.

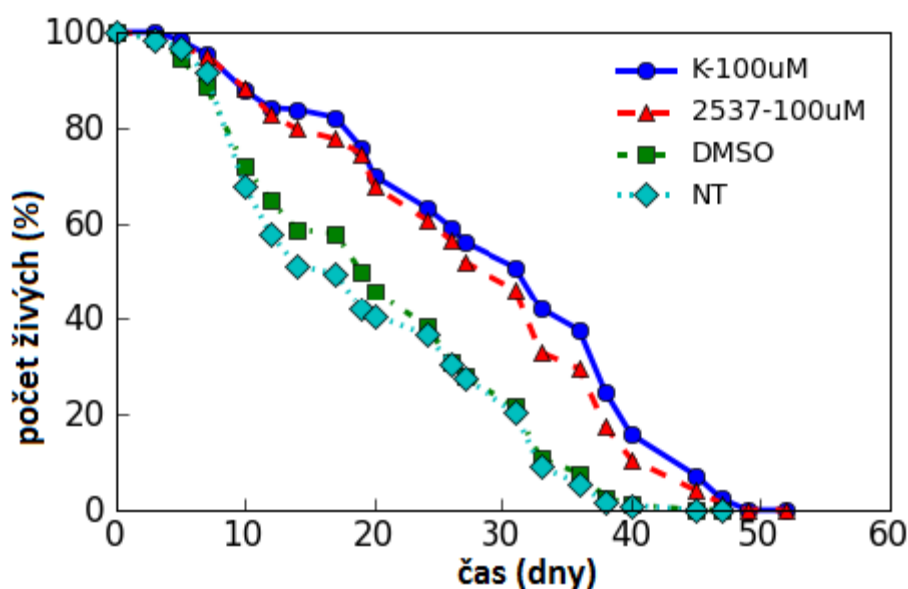
Efekt této látky se tedy potvrdil i v experimentu s větší populací.

Tabulka 23: Efekt látky 2537 v koncentraci 100 μ M

Název látky	Počet háďátek	Průměr	Medián	Q90
K100μM	304	29.61	33	45
2537 100μM	292	27.97	31	45
DMSO	260	20.75	20	36
NT	399	19.75	17	33

Látka 2537 v koncentraci 100 μ M prodloužila délku života ve všech sledovaných parametrech oproti negativním kontrolám. Průměr a medián délky života je však nižší než u pozitivní kontroly. Hodnota Q90 je shodná s pozitivní kontrolou.

Průběh celého experimentu je možné přehledněji posoudit z Kaplan-Meierovy křivky přežití.



Obr 12: Kaplan-Meierova křivka přežití, látka 2537(100 μ M) v porovnání s kontrolami

Z Kaplan-Meierovy křivky přežití byla vyhodnocena statistická významnost výsledků (P- hodnota korigovaná podle Bonferroniho).

Tabulka 24: Bonferroniho P hodnoty – látka 2537, 100 μ M

	Bonferroni P-hodnota
2537 100μM v.s. K 100μM	0.4704
2537 100μM v.s. DMSO	<1x10 ⁻⁷
2537 100μM v.s. NT	<1x10 ⁻⁷

Prodloužení délky života je statisticky významně v porovnání s negativními kontrolami. V porovnání s pozitivní kontrolou efekt statisticky významný není.

Efekt některých látek byl statisticky významný v porovnání s kontrolami, je tedy možné říct, že se jej podařilo potvrdit. Jednalo se o následující látky: 1796 (10 a 100 μ M), 2018 (5 μ M), 2019 (50 μ M) a 2537 (10 μ M). I zbylé látky však prodloužily alespoň některý ze sledovaných parametrů v porovnání s negativními kontrolami a jejich efekt byl statisticky významný v porovnání alespoň s jednou kontrolou.

