



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Vyhledávání neuroprotektivních látek

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Barbora Drozdová
Studijní program:	N0511P030001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví – Experimentální biologie
Studijní obor:	Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví – Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Dominik Vitek
Termín odevzdání práce:	2025

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE:

Jméno a příjmení autora	Bc. Barbora Drozdová
Název práce	Vyhledávání neuroprotektivních látek
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
Konzultant	Mgr. Dominik Vítek
Rok obhajoby práce	2025

Abstrakt

Neurodegenerativní onemocnění jsou charakterizována progresivním postižením neuronů a jejich synaptických spojení vedoucím k motorickým a kognitivním poruchám. Současná léčba cílí převážně na zmírnění symptomů. Tato práce je zaměřena na testování organoselenových látek se známou neuroprotektivní aktivitou z experimentů na lidských buňkách na modelovém organismu *Caenorhabditis elegans*. Po pilotních experimentech s fragmentem proteinu tau, byla testována ochrana proti oxidačnímu a tepelnému stresu. Efekty na *C. elegans* v 96 a 384jamkových deskách byly hodnoceny pomocí automatické mikroskopie a přístroje pro detekci motility (WMicrotracker). Optimalizované parametry zahrnovaly počet jedinců na jamku, množství potravy, objem, koncentraci floxuridinu a koncentraci stresoru (juglon, paraquat). U některých organoselenových derivátů byla pozorována protektivní aktivita vůči působení stresoru, avšak tento efekt nebyl při opakování konzistentní. Překvapením byla vysoká toxicita ebselenu při indukovaném oxidačním stresu.

Klíčová slova	<i>Caenorhabditis elegans</i> , neurodegenerace, juglon, paraquat, tepelný stres, stres, protekce
Počet stran	86
Počet příloh	0
Jazyk	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Barbora Drozdová
Title of thesis	Screening for neuroprotective drugs
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
Advisor	Mgr. Dominik Vitek
The year of presentation	2025

Abstract

Neurodegenerative diseases are characterized by progressive degeneration of neurons and their synaptic connections, leading to motor and cognitive impairments. Current treatments mainly aim to alleviate symptoms. This study focuses on testing organoselenium compounds with known neuroprotective activity, previously demonstrated in human cell experiments, on the model organism *Caenorhabditis elegans*. Following pilot experiments involving a tau protein fragment, the compounds were evaluated for their protective effects against oxidative and heat stress. The effects on *C. elegans* in 96- and 384-well plates were evaluated using automated microscopy and a motility detection system (WMicrotracker). Optimized parameters included number of individuals per well, food quantity, volume, floxuridine concentration, and stressor concentration (juglone, paraquat). Protective activity against stressor treatment was observed for some organoselenium derivatives, but this effect was not consistent across replicates. Unexpectedly, ebselen exhibited high toxicity under induced oxidative stress.

Key words	<i>Caenorhabditis elegans</i> , neurodegeneration, juglone, paraquat, heat stress, stress, protection
Number of pages	86
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Jiřího Vollera, Ph.D. a Mgr. Dominika Vítka za použití citované literatury.

.....

V Olomouci dne

.....

Podpis

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu diplomové práce Mgr. Jiřímu Vollerovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, čas a trpělivost, které mi v průběhu vypracování diplomové práce poskytl. Současně bych chtěla poděkovat Mgr. Dominiku Vítkovi za čas a trpělivost, které mi věnoval během praktické části této diplomové práce.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	9
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....	12
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	13
2.1 Modelové organismy	13
2.2 <i>Caenorhabditis elegans</i>	13
2.2.1 Anatomie.....	14
2.2.2 Reprodukční soustava	16
2.2.3 Životní cyklus	18
2.2.3 Ekologie a taxonomie	19
2.2.4 Stárnutí.....	21
2.2.6 Skrining léčiv.....	23
2.3 Neurodegenerativní onemocnění.....	24
2.3.1 Parkinsonova choroba.....	25
2.3.2 Amyotrofická laterální skleróza.....	27
2.3.3 Alzheimerova choroba	29
2.3.3.1 Cholinergní hypotéza.....	29
2.3.3.2 Amyloidní hypotéza	30
2.3.3.3 Patologie tau proteinu.....	32
2.3.1.4 Hypotéza neurozánětu	32
2.3.1.5 Hypotéza oxidačního stresu a mitochondriální dysfunkce	33
3 PRAKTICKÁ ČÁST.....	35
3.3 Přístrojové a laboratorní vybavení.....	35
3.3.1 Spotřební materiál	35
3.4 Chemikálie.....	36
3.4.1 Pracovní postup přípravy chemikálií	36
3.4.1.1 Růstové médium pro <i>C. elegans</i> (NGM).....	36
3.4.1.2 S kompletní médium (S-complete medium).....	37
3.4.1.3 Roztok M9.....	37
3.4.1.4 Lyzační roztok.	37
3.4.1.5 Tryptonem pufrované médium (TB)	37
3.4.1.6 Příprava <i>E. coli</i> kmene OP50 v TB roztoku	37
3.4.1.7 Příprava OP50 v S-complete médiu	38
3.5 Metody kultivace <i>C. elegans</i>	38
3.5.1 Příprava NGM misek s kulturou <i>E. coli</i>	38
3.5.2 Přenos <i>C. elegans</i> pěstovaných na NGM miskách	38
3.5.3 Synchronizace vývoje	38

3.5.4	Stanovení počtu vajíček <i>C. elegans</i> po synchronizačním procesu.....	39
3.5.5	Přenesení L1 na NGM misky.....	39
3.5.6	Přenos <i>C. elegans</i> do tekutého média	39
3.6	Optimalizace přípravy vzorků s protektivními látkami	40
3.6.1	Aplikace s inkubací v mikrozkuvkách na rotátoru bez promytí.....	40
3.6.2	Aplikace s inkubací v mikrozkuvkách na rotátoru s promytím	40
3.6.3	Aplikace s inkubací ve 24jamkové destičce na třepačce s promytím	40
3.7	Optimalizace parametrů měření pomocí WMicrotrackeru	41
3.7.1	Počet háďátek na jamku.....	41
3.7.2	Koncentrace floxuridinu	41
3.7.3	Vliv dokrmování	41
3.7.4	Koncentrace <i>E. coli</i> OP50.....	41
3.7.5	Objem pro měření	41
3.7.6	Optimalizace koncentrace látek navozujících toxicitu	42
3.8	Metody měření.....	42
3.8.1	Měření motility pomocí WMicrotrackeru.....	42
3.8.1.1	Testování protektivních účinků	42
3.8.1.2	Testování tepelného stresu	42
3.8.2	Hodnocení motility automatickým mikroskopem.....	43
3.8.2.1	Testování protektivních účinků	43
3.8.2.2	Testování tepelného stresu	43
3.9	Zpracování dat	43
4	VÝSLEDKY	44
4.1	Optimalizace experimentů měřících motilitu zařízením Wmicrotracker	44
4.1.1	Ověření optimálního počtu <i>C. elegans</i>	44
4.1.2	Optimalizace koncentrace floxuridinu	45
4.1.3	Optimalizace koncentrace <i>E. coli</i> OP50	46
4.1.4	Optimalizace objemu pro měření.....	47
4.1.5	Optimalizace koncentrace látek indukujících toxicitu	48
4.1.5.1	Juglon	48
4.1.5.2	Paraquat	50
4.1.6	Vliv dokrmění	51
4.1.7	Testování toxicity	51
4.2	Testování účinků látek na automatickém mikroskopu	53
4.3	Testování účinků jednotlivých látek za současného působení stresoru.....	54
4.3.1	Výsledky získané preinkubací látky v mikrozkuvkách bez promytí.....	54
4.3.2	Výsledky získané preinkubací látky v mikrozkuvkách s promytím	55

4.3.3	Výsledky získané preinkubací látky ve 24jamkové destičce s promytím....	59
4.3.3.1	Látky 1, 14 a ebselen	59
4.3.3.2	Látky 2 a 13	65
4.4	Testování tepelného stresu.....	67
5	DISKUZE.....	73
5.1	Optimalizace testovaných parametrů.....	73
5.2	Testování účinku látek vůči juglonu a paraquatu	76
5.3	Testování účinku látek vůči tepelnému stresu.....	76
6	ZÁVĚR	78
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	79

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba
ADAM10	A disintegrin and metalloproteinase
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesteráza
AICD	C-terminální fragment APP
ALS	Amyotrofická laterální skleróza
AMPK	AMP-aktivovaná protein kináza
Aph-1	Anterior pharynx-defective 1
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amyloidový prekurzorový protein
A β	Amyloid beta
BACE1	Beta-sekretáza 1
C9ORF72	Otevřený čtecí rámec 72 na 9. chromozomu
CDK5	Cyklin-dependentní kináza 5
DJ-1	Protein PD 7
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTC	Distální koncové buňky
EBS	Ebselen
ECT	Elektronový transportní řetězec
FOXO	Forkhead box O
FUdR	5-fluoro-2'-deoxyuridine
GSK3- β	Glykogensyntázová kináza 3 beta
IDE	Enzym degradující inzulin
IIS	Insulin/insulin-like growth factor signaling pathway
IL-1 β	Interleukin 1 β

IL-6	Interleukin 6
iPSC	Indukovaná pluripotentní kmenová buňka
JGL	Juglon
LRRK2	Kináza bohatá na leucinové repetice 2
MAPT	Mikrotubuly asociované s tau proteinem
MDA	Malondialdehyd
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NEP	Neprilysin
NFT	Neurofibrilární klubka
NGM	Nematode growth medium
OP50	Kmen bakterie <i>E. coli</i> OP50
PARK2	Parkin RBR E3 ubiquitin ligase
PD	Parkinsonova choroba
PGC-1 α	Koaktivátor receptoru PPAR γ typu 1 α
PHF	Párové helikální filamenta
PRQ	Paraquat
PSEN1/2	Presenilin 1 a 2
RFC	Replikační faktor C
RNAi	Interferenční RNA
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RPM	Otáčky za minutu
sAPP- α/β	Soluble APP-alpha/beta
siRNA	Malá interferující RNA
SNCA	Gen synuklein alfa
SOD1	Superoxid dismutáza 1
TARDBP	Gen TAR DNA-vazebný protein 43