Vzhledem ke změnám v podmínkách mezi prvním a druhým experimentem by však bylo vhodné pokus ještě minimálně jednou opakovat. Větší množství dat by bylo vhodné získat i pro další posouzení aktivity látek, u kterých se vliv na délku života nepodařilo plně prokázat. Metodologie využitá v této práci je poměrně pracná, možná by tedy bylo vhodné využít jiný postup. Možností by mohl být například WormScan, který se od doby začátku této práce podařilo u nás v laboratoři zavést. Vzhledem k tomu, že v rámci WormScanu jsou látky testovány na pevném médiu je však možné, že by efekt zanikl a to z důvodu horšího vstřebávání látek na pevném médiu, jak bylo doloženo například zde [80]. Bylo by zajímavé srovnat účinnost vstřebávání některých cytokininů v pevném a tekutém médiu pomocí HPLC-MS, aby se zjistilo, zda jsou takovéto obavy relevantní. Takovýto experiment by měl být v podmínkách naší laboratoře proveditelný.

Kinetin se osvědčil jako pozitivní kontrola, v obou experimentech délku života háďátek prodloužil. To je v souladu s předchozími zkušenostmi z naší z laboratoře. Pozitivní vliv kinetinu na délku života se tedy podařilo dále podložit. Schopnost kinetinu pozitivně modulovat některé projevy stárnutí byla pozorována již dříve v jiných systémech, jak je podrobněji rozebráno v podkapitole 1.7.

Žádná z látek nebyla statisticky významně aktivnější než kinetin, nicméně u některých bylo patrné numerické prodloužení délky života, které naznačuje, že by jejich aktivita mohla být vyšší.

Při srovnání obou negativních kontrol v druhém experimentu – háďátek v čistém médiu a háďátek vystavených DMSO – si můžeme povšimnout variability mezi deskami. Na dvou (první a druhé desce) žijí déle háďátka v DMSO, na jedné (třetí desce) háďátka v čistém médiu. Podezření z prvního experimentu na mírnou toxicitu

kombinace amfotericinu B a DMSO se tedy v druhém experimentu spíše nepotvrdilo a rozdíl můžeme přičíst přirozené variabilitě v rámci populace. Ani na jedné desce nebyl každopádně rozdíl mezi kontrolami statisticky významný.

Amfotericin B by v případě většího výskytu plísňových kontaminací měl být bezpečným řešením. V jiných laboratořích, včetně laboratoře, která sestavila v této práci používaný protokol, je amfotericin B používán standardně [81].

Smyslem této práce nebyla hlubší analýza mechanismů účinku potenciálně aktivních látek, nicméně byla by dalším logickým krokem. Bylo by vhodné provést například experimenty na sérii různých mutantních linií s pozměněnou délkou života a sledovat, zda testované látky budou schopné tento efekt dále prodloužit.

Při dalších experimentech by bylo výhodné využít znalosti předpokládaných mechanismů účinků jiných cytokininů. Nelze ale vyloučit, že látky testované v této práci působí dosud nepopsaným mechanismem. Zda látky chrání proti oxidativnímu stresu bychom mohli ověřit pomocí stresových testů, kdy jsou hádátka po několik dní vystavena nejprve účinku potenciálně aktivní látky a následně vystavena efektu látky indukující oxidativní stres (paraquat, juglon)[83]. Může být sledováno jak přežití *C. elegans* v letálních koncentracích stresorů, tak přímo vznik ROS např. pomocí barviva 2',7-dichlorofluorescein diacetátu [83].

Zda látky fungují jako hormetiny by se mohlo ověřit například testem, kdy je společně s látkou podán silný antioxidant. Pokud by se efekt látky ztratil, naznačovalo by to mitohormezi[84].

Efekt látek by mohl být dále sledován také na molekulární úrovni pomocí molekulárně biologických metod nebo pomocí reportérových linií.

Závěr

V rámci této práce bylo otestováno celkem 32 cytokininů substituovaných v pozici 8 purinu. Žádná z látek nebyla akutně toxická.

Po iniciálním skríninku na malých populacích bylo vybráno 8 nejaktivnějších látek, jež byly otestovány na větších populacích. Z těchto 8 látek 4 statisticky významně prodloužily délku života v porovnání s negativními kontrolami tj. čistým médiem a médiem obsahujícím vehikulum (DMSO). Jednalo se o následující látky 1796(10 a 100 μ M), 2018 (5 μ M), 2019 (50 μ M) a 2537 (10 μ M).

Zbýlé 4 látky – 1830 (10 μ M), 1888 (10 μ M), 2001 (10 μ M) a 1914 (10 μ M) – měly pozitivní efekt na některé sledované parametry v porovnání s negativními kontrolami a byly schopny statisticky významně prodloužit délku života v porovnání s alespoň jednou negativní kontrolou.

Žádná z látek nebyla statisticky významně aktivnější než kinetin, jež byl použit jako pozitivní kontrola. Kinetin je cytokinin s dříve publikovanými účinky proti stárnutí a prodloužil již dříve délku života *C. elegans* i v naší laboratoři. U některých látek však bylo možno pozorovat větší efekt na některé ze sledovaných parametrů v porovnání s kinetinem.

Do budoucna by bylo vhodné provést další opakování experimentů s látkami, které prodloužily život *C. elegans* a v případě potvrzení aktivity se zaměřit na zkoumání jejich mechanismu účinku. Logickým krokem je i testování cytokininů v modelech onemocnění spojených se zvýšenou mírou stresu. K dispozici je např. řada kmenů *C. elegans* pro studium neurodegenerativních chorob.

Seznam zkratek:

<i>C. elegans</i>	<i>Ceanorhabditis elegans</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
FOXO	Forkhead transcription factors (transkripční faktory)
GFP	Green fluorescein protein (zelený fluorescenční protein)
HPLC-MS	High Performance liquid chromatography with mass spectrometry(vysokovýkonná kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem)
IIS	Insulin/insulin-like growth factor signalling pathway
K	Kinetin
NGM	Nematode growth medium (médium pro růst háďátek)
NT	Non-treated (neošetřené)
OASIS	Online application for survival analysis (Online aplikace pro analýzu přežití)
PM	Petriho miska
ROS	Reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
TOR	Target of rapamycin

Reference

- [1] Alberts, B., et al. "*Caenorhabditis Elegans*: Development from the Perspective of the Individual Cell." (2002)
- [2] Sedlák, E. *Zoologie bezobratlých*. Brno, Masarykova univerzita, (2002)
- [3] Grant, B. D. and M. Sato, Intracellular trafficking *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.77.1, <http://www.wormbook.org>. Abstract(2006)
- [4] Baldi, C., S. Cho, and R. E. Ellis. "Mutations in two independent pathways are sufficient to create hermaphroditic nematodes." *Science* 326.5955 (2009): 1002-1005.
- [5] Avery, L., and H. R. Horvitz. "Pharyngeal pumping continues after laser killing of the pharyngeal nervous system of *C. elegans*." *Neuron* 3.4 (1989): 473-485.
- [6] Albertson, D. G., and J. N. Thomson. "The pharynx of *Caenorhabditis elegans*." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 275.938 (1976): 299-325.
- [7] Brenner, S.. "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* 77.1 (1974): 71-94
- [8] White, J. G., et al. "The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*: the mind of a worm." *Phil. Trans. R. Soc. Lond* 314 (1986): 1-34.
- [9] Byerly, L., R. C. Cassada, and R. L. Russell. "The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction." *Developmental biology* 51.1 (1976): 23-33.
- [10] Cassada, R. C., and R. L. Russell. "The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Developmental biology* 46.2 (1975): 326-342.
- [11] Cassada, R. C., and R. L. Russell. "The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Developmental biology* 46.2 (1975): 326-342
- [12] Greenstein, D. "Control of oocyte meiotic maturation and fertilization." (2005).