TB	Tryptonem pufované médium
TDP-43	TAR DNA-vazebný protein 43
TNF α	Tumor nekrotizující faktor alfa
YY1	Yin-Yang1
α Syn	Alfa-synuklein

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Caenorhabditis elegans (*C.elegans*) je 1 mm velká, hlístice žijící volně se po celém světě. Díky své velikosti, rychlému životnímu cyklu, hermafroditismu, průhlednému a dobře diferenciovanému tělu, plně zmapovanému genomu a nízkým nákladům spojených s její kultivací se velmi rychle stala jedním z klíčových modelových organismů (Corsi et al., 2015). Tato hlístice se běžně využívá pro studium buněčné smrti, diferenciace, stárnutí, pro skrínig potenciálně léčivých látek a ke studiu jejich mechanismu účinku. Mezi nejvýznamnější objevy výzkumu na *C. elegans* patří objev genetické regulace vývoje orgánů a apoptózy a objev RNAi (Conradt, 2005; Corsi et al., 2015; Watts, 2006). *C. elegans* také hraje klíčovou roli v hledání nových terapeutických přístupů k léčbě různých neurodegenerativních onemocnění, které jsou charakterizovány progresivní degenerací neuronů a jejich synaptických spojení v centrálním nervovém systému, což vede k poruše motorických a kognitivních schopností. Jejich vznik je podmíněn kombinací genetické výbavy jedince, faktorů prostředí a především věku. Vzhledem k trendu stárnutí populace v průmyslových zemích dochází k nárůstu neurodegenerativních chorob, kdy mezi nejčastější patří Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Amyotrofická laterální skleróza a Huntingtonova choroba (Dugger and Dickson, 2017; Lamprey et al., 2022; Przedborski et al., 2003a). Pro testování potenciálně protektivních látek proti oxidativnímu stresu, který je charakteristickým znakem neurodegenerativních chorob, byl v této diplomové práci využit modelový organismus *C. elegans*.

Cílem této diplomové práce bylo testování účinků různých potenciálně protektivních látek vůči stresovým podmínkám u modelového organismu *C. elegans*. Tyto stresové podmínky byly vyvolány látkami indukujícími oxidační stres, konkrétně juglonem a paraquatem. Kromě toho byl zkoumán vliv tepelného stresu a možnost jeho zmírnění testovanými látkami. Dále byl také testován vliv WT R2R3 tau peptidu na *C. elegans*. Pro efektivní hodnocení protektivních účinků testovaných látek byla využita metoda skrínigu pomocí WMicrotrackeru a analýza pomocí automatického mikroskopu.

Tato diplomová práce byla vypracována na Katedře experimentální biologie a na Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Modelové organismy

Studium modelových organismů výrazně přispělo k pochopení dědičnosti, vývoji, fyziologii, základních buněčných a molekulárních procesů. Navzdory rozmanitosti forem organismů byly výzkumem pečlivě vybraných organismů odhaleny univerzální principy. Tyto organismy byly vybrány na základě kombinace snadné experimentální práce s nimi a relevance pro konkrétní výzkumné otázky. Mezi jedny z nejvýznamnějších modelových organismů, z pohledu důležitosti a širokého použití, patří i *Caenorhabditis elegans*. Jedná se o první mnohobuněčný organismus, u kterého byl roku 1998 kompletně osekvenován genom, což umožnilo rozsáhlé transkriptomické a proteomické studie (Corsi et al., 2015; Müller and Grossniklaus, 2010).

Pro studium neurodegenerativních onemocnění (ND) se zvířecí modely rozdělují na modely přirozené, intervenční a genetické. Přirozené modely jsou charakteristické komplexem neurodegenerativních změn, které se objevují v průběhu stárnutí. U intervenčních modelů jsou patologické změny a symptomy podobné ND vyvolány pomocí chemikálií, přičemž se často zaměřují na neurozánět a oxidační stres. Jako genetické modely jsou nejčastěji zkoumané transgenní myši. Tyto genetické modifikace umožňují vznik patologických změn typických pro ND a významně tak přispívají ke studiu těchto chorob. Mezi zvířecí modely využívané pro studium ND patří primáti, psi, krysy, myši, *Drosophila melanogaster* či *Caenorhabditis elegans* (Castillo-Rangel et al., 2023; Chen and Zhang, 2022). Zvířecí modely při studiu ND poskytují informace o zkoumaných patofyziologických jevech pouze částečně, jelikož žádný zvířecí model nezahrnuje všechny charakteristiky a diagnostická či klinická kritéria, které jsou přítomné u lidí (Castillo-Rangel et al., 2023).

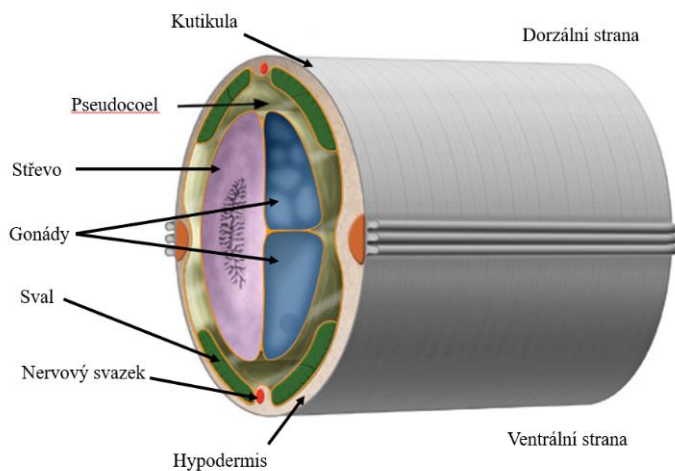
2.2 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans neboli háďátka obecné je malá, průhledná hlístice z čeledi *Rhabditidae*, která se nachází v půdách mírného pásma na různých místech světa, často v rozkládající se vegetaci. Ve volné přírodě se živí různými druhy bakterií, avšak v laboratorních podmínkách jsou krmeni *E. coli*. U *C. elegans* existují dvě sexuální formy, a to hermafroditi a samci, kteří vznikají non-disjunkcí pohlavního chromozomu. (Corsi et al., 2015).

Kultivace *C. elegans* byla do laboratorního výzkumu zavedena v 60. letech 20. století Sydney Brennerem. Navzdory jednoduché anatomii, kdy dospělý hermafrodit má pouze 959 a samec 1031 somatických buněk, disponuje také komplexní systémy podobnými těm u vyšších organismů. Patří mezi ně například proliferující zárodečná linie, jejíž počet buněk je variabilní v závislosti na pohlaví a podmínkách prostředí. Experimentálními výhodami tohoto organismu je snadné množení díky jejich hermafroditismu a krátkému životnímu cyklus. Jejich průhledné tělo, stereotypní vývoj a neměnný počet somatických buněk usnadnil popis vývoje jejich buněčné linie a zmapování počtu neuronů u hermafroditů i samců. Dokončením sekvenace genomu hádátka v roce 1998 bylo prokázáno, že přibližně 38 % jeho genů má lidské ortology. Všechny tyto vlastnosti, spolu se snadnou manipulací pomocí siRNA, z něj dělají ideální model pro eukaryotické studie a studium základních biologických procesů a nemocí (Corsi et al., 2015; Herndon et al., 2017; Nigon and Félix, 2017).

2.2.1 Anatomie

Stejně jako většina hlístic má *C. elegans* jednoduchý tělní plán. Tělo je nesegmentované, válcovité se zužujícími se konci a tvořené vnější a vnitřní soustřednou trubicí, které jsou oddělené pseudocoelomem. Vnější trubice je tvořena kolagenní kutikulou, hypodermis, vylučovacím, nervovým a svalovým systémem. Vnitřní trubice zahrnuje trávicí systém, tedy hltan, střevo a řitní otvor. V pseudocoelomu se nachází reprodukční systém – gonády (Obrázek 1). *C. elegans* zcela postrádá kosterní prvky a tvar těla je tak udržován vnitřním hydrostatickým tlakem, tzv. hydrostatickou kostrou. Dále nemají specializovanou oběhovou ani dýchací soustavu. Funkce těchto soustav jsou zajištěny difuzí a pohybem tekutin v pseudocoelomu (Altun, Zeynep F. et al., 2009; Riddle et al., 1997).



Obrázek 1: Příčný průřez tělem *C. elegans*. Převzaté z Altun, Zeynep F. et al., 2009.

Tělo háďátek je kryto kutikulou, tvořenou převážně kolagenními proteiny sekretovanými z hypodermis. Kutikula udržuje tvar těla, tvoří ochranou bariéru a vystýlá hltan a konečník. Je přerušena otvory, kterými prostupují struktury z různých tkání. Jedná se o otvory hltanu, vylučovacího póru, vulvy a análního otvoru. V kutikule se nachází také smyslové struktury dodávající *C. elegans* schopnost chemotaxe a mechanotaxe. V oblasti hlavy se nachází chemoreceptory (amfidy) a mechanoreceptory (cefalické a labiálních senzily). Dalšími mechanoreceptory jsou deiridové senzily, které se nacházejí ve středu těla. Na ocasním výběžku se nacházejí sekundární chemoreceptory, tzv. fasmidové senzily (Altun, Zeynep F. et al., 2009).

C. elegans má jednoduchý nervový systém obsahující 302 neuronů a 56 gliových buněk u hermafroditů a 383 neuronů a 82 gliových buněk u samců. Všechny neurony i gliové buňky jsou tzv. invariantní, tedy že jejich vývojová linie je od zygoty až do dospělosti daná a neměnná. Na základě morfologie a synaptické konektivity byly neurony rozděleny do 118 různých tříd. U háďátek je hlavní nervové centrum umístěno v hlavové oblasti, kde kolem hltanu vytváří nervový prstenec obklopující bazální membránu. Z něj vycházejí podélné svazky nervových vláken, které přiléhají k hypodermis a vedou na ventrální i dorzální straně po celé délce těla. Jejich propojení je zajištěno cirkulárními komisurami. Nervové spoje propojují nervový prstenec s párovými smyslovými receptory, jako jsou amfidy či fasmidy, dále s motorickým nervovým systémem a s několika malými ganglii v ocasní části těla (Durbin, 1987; Purice et al., 2025; Riddle et al., 1997; Tekieli et al., 2021).

Trávicí soustava je tvořena dvojlaločným hltanem, střevem a řitním otvorem. Hltan je díky vlastnímu nervovému, svalovému, žláзовému a epiteliárnímu systému téměř autonomní orgán, který vykazuje typické pumpovací pohyby zajišťující příjem potravy. Potrava je při průchodu peristaltickými pohyby mechanicky zpracována a přes fagyngeální chlopeň přesunuta do střeva. Střevo není pevně připojeno ke stěně těla, ale je ukotveno pomocí hltanových a rektálních chlopní. Skládá se z epiteliálních buněk nesoucích četné mikroklykky umožňující absorpci živin. Zbylý střevní obsah je následně vylučován přes rektální chlopeň do konečníku. K defekaci přispívají čtyři svaly nacházející se kolem zadního střeva a konečníku (Altun, Zeynep F. et al., 2009; Riddle et al., 1997).

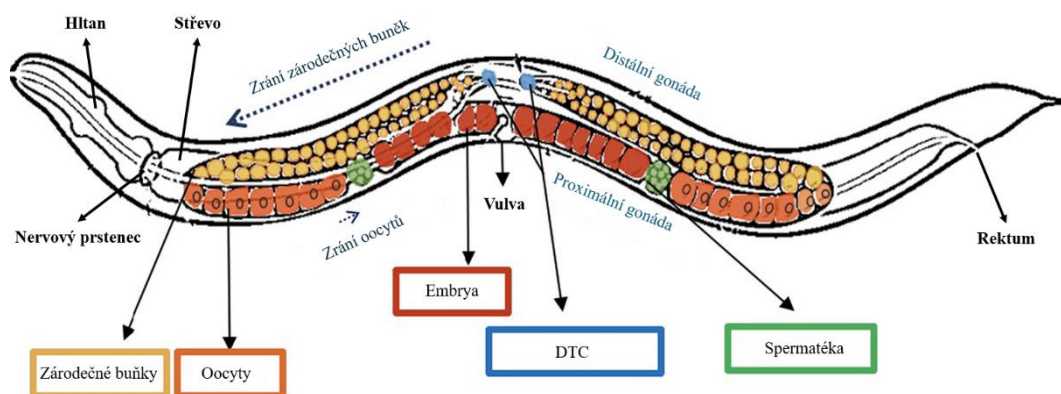
Pohyb háďátek je umožněn svalovým systémem, který je tvořen hladkou i příčně pruhovanou svalovinou. Příčně pruhovaná svalovina je uspořádána do čtyř podélných pruhů, a to dvou na ventrální a dvou na dorzální straně těla podél celé délky

hád'átka. Toto příčně pruhované svalstvo je přes tenkou vrstvou hypodermis připojeno k vnější kutikule. Pro inervaci svaloviny jsou nezbytná tzv. svalová ramena, což jsou výběžky tvořené svalovými buňkami. Ty se napojují na axony motoneuronů a umožňují tak přenos signálu ke svalové kontrakci. Kontrakce dvou ventrálních svalových pruhů a zároveň relaxace dorzálních svalových pruhů vede ke koordinovanému pohybu v elegantních sinusových vlnách, které zajistili *C. elegans* své jméno. Menší, hladká svalovina je soustředěná v oblasti hltanu, vulvy, střeva a konečníku (Altun, Zeynep F. et al., 2009; Riddle et al., 1997).

2.2.2 Reprodukční soustava

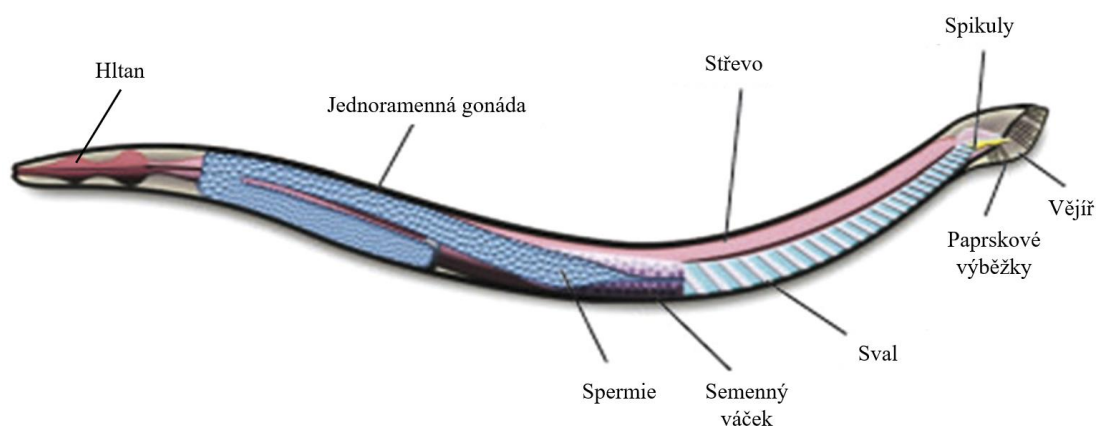
Reprodukční systém se liší dle pohlaví. U *C. elegans* jsou známy dva typy pohlaví, a to hermafroditi a samci. Obě pohlaví mají pět párů autozomů. Hermafroditi nesou dva chromozomy X. Jelikož téměř všechny vajíčka i spermie produkované hermafrodity jsou haploidní a obsahují tedy chromozom X, po samooplodnění vznikají další hermafroditi. Samci mají karyotyp XO a tvoří se velmi vzácně, pouze v 0,2 % případů. Samec vzniká, když dojde k oplodnění haploidního oocyту spermií, která nenese žádný pohlavní chromozom. K tomuto jevu dochází při nondisjunkci chromozomu X během meiózy. Samci produkují spermie s chromozomem X i bez něj v poměru 1:1, čímž dochází po páření ke vzniku právě poloviny samců a poloviny hermafroditů (Lints, R. and Hall, D. H., 2009).

Gonády hermafroditů jsou složeny ze dvou funkčně nezávislých částí, a to z předního a zadního gonádového ramene. Obě tyto ramena jsou stočená tak, že tvoří typický tvar písmene U spojující se v centrální děloze. Tento systém umožňuje efektivnější uspořádání reprodukčních orgánů v tělní dutině. Každé rameno se skládá ze zárodečné linie, somatických gonád zahrnujících vejcovod a spermatéku a dělohu, kde probíhá uchování ranných embryí. Na koncích gonád se nacházejí distální buňky (DTC), které zajišťují dělení zárodečných buněk. S dozráváním těchto buněk dochází k jejich posunu směrem k děloze, kde se hromadí a čekají na oplodnění (Obrázek 2). Gonády hermafroditů ve čtvrtém larválním stádiu tvoří ovotestis, který dočasně produkuje haploidní améboidní spermie, které jsou ukládány ve spermatéce. Poté přechází gonáda na tvorbu oocytů, které jsou následně uloženými spermii oplodněny. Po oplodnění oocyту následuje rychlá embryogeneze, během které se embrya hromadí v děloze a následně jsou přes vulvu vypuzovány (Athar and Templeman, 2022).



Obrázek 2: Anatomie hermafroditního dospělého *C. elegans*. Převzato z Athar and Templeman, 2022.

U samců se nachází pouze jedno gonádové rameno, které po celé délce jedince tvoří strukturu ve tvaru písmene J. Na ocasu samce se nachází specifické kopulační struktury důležité pro páření. Mezi ty patří paprskovité výběžky obsahující senzorické neurony reagující na chemické a mechanické podněty od hermafrodita. K orientaci s ventrální stranou obrácenou k hermafroditovi slouží rozšířená ocasní struktura, tzv. vějíř. Párové struktury spikuly umožňují lokalizovat a rozevřít hermafroditní vulvu, do níž samec uvolní spermie (Obrázek 3). Ty putují do hermafroditních spermaték, kde jsou přednostně vybírány k oplodnění oocytů (Altun, Zeynep F. et al., 2009; Athar and Templeman, 2022; Pires-daSilva, 2007).



Obrázek 3: Anatomie samčího dospělého *C. elegans*. Převzato z Pires-daSilva, 2007.

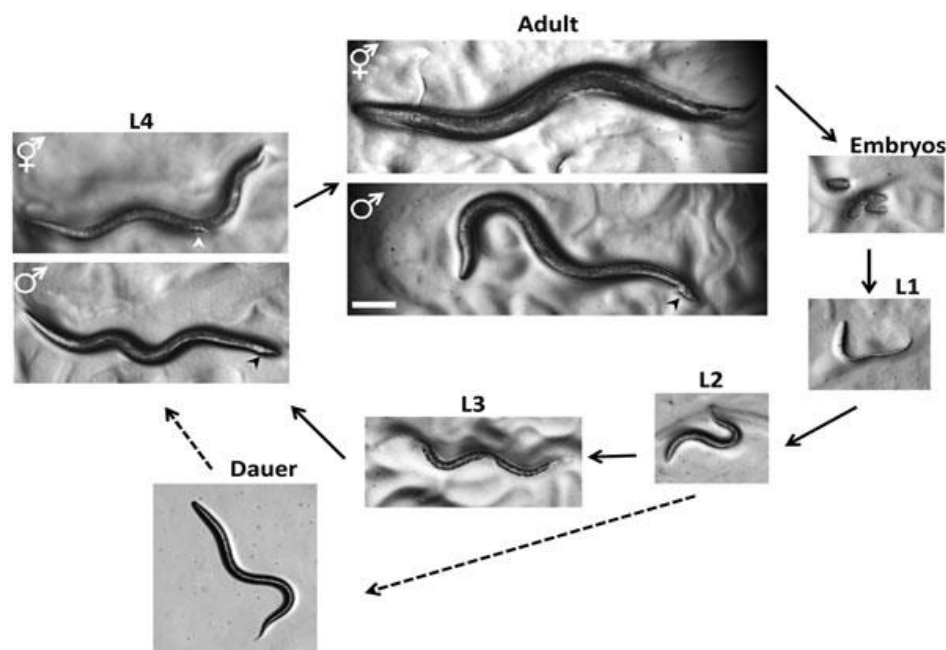
2.2.3 Životní cyklus

Životní cyklus u *C. elegans* je poměrně rychlý. Při 20 °C trvá jejich vývoj od vajíčka po dospělé 3 dny a celková životnost bývá 2-3 týdny. Jak již bylo řečeno výše, u hád'átek se nacházejí samooplodňující se hermafroditi a samci. Jednotlivá pohlaví lze však rozlišit až ve čtvrtém larválním stádiu a u dospělých jedinců (Herndon et al., 2017).