- [13] Brenner, S. "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* 77.1 (1974): 71-94.
- [14] Sulston, J. E., and H. R. Horvitz. "Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*." *Developmental biology* 56.1 (1977): 110-156.
- [15] Baldi, C., S. Cho, and R. E. Ellis. "Mutations in two independent pathways are sufficient to create hermaphroditic nematodes." *Science (New York, NY)* 326.5955 (2009): 1002-1005.
- [16] White, J. G., et al. "The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 275.938 (1976): 327-348.
- [17] Sulston, J., and M. Dew, and S. Brenner. "Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Journal of Comparative Neurology* 163.2 (1975): 215-226.
- [18] Horvitz, H. R.. "Worms, life, and death (Nobel lecture)." *Chembiochem* 4.8 (2003): 697-71.
- [19] Fire, A. Z., and C. C. Mello. "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006." *NobelPrize.org*. November 20 (2008).
- [20] Roda, A. "Discovery and development of the green fluorescent protein, GFP: the 2008 Nobel Prize." *Analytical and bioanalytical chemistry* 396.5 (2010): 1619-1622.
- [21] Kirienko, Na V., K. Mani, and D. S. Fay. "Cancer models in *Caenorhabditis elegans*." *Developmental Dynamics* 239.5 (2010): 1413-1448
- [22] Porte, D., D. G. Baskin, and M. W. Schwartz. "Insulin signaling in the central nervous system a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans." *Diabetes* 54.5 (2005): 1264-1276.
- [23] Link, C. D., et al. "Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model." *Neurobiology of aging* 24.3 (2003): 397-413.
- [24] Chalfie, M. "Genome sequencing: The worm revealed." *Nature* 396.6712 (1998): 620-621.
- [25] Vanfleteren, J. R. "Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans*." *Biochem. J* 292 (1993): 605-608

- [26] Kenyon, C., et al. "A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type." *Nature* 366.6454 (1993): 461-464
- [27] Ayyadevara, S., et al. "Remarkable longevity and stress resistance of nematode PI3K-null mutants." *Aging cell* 7.1 (2008): 13-22.
- [28] Barbieri, M., et al. "Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans." *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* 285.5 (2003): E1064-E1071.
- [29] Harman, D. "Free radical theory of aging: an update." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1067.1 (2006): 10-21.
- [30] Harman, D. "Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009." *Biogerontology* 10.6 (2009): 773-781
- [31] Tolmasoff, J. M., T. Ono, and R. G. Cutler. "Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77.5 (1980): 2777-2781.
- [32] Guarente, L., and C. Kenyon. "Genetic pathways that regulate ageing in model organisms." *Nature* 408.6809 (2000): 255-262
- [33] Houthoofd, K., et al. "Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in *Caenorhabditis elegans*." *Experimental gerontology* 37.12 (2002): 1371-1378.
- [34] Back, P., Bart P. Braeckman, and F. Matthijssens. "ROS in aging *Caenorhabditis elegans*: damage or signaling?." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012 (2012).
- [35] Hayflick, L. "Antecedents of cell aging research." *Experimental gerontology* 24.5 (1989): 355-365.
- [36] Pierpaoli, W., and W. Regelson. "Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91.2 (1994): 787-791.
- [37] Kim, S. G., Gwen R. Buel, and J. Blenis. "Nutrient regulation of the mTOR complex 1 signaling pathway." *Molecules and cells* 35.6 (2013): 463-473.].
- [38] Oh, S. W., et al. "JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-