Vývoj *C. elegans* můžeme rozdělit do třech základních fází: 1) embryogeneze, 2) líhnutí a larvální vývoj a 3) dospělost a reprodukce. Embryogeneze začíná oploдněním vajíčka a rychlým vznikem nepropustné chitinové skořápky, která umožňuje vývoj embrya nezávislý na hermafroditu. Níže je popsán vývoj *C. elegans*, přičemž uvedené časy odpovídají vývoji při teplotě 20 °C.

Ke kladení vajíček dochází poté, co embryo dosáhne 24buněčného stádia, čehož je dosaženo přibližně 3 hodiny od oplození. Celkově fáze embryogeneze trvá přibližně 14 hodin. Embryo obsahující 558 buněčných jader, z nichž některá jsou součástí vícejaderných syncytií, se pak líhne a prochází čtyřmi larválními stádii (L1-4). V L1 fázi, která trvá přibližně 16 hodin, začínají přijímat potravu a vyvíjet se. Další fáze larválního vývoje trvají přibližně 12 hodin. Každé larvální stádium končí tzv. letargusem, což je období nečinnosti podobné spánku, ve kterém se vytváří nová vnější kolagenová vrstva (kutikula) a dochází k odlučování té staré. Dospělými jedinci se *C. elegans* stávají přibližně 12 hodin po odloučení kutikuly čtvrtého larválního stádia, kdy začínají produkovat potomstvo. To obvykle tvoří po dobu 3 dnů, dokud nedojde k vyčerpání vlastních spermií. Hermafroditi mohou samostatně vyprodukovat okolo 300 vlastních potomků. Pokud se však spáří se samcem jsou schopni vyprodukovat až 1000 potomků. Samci tedy slouží jako dárce nové kombinace genů. Po ukončení reprodukční fáze žijí hermafroditi 2–3 týdny a poté umírají stářím (Corsi et al., 2015).

Při nedostatku potravy či nevhodných podmínkách vnějšího prostředí může dojít k aktivaci alternativního cyklu. *C. elegans* se ve stádiu L2 svlékají do alternativního stádia L3, tzv. dauer larvy. Dochází k tvorbě tzv. dauer kutikuly, která slouží pro zvýšení odolnosti larvy při nepříznivých vnějších vlivech. Tato kutikula uzavírá ústní dutiny a tím dochází i k pozastavení vývoje. Díky tomu mohou dauer larvy přežívat i několik měsíců (Obrázek 4) (Corsi et al., 2015; Herndon et al., 2017).



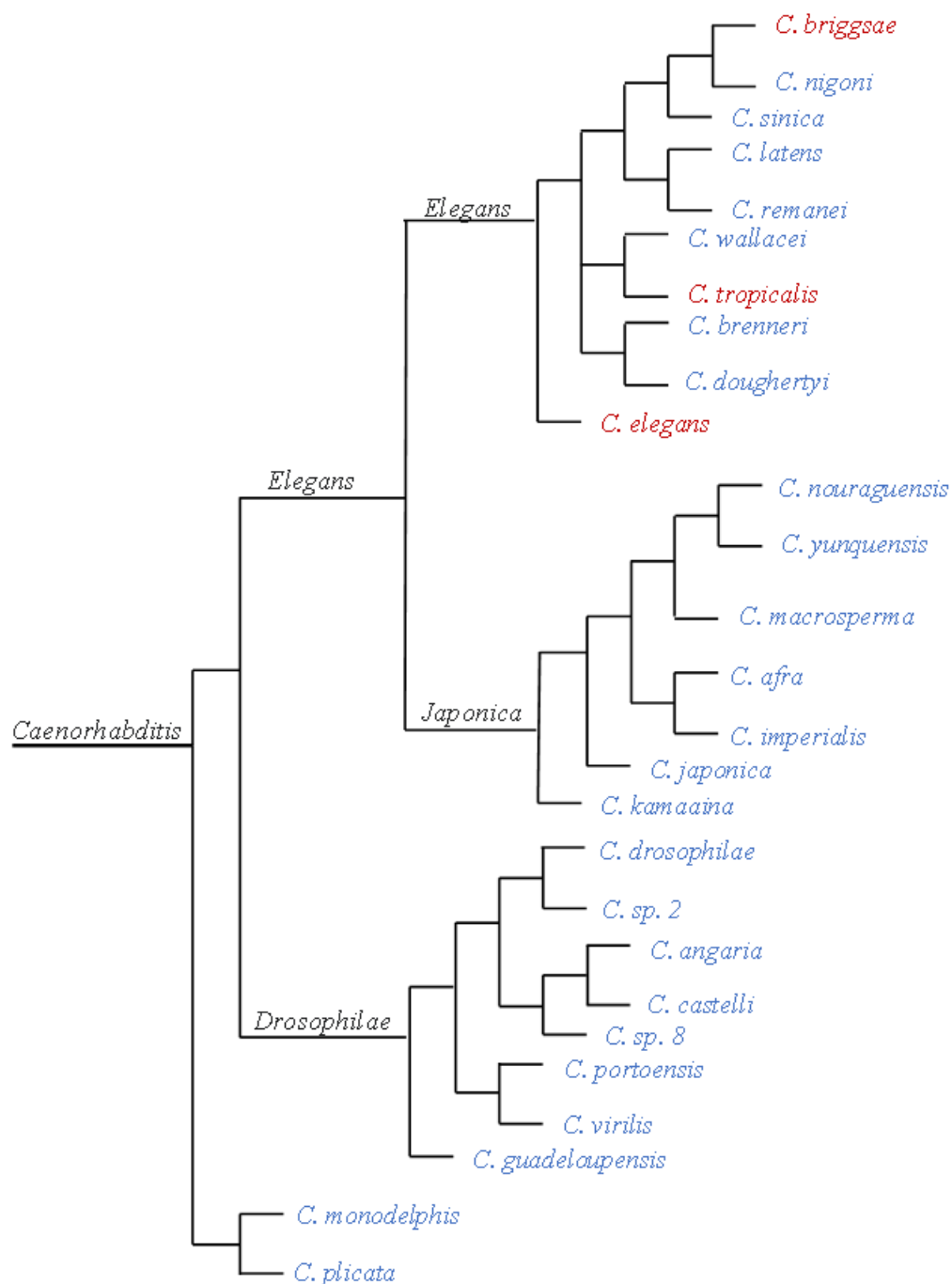
Obrázek 4: Schéma zobrazující životní cyklus *C. elegans* při 20 °C. Zdroj obrázku: Corsi et al., 2015.

2.2.3 Ekologie a taxonomie

C. elegans patří do rodu *Caenorhabditis*, čeled *Rhabditidae*, řád *Rhabditida*, třída *Secernentea*, kmen *Nematoda* a říše *Animalia*. Rod *Caenorhabditis* zahrnuje morfologicky velmi podobné, avšak ekologicky velmi odlišné druhy, které kolonizují různé substráty bohaté na živiny a bakterie. Objev nových druhů byl po mnoho let zpomalován mylnou představou o přirozeném prostředí tohoto rodu. Průzkum přirozených populací *C. elegans* a *C. briggsae* ukázal, že tato hádátka nejsou pouze půdními organismy, ale že kolonizují různé substráty bohaté na bakterie, jako je hnilý ovoce. Tento poznatek umožnil objev více jak 50 nových druhů rodu *Caenorhabditis*. Schéma zobrazující fylogenetickou topologii popsanych druhů je znázorněno na obrázku 5 (Kiontke, 2006; Stevens et al., 2019).

U mnohých druhů *Caenorhabditis* byla zjištěna asociace dauer juvenilů s různými druhy suchozemských členovců a plžů, což poukazuje na dva typy soužití, a to na phoresie či nekroménii. Při phoresii dauer larvy využívají hostitelské zvíře pouze jako přenašeč k novému zdroji potravy, kde jej okamžitě opouští a obnoví svůj vývoj. Typickými příklady jsou *C. plicata* či *C. drosophilae*. U nekroménie se dauer larvy přidruží k hostiteli, neopouští jej a po jeho smrti obnoví svůj vývoj a množí se v rozkládající se mrtvole. Zajímavým typem asociace je fakultativní nekroménie,

kterou vykazují druhy *C. elegans*, *C. japonica* a *C. remanei*. Ti za příznivých podmínek svého hostitele opouští, avšak pokud dřív hostitel zemře, vyvíjejí se a množí v jeho mrtvole. Některé druhy jsou také asociovány s obratlovci, jako je skot zebu, avšak povaha této interakce dosud nebyla objasněna (Kiontke, 2006).



Obrázek 5: Schéma zobrazující fylogenetickou topologii popsáných druhů v laboratorní kultuře. Hermafroditní druhy jsou označeny červeně a gonochoristické druhy jsou označeny modře. Převzato z Félix et al., 2014.

2.2.4 Stárnutí

Stárnutí neboli senescence je charakterizováno progresivními degenerativními změnami, které postupně snižují efektivitu a účinnost fungování organismu, čímž zvyšují pravděpodobnost úmrtnosti. Jedná se o komplexní proces, jehož základní molekulární mechanismy stále nebyly zcela objasněny. V současnosti existuje přes 300 různých teorií stárnutí, z nichž mezi nejvýznamnější patří teorie volných radikálů, která předpokládá, že stárnutí organismu vede k postupné akumulaci oxidačního poškození, což překračuje schopnost těla jej opravit. Tuto teorii v současnosti nahradily komplexnější modely, které odrážejí multifaktoriální povahu stárnutí. Patří sem charakteristické znaky stárnutí (hallmarks of aging) a pilíře stárnutí (pillars of aging), které popisují hlavní biologické procesy spojené se stárnutím, jako jsou genomová nestabilita, epigenetické změny či mitochondriální dysfunkce. Hlavní cíle výzkumu stárnutí tak zahrnují jak příčiny degenerativních změn, tak analýzu environmentálních a genetických faktorů, které tyto změny ovlivňují (Biga et al., 2025; Collins et al., 2007; Lin et al., 2025).

U *C. elegans* jsou mnohé rysy spojené se stárnutím analogické s člověkem. Při stárnutí procházejí hád'átka změnami na molekulární, buněčné i tkáňové úrovni. Zároveň se objevují změny v mitochondriích, proteinové homeostáze a genové expresi, což odpovídá procesům stárnutí u člověka. Dochází k degeneraci nervového, svalového a reprodukčního systému. V neposlední řadě je známo, že genom *C. elegans* obsahuje geny homologní k lidským genům spojených s nemocemi souvisejícími se stárnutím. Díky krátkému životnímu cyklu je ideální také pro studium délky života, například prostřednictvím konstrukce křivek přežití. V kombinaci se snadností a nízkými náklady na jeho kultivaci v laboratoři tvoří vynikající modelový organismus pro výzkum stárnutí. Na druhou stranu ve srovnání se savci postrádá krevní oběh, hematoencefalickou bariéru a další klíčové struktury, což může ovlivnit některé signální dráhy nebo epigenetické procesy. Jedná se tak o zjednodušený model pro studie základních mechanismů stárnutí a signálních drah (Zhang et al., 2020).

U *C. elegans* bylo identifikováno více než 50 genů regulujících stárnutí, přičemž většina z nich má své homology u jiných organismů. V souvislosti se stárnutím jsou zkoumány především genetické a molekulární mechanismy, které ovlivňují délku života a odolnost organismu vůči stresu. Mezi nejvýznamnější signální dráhy spolupracují na regulaci těchto procesů patří IIS, AMPK a mTOR. Nejvíce

studovanou signální drahou je „insulin/insulin-like growth factor pathway“ (ISS), kterou tvoří proteiny kódované třemi klíčovými geny: *daf-2*, *age-1* a *daf-16*. Gen *daf-2* kóduje receptorovou tyrosin kinázu, která je homologní s lidským inzulinovým receptorem. Gen *age-1* kóduje fosfatidylinositol-3-kinázu. Mutace v těchto genech vedou k aktivaci genu *daf-16*, což zvyšuje odolnost vůči stresu a zároveň prodloužení života přibližně o 15 %. Efekt těchto mutací je tedy závislý na aktivitě proteinu *daf-16*. Jedná se o protein patřící do rodiny FOXO transkripčních faktorů, které řídí expresi genů podporující dlouhověkost. Mutací genu *daf-16* dochází nejen k vyrušení efektu mutace genů *daf-2* a *age-1*, ale i ke zkrácení života *C. elegans*. Dráha je konzervovaná u hmyzu, savců a tedy i u člověka, díky čemuž se jedná o slibný terapeutický cíl na podporu dlouhověkosti (Jeayeng et al., 2024; Zhang et al., 2020).

Důležitou roli v dlouhověkosti hraje AMP-aktivovaná protein kináza (AMPK), která funguje jako hlavní energetický senzor buněk a reguluje energetickou homeostázu buněčného metabolismu. K aktivaci dochází při nízké hladině energie, primárně během hladovění či vývojové diapauze, tzv. dauer stádia. Aktivace AMPK vede ke zvýšení aktivity transkripčních faktorů jako je FOXO, čímž inhibuje dráhu IIS a prodlužuje tak délku života (Yasuda, 2025; Zhang et al., 2020).

Klíčovou dráhou spojující dostupnost živin a metabolickou regulaci dlouhověkosti je „mechanistic target of rapamycin“ (mTOR). K aktivaci této dráhy dochází v přítomnosti zvýšené hladiny aminokyselin či růstových faktorů v buňce. Aktivace stimuluje proliferaci a růst buněk, naopak inhibice mTOR prodlužuje délku života *C. elegans*. Tento efekt je konzervovaný u řady organismů, a to od kvasinek po lidi. Tato dráha také podporuje mitochondriální dýchání a aktivuje gen *PGC-1 α* , který společně s transkripčním faktorem Yin-Yang1 (YY1) řídí expresi mitochondriálních genů. I přes aktivně probíhající studie, mTOR dráha nebyla stále zcela objasněna, ale předpokládá se, že mezi ní a IIS může docházet k vzájemné interakci. Jedním ze sdílených mechanismů souvisejících s dlouhověkostí mezi drahami IIS a mTOR je autofagie, kterou obě dráhy inhibují (Zhang et al., 2020).

V procesu stárnutí zastávají významnou roli také epigenetické mechanismy, jako je metylace DNA či modifikace histonů. Společně s transkripčními regulátory ovlivňují funkce buněk a mohou sloužit jako markery stárnutí. Dietní restriktce bez toho, aniž by došlo k podvýživě, prodlužují délku života mnoha druhů organismů,

včetně *C. elegans*, a to i prostřednictvím epigenetických změn. Omezením příjmu potravy dochází také k inhibici signálních drah IIS a mTOR, což podporuje autofagii, zvyšuje antioxidační ochranu a odolnost organismu vůči stresu (Jeayeng et al., 2024; Zhang et al., 2020).

2.2.6 Skríníng léčiv

C. elegans je také využíván k modelování lidských onemocnění, zejména neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova či Parkinsonova choroba. Vzhledem ke krátké délce života (anglicky lifespan) je *C. elegans* ideálním modelovým organismem pro hodnocení účinnosti různých léčiv na základě křivek přežití. Avšak prodloužení délky života není vždy korelované s prodloužením délky zdravého života (anglicky healthspan), což je doba, při které stárnoucí jedinec stále vykazuje zdravé biologické funkce. Parametry související se zdravím jsou frekvence pumpovací aktivity hltanu, počet nakladených vajíček, integrita vývoje larev, absence morfologických změn, odolnost vůči teplu a ROS. Nově se také k hodnocení zdraví používá měření motility (Huang et al., 2022; Yasuda, 2025).

C. elegans byl jako model pro testování vlivu látek dlouho přehlížen. Hlavní překážkou byla její kultivace na agarových plotnách s *E. coli*, což nebylo kompatibilní s automatizací a vysokokapacitním skríníngem. Testovaná léčiva bylo nutné vmíchat do agaru během přípravy plotny, což vedlo k velké spotřebě látky, nejen vzhledem k objemu agaru, ale i proto, že se testovala obvykle vyšší koncentrace kvůli omezenému vstřebávání ve srovnání s kulturou tekutou. Hodnocení pomocí světelného mikroskopu bylo časově i manuálně náročné. Průlom nastal v roce 2006, kdy zavedení kapalných médií umožnilo vysokokapacitní testování látek na *C. elegans*. Moderní metody jsou tak často založeny na automatizaci přesunu červů, automatizované mikroskopii s pokročilou analýzou obrazu, dále na fluorescenčním značení či využíváním sorterů (O'Reilly et al., 2014). K vyhodnocování délky života se využívají i automatizované systémy pro hodnocení motility, jako je WMicrotracker. Tento optický systém monitoruje pohyb červů prostřednictvím rozptylu infračerveného světla. Každou jamku protínají dva infračervené mikropaprsky, které snímají více než desetkrát za sekundu. Když červ paprsek přeruší dojde k rozptylu světla a detekovaný signál je digitálně zpracován. Nepohybliví jedinci nerozptylují světlo a jsou vyhodnoceni jako mrtví (Munguía et al., 2022).

C. elegans se využívá také k vysokokapacitnímu skríníngu nových antibiotik či antimykotik. Infikace háďátka různými patogenními mikroorganismy umožňuje studium interakcí hostitel-patogen. Studie odhalily několik konzervovaných vrozených imunitních odpovědí, čímž poskytly vodítka k novým terapeutickým cílům (Anastassopoulou et al., 2011; Peterson and Pukkila-Worley, 2018). V neposlední řadě je *C. elegans* významná i pro vývoj anthelmintik, zejména v kontextu narůstající rezistence parazitických hlístic vůči běžně používaným léčivům. Jelikož testování na samotných parazitických hlísticích může být technicky velmi náročné až rizikové, případně parazity ani nejde (efektivně) laboratorně chovat, využívá se k vyhledávání anthelmintik právě evolučně blízce příbuzné háďátko obecné. Hlavní mechanismem účinku léčiv je obvykle paralýza parazita či zpomalení jeho růstu a rozmnožování. Nejčastějším cílem léčiv bývá nervová soustava, která je u háďátek a parazitických hlístic strukturálně i funkčně velmi podobná (Hernando et al., 2019; Sepúlveda-Crespo et al., 2020).

2.3 Neurodegenerativní onemocnění

Neurodegenerativní onemocnění jsou skupinou poruch charakterizovaných progresivní degenerací neuronů a jejich synaptických spojení v centrálním nervovém systému (CNS). Jejich ztrátou dochází k poruše motorických a kognitivních schopností, což způsobuje omezení při vykonávání základních úkonů. Mezi nejčastější neurodegenerativní onemocnění člověka patří Alzheimerova choroba (AD), Parkinsonova choroba (PD), amyotrofická laterální skleróza a Huntingtonova choroba (Dugger and Dickson, 2017; Lamprey et al., 2022).

Etiologie i patogeneze neurodegenerativních onemocnění zůstávají do značné míry nejasné. Jsou výsledkem kombinace genetické výbavy jedince, faktorů prostředí a především věku, který zůstává nejvýznamnějším rizikovým faktorem. Trend stárnutí populace v průmyslových zemích navíc vede k výraznému nárůstu prevalence těchto poruch, což zvyšuje poptávku po rozvoji účinných strategiích prevence, léčby a podpůrných službách (Przedborski et al., 2003). Předpokládá se, že většina neurodegenerativních onemocnění je způsobena nesprávným složením nativních proteinů a jejich následným přenosem mezi buňkami, což vede k postupnému šíření a hromadění jednoho či více patologických proteinů. Příkladem může být amyloid- β peptid ($A\beta$), tau protein, α -synuklein či transaktivní protein vázající DNA 43 (Brettschneider et al., 2015; Cullinane et al., 2024).