- 16." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.12 (2005): 4494-4499.
- [39] Braidy, N., et al. "Sirtuins in cognitive ageing and Alzheimer's disease." *Current opinion in psychiatry* 25.3 (2012): 226-230.
- [40] Antebi, A. "Genetics of aging in *Caenorhabditis elegans*." *PLoS Genet* 3.9 (2007): 1565-1571.
- [41] Partridge, L., D. Gems, and D. J. Withers. "Sex and death: what is the connection?." *Cell* 120.4 (2005): 461-472.
- [42] López-Otín, C., et al. "The hallmarks of aging." *Cell* 153.6 (2013): 1194-1217.
- [43] Kenyon, C. J. "The genetics of ageing." *Nature* 464.7288 (2010): 504-512.
- [44] Tissenbaum, H. A. "Genetics, life span, health span, and the aging process in *Caenorhabditis elegans*." *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 67.5 (2012): 503-510
- [45] Iwasa, H., et al. "Novel EGF pathway regulators modulate *C. elegans* healthspan and lifespan via EGF receptor, PLC- γ , and IP3R activation." *Aging cell* 9.4 (2010): 490-505.
- [46] Tatar, M. "Can we develop genetically tractable models to assess healthspan (rather than life span) in animal models?." *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* (2009): gln067.
- [47] Bamps, S., and I. A. Hope. "Large-scale gene expression pattern analysis, in situ, in *Caenorhabditis elegans*." *Briefings in functional genomics & proteomics* 7.3 (2008): 175-183.
- [48] Garigan, D., et al. "Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation." *Genetics* 161.3 (2002): 1101-1112
- [49] Glenn, C. F., et al. "Behavioral deficits during early stages of aging in *Caenorhabditis elegans* result from locomotory deficits possibly linked to muscle frailty." *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 59.12 (2004): 1251-1260
- [50] Glenn, C. F., et al. "Behavioral deficits during early stages of aging in *Caenorhabditis elegans* result from locomotory deficits possibly linked to

- muscle frailty." *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 59.12 (2004): 1251-1260
- [51] McGee, M. D., et al. "Loss of intestinal nuclei and intestinal integrity in aging *C. elegans*." *Aging cell* 10.4 (2011): 699-710
 - [52] Davis Jr, B. O., G. L. Anderson, and D. B. Dusenbery. "Total luminescence spectroscopy of fluorescence changes during aging in *Caenorhabditis elegans*." *Biochemistry* 21.17 (1982): 4089-4095.
 - [53] Garigan, D., et al. "Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation." *Genetics* 161.3 (2002): 1101-1112.
 - [54] Kawano, T., et al. "Lifespan extending activity of substances secreted by the nematode *Caenorhabditis elegans* that include the dauer-inducing pheromone." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 69.12 (2005): 2479-2481.
 - [55] Leung, C. K., et al. "High-throughput screening and biosensing with fluorescent *C. elegans* strains." *Journal of Visualized Experiments* 51 (2011).
 - [56] Hulme, S. E., et al. "Lifespan-on-a-chip: microfluidic chambers for performing lifelong observation of *C. elegans*." *Lab on a Chip* 10.5 (2010): 589-597.
 - [57] Zheng, S., et al. "Drug absorption efficiency in *Caenorhabditis elegans* delivered by different methods." *PloS one* 8.2 (2013).
 - [58] Solis, G. M., and M. Petrascheck. "Measuring *Caenorhabditis elegans* life span in 96 well microtiter plates." *Journal of visualized experiments: JoVE* 49 (2011).
 - [59] Mathew, M. D., N. D. Mathew, and Paul R. Ebert. "WormScan: A technique for high-throughput phenotypic analysis of *Caenorhabditis elegans*." *PloS one* 7.3 (2012).
 - [60] Hulme, S. Elizabeth, et al. "Lifespan-on-a-chip: microfluidic chambers for performing lifelong observation of *C. elegans*." *Lab on a Chip* 10.5 (2010): 589-597.
 - [61] Stroustrup, N., et al. "The *Caenorhabditis elegans* lifespan machine." *Nature methods* 10.7 (2013): 665-670.