K výzkumu neurodegenerativních onemocnění se používají modely *in vitro* a *in vivo*. Modely *in vitro* v poslední době zahrnují i linie odvozené z iPSC (indukované pluripotentní kmenové buňky) a organoidy, umožňují detailní analýzu patologických mechanismů, což je činní vhodné pro vysoce účinný screening léků. Ale pouze experimenty *in vitro* poskytují celkový pohled na progresi onemocnění v živém organismu. Bezobratlí mohou sloužit i jako efektivní nástroj pro vysokoformátový skrining léčiv (Pereira et al., 2023; Slanzi et al., 2020; Wu et al., 2023).

2.3.1 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba je jedno z nejčastějších neurodegenerativní onemocnění, které celosvětově postihuje přes 10 milionů pacientů. Jedná se neurologickou pohybovou poruchu, pro kterou jsou typické symptomy, jako je svalová ztuhlost, bradykineze a posturální nestabilita. Nemotorické symptomy zahrnují poruchy spánku, deprese, apatie a kognitivní dysfunkce (Cooper and Van Raamsdonk, 2018).

PD je charakteristická ztrátou dopaminergních neuronů v oblasti *substantia nigra*, což snižuje dopaminovou signalizaci a způsobuje motorické symptomy. Patologickým znakem PD na buněčné úrovni je agregace proteinu α -synukleinu (α Syn) do Lewyho tělísek, které se akumulují v přežívajících neuronech. Tento protein je exprimován nejen v CNS, kde jeho akumulace vede ke vzniku kognitivních symptomů, ale také v periferních oblastech, což poukazuje na systémový charakter onemocnění. K patologii PD přispívají i zvýšené hladiny ROS, zhoršená autofagie a mitochondriální dysfunkce. PD byla tradičně považována za idiopatické onemocnění, avšak v současné době se odhaduje, že až 15 % všech případů je familiární povahy, se kterou jsou asociovány mutace v řadě genů, včetně *SNCA*, *LRRK2*, *DJ1*, *PARK2* a *PINK1* (Cooper and Van Raamsdonk, 2018; Wu et al., 2023).

První známou genetickou příčinou PD byla mutace v genu *SNCA* kódující protein α Syn. Ten hraje roli v synaptické homeostáze tím, že se podílí na uvolňování neurotransmiterů a také na přestavbě a recyklaci vezikul v presynapsi. Reguluje také dynamiku mitochondrií a stresové odpovědi buňky. Mutace v *SNCA* způsobuje časný nástup PD s brzkým poklesem kognitivních funkcí. Alfa-synuklein také interaguje s dalšími proteiny spojenými s PD. Například s kinázou fosforylující α Syn (*LRRK2*) se hromadí v Lewyho tělískách v oblasti středního mozku a s progresí onemocnění se šíří do kortikálních oblastí. S rozpustnými monomerními či oligomerními formami

α Syn interaguje protein DJ1, jehož exprese za fyziologických podmínek zabraňuje shlukování tohoto proteinu. Parkin (*PARK2*, kódovaná ubikvitin ligáza) zajišťuje ubikvitinaci α Syn, avšak při nadměrném množství α Syn je tento mechanismus narušen a vede ke smrti mozkových buněk. Dalším proteinem interagujícím s α Syn je protein kináza PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1), který zabraňuje jeho spojení s mitochondriemi a indukuje jeho degradaci (Magistrelli et al., 2021).

Jelikož *C. elegans* nemá homolog k *SNCA*, byly vytvořeny transgenní linie, které potvrdily, že nadměrná exprese α Syn vedla ve všech neuronech k agregaci proteinů v dopaminergních neuronech, což způsobilo poruchy pohybu a známky neurodegenerace podobně jako u PD. Při použití chiméry s fluorescenčním proteinem byla pozorována tvorba inkluzí v axonech, což vedlo k změnám chování hád'átek, především ke změně pohybu, přičemž projevy se zhoršovaly s věkem (Cooper and Van Raamsdonk, 2018; Wu et al., 2023).

Druhým genem kauzálně spojeným s familiární i sporadickou formou PD je gen kinázy s repeticemi bohatými na leucin (*LRRK2*, *Leucine-Rich Repeat Kinase 2*). Předpokládá se, že kóduje protein podílející se na regulaci signálních drah neuronální smrti, regulaci transkripce *SNCA* či mikrogliální aktivaci. Mutace tohoto genu vede k expresi proteinu se zvýšenou kinázovou aktivitou, což je spojováno s rozvojem patologických rysů PD, jako smrt dopaminergních neuronů, porucha neurotransmise dopaminu, chyby v syntéze a degradaci proteinů a oxidačnímu stresu (Rui et al., 2018). *C. elegans* má homolog tohoto genu *lrk-1*, který hraje důležitou roli v synaptickém transportu. Exprese jeho mutované formy ve všech, i specificky pouze v dopaminových neuronech, indukovala snížení hladiny dopaminu, vedla k poruchám v chování závislého na dopaminu a způsobila postupnou ztrátu dopaminových neuronů (Cooper and Van Raamsdonk, 2018; Wu et al., 2023).

Jedním z autozomálně recesivních PD genů je *PARK2* kódující protein parkin, který je součástí ubikvitinového proteazomového systému. Jeho role spočívá v označení dysfunkčních a nadbytečných proteinů pro degradaci, kdy příkladem může být aktivace fosfatázy A2, která defosforyluje α Syn. Mutace tohoto genu vede k akumulaci poškozených proteinů, dysfunkci mitochondrií a autofagii, což podporuje rozvoj PD (Magistrelli et al., 2021; Nuytemans et al., 2010).

Mutace v genu *PINK1* (*PTEN-induced putative kinase 1*) způsobuje autozomálně recesivní formu familiární PD s časným nástupem. Jedná se o mitochondriální kinázu, která se s proteinem parkin podílí na mitofagii. Jeho mutace byla zkoumaná v homologu *pink-1* u *C.elegans*, kde vedla ke zvýšené citlivosti vůči různým stresovým podmínkám, zpomalení bazálního metabolismu a narušení tak pohybu v reakci na stres. Mitochondrie se u hád'átek s touto mutací s věkem hromadí, mají pozměněný tvar a objevují se deficity při oxidativní fosforylaci (Cooper and Van Raamsdonk, 2018; Wu et al., 2023)

2.3.2 Amyotrofická laterální skleróza

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je progresivní letální degenerativní onemocnění motorických neuronů, které je charakterizované svalovou rigiditou, postupným ochabováním končetin a bulbárních svalů, což způsobuje problémy řeči, polykání i dýchání. Dále se objevují kognitivní symptomy zahrnující problémy s verbální pamětí či s exekutivními funkcemi. Příčina ALS není plně objasněna. Většina případů ALS se objevuje sporadicky, jen asi 5-10 % případů má familiární charakter a dědí se autozomálně dominantním způsobem. Mezi geny spojené s familiární ALS patří superoxiddismutáza 1 (*SOD1*), TAR DNA-vazebný protein (*TARDBP*), FUS (fused in sarcoma) a otevřený čtecí rámec 72 na chromozomu 9 (*C9ORF72*). Společným rysem mutací v těchto genech je vznik toxických proteinových agregátů vedoucích k progresivní degeneraci neuronů (Chen et al., 2024; Chong et al., 2024; Wu et al., 2023).

Mutace v genu *SOD1* byla první identifikovanou jako příčinou familiární ALS. Kóduje protein Cu, Zn–superoxiddismutázu, která katalyzuje rozklad toxických superoxidových aniontů, a má tedy antioxidační funkci. Mutace v tomto genu jsou zodpovědné až za 20 % familiárních případů ALS. Mutace *SOD1* vedou ke změnám skládání a nadměrné produkci tohoto proteinu, což má za následek agregaci v motorických neuronech a jejich následnou smrt. Vliv zvýšené exprese *SOD1* v motorických neuronech byl studován na transgenní *C. elegans*. U této linie byla, zejména po vystavení oxidačnímu stresu způsobeného paraquatem, pozorována rekapitulace charakteristických příznaků ALS, jako je tvorba nerozpustných shluků *SOD1*, poškození axonů a motorické poruchy. Skrining RNAi u *C. elegans* pomohl identifikovat 63 genů zmírňujících produkci agregátů *SOD1*, což potvrzuje důležitou

roli proteostatické sítě zahrnující chaperonový systém, autofagii či ubiquitin-proteozomový systém (Wu et al., 2023; Zhou and Xu, 2023).

Mutace v genu *TARDBP* jsou zodpovědné za asi 3 % familiární ALS. Tento gen kóduje protein TDP-43, který reguluje různé aspekty metabolismu RNA, jako transkripci, alternativní sestřih a stabilitu. Účastní se také regulace apoptózy, buněčného dělení a synaptického přenosu. Jedním z typických rysů některých forem ALS je nesprávná lokalizace TDP-43, který po translokaci z jádra agreguje v cytosolu a vykazuje neurotoxické účinky. U pacientů s ALS jsou v motorických neuronech běžně přítomné hyperfosforylované a zkrácené agregáty tohoto proteinu, což přispívá k rozvoji tzv. TDP-43 proteinopatie. Tento mechanismus byl studován na transgenních liniích *C. elegans*, kdy jedinci vykazovali neurotoxicitu analogickou k lidské ALS. Toxicita tohoto proteinu u *C. elegans* souvisí s jeho fosforylací na serinových zbytcích. Ta může být korigována kalcineurinem, který však zhoršuje motorické funkce hád'átek. Skríníng na transgenech vedl k objevu protektivní aktivity α -methyl- α -fenylsukcinimidu, který zlepšil pohyb a zvýšil délku života (Chen et al., 2024; Wu et al., 2023).

Gen *FUS* kóduje RNA/DNA vazebné proteiny a jeho mutace způsobují přibližně 4 % případů familiární ALS. Protein FUS hraje významnou roli v regulaci transkripce a zpracování mRNA v neuronech. Podobně jako u modelu TDP-43 vedou na molekulární úrovni tyto mutace k poruchám transkripce, alternativního sestřihu či narušují stabilitu mRNA. Tyto mutace zároveň vedou k tvorbě toxických cytoplazmatických inkluzních tělísek nebo proteinových agregátů, což celkově vede k poškození motoriky (Chen et al., 2024; Zhou and Xu, 2023).

Mutace v genu *C9ORF72* je další genetickou příčinou ALS. Tento gen se podílí na vnitrobuněčném transportu, zejména na autofagii a lysozomální dráze. Mutace tohoto genu vedou k expanzi hexanukleotidové repetice (GGGGCC) v nekódující oblasti genu, kdy u pacientů s ALS se může nacházet až tisíce kopií. Přesný mechanismus toxického účinku však zatím není zcela objasněn, ale předpokládá se, že souvisí se ztrátou funkce genu nebo získání funkce toxické, zejména v souvislosti s translací repetice do škodlivých proteinů (Chen et al., 2024; Chong et al., 2024).

2.3.3 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je progresivní degenerativní onemocnění mozku. Je to hlavní příčinu demence a zároveň se i čtvrtá nejčastější příčina všech úmrtí. Toto onemocnění způsobuje duševní i fyzický úpadek vedoucí ke smrti, kdy typickým rysem je akumulace A β a tau proteinů vedoucím k tvorbě plaků a neurofibrilárních klubek, což poškozuje mj. hipokampus a narušuje přeměnu krátkodobé paměti na dlouhodobou. V ranných stádiích tak dochází k selektivní ztrátě paměti, s postoupením nemoci se objevují potíže s exekutivními funkcemi, jako plánování a řešení problémů, což významně narušuje každodenní fungování (Lamprey et al., 2022; Rostagno, 2022).

AD lze klasifikovat na formu s pozdním nástupem, která tvoří až 95 % případů, a na familiární, která je charakteristická časným výskytem klinických příznaků. U této formy byla prokázána spojitost s dominantními genetickými mutacemi v genech kódující amyloidní prekurzorový protein (*APP*), presenilin 1 (*PSEN1*) a presenilin 2 (*PSEN2*) (Rostagno, 2022; Sheppard and Coleman, 2020). Nejrizikovější faktorem rozvoje AD je pokročilý věk, kdy riziko vzniku onemocnění je ve věku 85 letech více než 30 % (Sheppard and Coleman, 2020). Organizací Alzheimer's Disease International byla v roce 2019 odhadnuta celosvětová prevalence Alzheimerovy choroby či demence zhruba na 55,2 milionu lidí. Zároveň se předpokládá, že do roku 2050 se incidence tohoto onemocnění více jak ztrojnásobí (Scheltens et al., 2021; Zhang et al., 2024a).

Nejnovější výzkumy podporují existenci genetických rizikových faktorů, jako je gen *APP*, *MAPT* (*mikrotubule-associated protein tau*), či alela $\epsilon 4$ v genu *APOE* (*Apolipoprotein E*), kterou má až 16 % populace. Tyto genetické faktory úzce souvisí s hlavními hypotézami o vzniku AD, jako jsou cholinergní hypotéza, amyloidní hypotéza, hypotéza o roli hyperfosforylace cytoskeletárních proteinů (převážně tau proteinu), metabolická hypotéza (AD jako diabetes mozku) a hypotézy zdůrazňující roli zánětlivých procesů, oxidativního stresu či vlivu genetických variant *APOE* (Korábečný et al., 2020; Wu et al., 2023).

2.3.3.1 Cholinergní hypotéza.

Nejstarší teorií patogeneze AD, ze které do nedávna vycházela většina léčby, je cholinergní hypotéza. Dle ní je hlavním faktorem vedoucím k rozvoji kognitivních poruch u AD odumírání cholinergních neuronů a pokles neurotransmiteru acetylcholinu (ACh), který je klíčový pro paměť a učení. Tento pokles ale může být

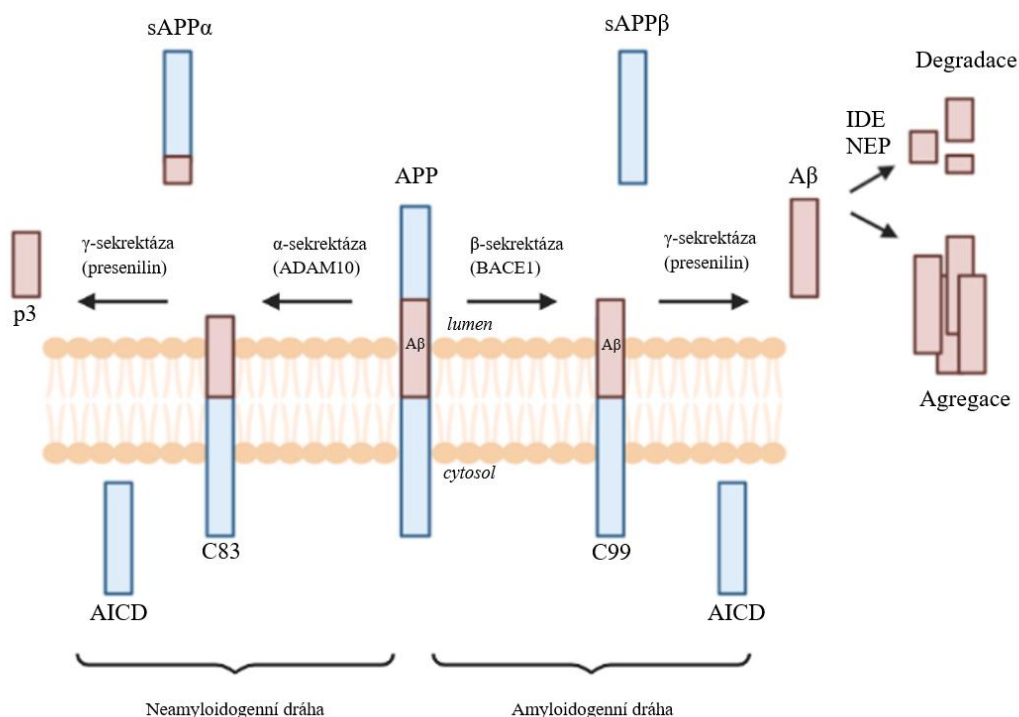
zapříčiněn poruchou syntézy ACh, jejího uvolnění ze zásobních vezikul, rozkladem a recyklace či postižením signalizace přes cholinergní receptory. Ovlivněn tedy může být i rozklad ACh pomocí acetylcholinesterázy (AChE). V současné době se k léčbě AD využívají inhibitory AChE, čímž brání rozkladu ACh a zpomalují tak kognitivní pokles (Abualassal et al., 2025; Silva et al., 2025). Aktuálně jsou schváleny tři inhibitory AChE, a to donepezil, rivastigmin a galantamin (Lamprey et al., 2022).

2.3.3.2 Amyloidní hypotéza

Jednou z hlavních patofyziologických příčin AD se považuje abnormální štěpení amyloidového prekurzorového proteinu. Jedná se integrální transmembránový protein s extracelulární doménou primárně exprimovaný v mozku, zejména na synapsích, který se podílí na podpoře synaptické plasticity, neuroprotektce a vývoji neuronů, včetně procesů, jako je adheze buněk, migrace a růst neuritů (Müller and Zheng, 2012). APP je za fyziologických podmínek štěpen tzv. neamyloidní dráhou na neškodné fragmenty, kdežto při chorobných stavech se štěpí tzv. amyloidní dráhou za vzniku A β -peptidů (Salminen et al., 2013; Tiwari et al., 2019).

Při degradaci neamyloidní dráhou podléhá APP regulovanému štěpení. To začíná enzymem α -sekretázou (ADAM10), která štěpí APP uvnitř A β domény, čímž zabráňuje v tvorbě A β . Tento proces vede k uvolnění rozpustné části proteinu (sAPP- α) a vzniku membránového fragmentu C83, který je následně štěpen působením γ -sekretázy. Tento proces má za následek vznik a uvolnění intracelulární C-terminální domény (AICD) do cytosolu a hydrofobního fragment p3 do lumenu. Naopak v rámci amyloidní dráhy je APP nejprve štěpen β -sekretázou (BACE1), což zapříčiňuje vznik sAPP- β a membránového fragmentu C99. Ten je následně působením γ -sekretázy štěpen na AICD a nerozpustné a neurotoxické peptidy (nejčastěji o délce 40-42 aminokyselin) označované jako A β _{1-40/42}, které vstupují do mezibuněčného prostoru. A β je za fyziologických podmínek rozkládán inzulin-degradující enzymem (IDE) nebo neprilysinem (NEP). Avšak u AD se A β abnormálně hromadí a polymerizuje do oligomerů pronikajících do synaptických štěrbin, kde narušují přenos nervových signálů mezi neurony a přispívají k synaptické dysfunkci. Oligomery se dále shlukují do amyloidních fibril, které se agregují do nerozpustných amyloidních plaků, jež se ukládají v mozku (viz. Obrázek 6) (Salminen et al., 2013; Tiwari et al., 2019). Nedávné

studie poukazují na možnost, že A β může být produkován také při štěpení α -sekretázou (Korábečný et al., 2020).



Obrázek 6: Srovnání štěpení APP pomocí neamyloidní (vlevo) a amyloidní dráhy (vpravo), včetně degradace a agregace β -amyloidu. Vytvořeno v Biorender a Microsoft Office Word. Převzato z Salminen et al., 2013.

Dalšími geny ovlivňující štěpení APP jsou geny pro presenilin (*PSEN1* a *PSEN2*), které jsou součástí γ -sekretázového komplexu. Tento komplex se skládá z proteinů Psen1 a 2, anterior pharynx-defective (Aph-1) a nikastrinu. Funkcí proteinu Aph-1 je stabilizace komplexu, nikastrin slouží jako receptor pro APP a další substráty, a proteiny Psen1 a 2 působí jako hlavní katalytická složka γ -sekretázového komplexu. Mutace *PSEN1* a *PSEN2* vedou k podpoře toxických forem amyloidu, zejména A β_{42} (Tiwari et al., 2019).