- [62] Arvanitis, M., J. Glavis-Bloom, and E. Mylonakis. "C. elegans for anti-infective discovery." *Current opinion in pharmacology* 13.5 (2013): 769-774.
- [63] Leung, C. K., et al. "An ultra high-throughput, whole-animal screen for small molecule modulators of a specific genetic pathway in *Caenorhabditis elegans*." (2013): e62166.
- [64] Holden-Dye, L., and R. J. Walker. "Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*." *WormBook: the online review of C. elegans biology* (2014): 1.
- [65] Rattan, S. IS, and Br. FC Clark. "Kinetin delays the onset of aging characteristics in human fibroblasts." *Biochemical and biophysical research communications* 201.2 (1994): 665-672.
- [66] Simpkin, K. G., and G. C. Coles. "The use of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 31.1 (1981): 66-69.
- [67] Sun, J. H., et al. "[Effect of kinetin on ovary and uterus in D-galactose-induced female mouse model of aging]." *Sheng li xue bao:[Acta physiologica Sinica]* 65.4 (2013): 389-394.
- [68] Leung, C. K., et al. "An ultra high-throughput, whole-animal screen for small molecule modulators of a specific genetic pathway in *Caenorhabditis elegans*." (2013): e62166.
- [69] Griffaut, B., et al. "Cytotoxic effects of kinetin riboside on mouse, human and plant tumour cells." *International journal of biological macromolecules* 34.4 (2004): 271-275.
- [70] Rattan, S. IS. "N6-furfuryladenine (kinetin) as a potential anti-aging molecule." *Journal of anti-aging medicine* 5.1 (2002): 113-116.
- [71] Yang, B., et al. "Trans-Zeatin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAP kinase signaling in human skin fibroblasts." *International journal of molecular medicine* 23.4 (2009): 555-560.
- [72] Verbeke, P., et al. "Kinetin inhibits protein oxidation and glycooxidation in vitro." *Biochemical and biophysical research communications* 276.3 (2000): 1265-1270.

- [73] Hertz, N. T., et al. "A neo-substrate that amplifies catalytic activity of Parkinson's-disease-related kinase PINK1." *Cell* 154.4 (2013): 737-747.
- [74] Choi, S. J., et al. "Zeatin prevents amyloid β -induced neurotoxicity and scopolamine-induced cognitive deficits." *Journal of medicinal food* 12.2 (2009): 271-277.
- [75] Hsiao, G., et al. "Inhibitory activity of kinetin on free radical formation of activated platelets in vitro and on thrombus formation in vivo." *European journal of pharmacology* 465.3 (2003): 281-287.
- [76] Rattan, S. IS. "Principles and practice of hormetic treatment of aging and age-related diseases." *Human & experimental toxicology* 27.2 (2008): 151-154.
- [77] *PLOS ONE: OASIS: Online Application for the Survival Analysis of Lifespan Assays Performed in Aging Research* [online]. [cit. 2015-07-29]. Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0023525>
- [78] McDermott, S. P., et al. "A small molecule screening strategy with validation on human leukemia stem cells uncovers the therapeutic efficacy of kinetin riboside." *Blood* 119.5 (2012): 1200-1207.
- [79] Wang, X., et al. "Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by DMSO is dependent on sir-2.1 and daf-16." *Biochemical and biophysical research communications* 400.4 (2010): 613-618.
- [80] Zheng, S., et al. "Drug absorption efficiency in *Caenorhabditis elegans* delivered by different methods." *PloS one* 8.2 (2013).
- [81] Solis, G. M., and M. Petrascheck. "Measuring *Caenorhabditis elegans* life span in 96 well microtiter plates." *Journal of visualized experiments: JoVE* 49 (2011).
- [82] Rodriguez, M., et al. "Worms under stress: *C. elegans* stress response and its relevance to complex human disease and aging." *Trends in Genetics* 29.6 (2013): 367-374.
- [83] Fong, S., J. Gruber, and B. Halliwell. "Measuring reactive oxygen species in *C. elegans* using DCFDA—a word of caution." *Worm Breeder's Gaz* 18.11 (2010).

- [84] Yang, W., and S. Hekimi. "A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*." PLoS biology 8.12 (2010): 2926.