Významnou roli v patogenezi AD hraje také gen *APOE*, který existuje ve třech izoformách, a to $\epsilon 2$ s neuroprotektivní funkcí, nejběžnější $\epsilon 3$ (nejběžnější) a $\epsilon 4$ (rizikovou). Isoforma $\epsilon 4$ vede k urychlení neurodegenerace tím, že omezuje efektivní odstraňování A β , aktivuje gliové buňky, čímž podporuje neurozánět, zvyšuje oxidační stres a podporuje hyperfosforylaci tau proteinů a vznik intracelulárních neurofibrilárních klubek (NFT). Varianta *APOE* $\epsilon 4$ představuje hlavní genetický rizikový faktor pro AD, přičemž její nositelé mají přibližně 2-3 $\times$ vyšší riziko rozvoje AD (Liu et al., 2013).

Vliv A β je zkoumán také na *C. elegans*. Expres lidského A β ₁₋₄₂ ve svalech vedla ke vzniku zkráceného A β ₃₋₄₂, přičemž i tak se u hád'átek hromadily toxické agregáty A β a docházelo k progresivní paralýze. Expresi plného A β ₁₋₄₂ umožnilo přidání dvou aminokyselin (Asp-Ala) na N-konec, což vedlo ke vzniku těžké paralýzy, zvýšení hladiny ROS a zkrácení délky života. Při expresi A β ₁₋₄₂ v neuronech byla pozorována agregace A β , poruchy chování a zkrácení života. Zároveň bylo zjištěno, že během stárnutí se A β extracelulárně šíří mezi tkáněmi (Wu et al., 2023).

2.3.3.3 Patologie tau proteinu

Dalšími pozorovanými útvary v mozkové tkáni u pacientů s AD jsou NFT, které jsou tvořeny tau proteinem. Ten se za fyziologických podmínek váže na mikrotubuly a pomáhá stabilizovat jejich síť v neuronech, především v axonu. Avšak při nadměrné fosforylaci se tau proteiny disociují od mikrotubulů a spojují do shluků, což vede k destabilizaci mikrotubulů a jejich rozpadu. Volné hyperfosforylované tau proteiny následně agregují do párových helikálních filament (PHF), které se dále shlukují do nerozpustných fibrilárních útvarů (NFT). Fosforylace tau proteinu je regulována primárně kinázami GSK3-beta a CDK5, které jsou aktivované extracelulárním A β . Při nadměrném množství A β tedy dochází k hyperfosforylaci tau proteinu a vzniku NFT. Výsledkem je narušení transportu živin, organel a signálních molekul uvnitř neuronů, což vede k jejich degeneraci. Oba typy agregátů, jak A β plaky, tak NFT klubka, narušují komunikaci mezi neurony, čímž dochází k poruchám v přenosu signálu a k poškození neuronů (Korábečný et al., 2020; Tiwari et al., 2019).

U *C. elegans* je přítomen homolog lidského tau proteinu, *ttl-1*, který se podílí na udržování nervového zdraví během stárnutí. Jelikož ztrátu jeho funkce nelze plně nahradit lidským tau proteinem, zavádí se do modelu *C. elegans* přímo exprese lidského tau. Jeho nadměrná exprese spolu s mutacemi v nervovém systému potvrzuje v tomto modelovém organismu akumulaci tau proteinu a vznik defektů v senzorických a motorických funkcích. Po výrazné ztrátě neuronů se u těchto jedinců objevovaly také zlomy nervového provazce, což poukazovalo na probíhající neurodegeneraci (Wu et al., 2023).

2.3.1.4 Hypotéza neurozánětu.

Dalším typickým patologickým mechanismem AD je neurozáněť, což je chronická zánětlivá reakce v CNS. Udržuje toxické prostředí v mozku, čímž přispívá k akumulaci A β a tvorbě NFT klubek. Tento záněť se projevuje aktivací dvou hlavních

gliových buněk mozku, a to mikroglíí a astrocytů, které uvolňují prozánětlivé faktory, volné radikály či složky komplementu. Aktivované mikroglie v počáteční fázi AD působí ochranně, jelikož migrují k senilním plakům, pohlcují A β a uvolňují enzymy pro jeho rozklad. Avšak jejich dlouhodobá aktivace vede ke ztrátě schopnosti efektivně odstraňovat A β a dále dochází ke generování prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , IL-6, TNF α), což udržuje zánětlivý stav a zvyšuje oxidační stres produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS). Tento proces narušuje synaptickou funkci, čímž prohlubuje zánět a zvyšuje neurotoxicitu (Guo et al., 2020; Zhang et al., 2024b). Uvolněné prozánětlivé cytokiny spolu s akumulovanými A β spouštějí astrogliózu. Zpočátku aktivované astrocyty působí také ochranně, a to podporou degradace A β . Při dlouhodobé aktivaci však zhoršují zánět produkcí prozánětlivých cytokinů a aktivních forem dusíku a kyslíku, čímž negativně ovlivňují tvorbu nových spojení mezi neurony (Al-Ghraiyyah et al., 2022; Guo et al., 2020; Zhang et al., 2024b).

2.3.1.5 Hypotéza oxidačního stresu a mitochondriální dysfunkce

Jedním z patogenetických procesů ovlivňující vznik a rozvoj AD je také oxidační stres, který úzce souvisí s mitochondriální dysfunkcí. Ta postihuje jak buňky CNS, tak i buňky nenervového systému. Jedním z časných projevů této dysfunkce je narušení všech pěti komplexů dýchacího řetězce (ETC) v různých oblastech mozku, což vede k poklesu hladin ATP a nadměrné produkci ROS. Zvýšené množství ROS podporuje další agregaci A β a hyperfosorylaci tau proteinu (Bell et al., 2021; Misrani et al., 2021). A β se přímo váže na mitochondriální povrchový protein a interaguje s cytochrom c oxidázou, čímž narušuje jejich funkci a zvyšuje produkci ROS (Hernandez-Zimbron et al., 2012; Lee et al., 2021). Výsledkem je zvýšený oxidační stres, který způsobuje peroxidaci lipidů, oxidaci proteinů a poškození nukleových kyselin. Tento proces je snadno detekovatelný pomocí biomarkerů, jako je malondialdehyd (MDA) či 3-nitrotysin. Další důsledky zahrnují oxidační poškození ATP syntázy, což dále snižuje energetickou bilanci buněk. V pokročilých stádiích AD dochází k nitraci podjednotek ATP syntázy, což poškozuje funkce ETC. V mozku pacientů s AD dochází také k nadměrné fragmentaci mitochondrií, což je důsledek nerovnováhy mezi proteiny regulujícími procesy fúze a fragmentace mitochondrií. Fragmentované mitochondrie tak ztrácejí schopnost produkovat energii a přispívají k apoptóze (Bell et al., 2021; Misrani et al., 2021). Podle hypotézy mitochondriální kaskády se předpokládá, že mitochondriální dysfunkce může předcházet a řídit již

zmíněné patologické rysy, jako je akumulace $A\beta$ a hyperfosforylace tau proteinu (Ashleigh et al., 2023).

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Biologický materiál

- *Cearnohabditis elegans* – divoký typ (N2)
- *Escherichia coli* – kmen OP50

3.2 Testované látky

- Organoselenové deriváty 1-15
- WT R2R3 tau
- Ebselen (2-Fenyl-1,2-benzoselenazol-3(2H)-on)

3.3 Přístrojové a laboratorní vybavení

- Autokláv Microjet (Enbio)
- Automatický mikroskop CV7000S (Yokogawa)
- Automatický mikroskop Operetta High-Content Imaging System (PerkinElmer)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Centrifuga BR4I (Jouan)
- Centrifuga ROTINA 420R (Hettich)
- Inkubátor 140 inox (Q-Cell)
- Inkubátor (Vevor)
- Mikrocentrifuga Smart 15 (Hanil)
- Minicentrifuga Combi-Spin FVL-2400N (BioSan)
- Flowbox Herasafe KS 18 (Thermo Fisher Scientific)
- Mikroskop Researcher ICD (Bresser)
- Mikroskop IX70 (Olympus)
- Třepačka HS 260 basic (IKA)
- Třepačka Vortex V-1 plus (BioSan)
- Vertikální rotátor PTR-35 (Grant-bio)
- WMicrotracker One¹ (PhylumTech)

3.3.1 Spotřební materiál

- Mikrozkmavka 0,6 ml
- Mikrozkmavka 1,5 ml
- Mikrozkmavka 2 ml
- Petriho misky 100×15 mm

- Petriho misky 60×15 mm
- 15ml zkumavky (Falcon)
- 50ml zkumavky (Falcon)
- 24jamkové desky (TPP)
- 96jamkové desky (TPP)
- 384jamkové desky (TPP)

3.4 Chemikálie

Níže uvedené chemikálie pocházejí od následujících dodavatelů: anorganické soli (firma Lach-ner), ostatní chemikálie (firma Sigma-Aldrich/Merck), pokud není uvedeno jinak.

- Agar
- CaCl_2
- Ebselen – firma Focus Biomolecules
- FUdR (5 - Fluorodeoxyuridin)
- Glycerol
- Juglon (5 – hydroxy - 1, 4 - naftochinon)
- K_2HPO_4
- KH_2PO_4
- KPO_4
- Kvasniční extrakt
- MgSO_4
- NaCl
- NaOH
- Paraquat (N, N' - dimethyl - 4,4' - bipyridinium dichlorid)
- Pepton
- Savo – firma Unilever
- Trypton

3.4.1 Pracovní postup přípravy chemikálií

3.4.1.1 Růstové médium pro *C. elegans* (NGM)

Na analytických váhách bylo naváženo 1,5 g NaCl, 8,5 g agaru a 1,25 g peptonu. Tyto chemikálie byly promíchány a vloženy do 500ml lahve, která byla následně doplněna 487,5 ml destilované vody a poté autoklávovaná. Takto vzniklé médium bylo ve vodní

lázni ochlazeno na 56 °C. Poté bylo přesunuto do laminárního flowboxu, přičemž bylo sterilní metodou obohaceno o 0,5 ml 1M CaCl₂, 0,5 ml 5 mg/ml cholesterolu v ethanolu, 0,5 ml 1M MgSO₄ a 12,5 ml 1M KPO₄ pufru o pH 6,0. Do každé Petriho misky bylo nalito 10-12 ml takto připraveného NGM.

3.4.1.2 S kompletní médium (S-complete medium)

Na analytických váhách bylo naváženo 2,925 g NaCl, 0,5 g K₂HPO₄ a 3,0 g KH₂PO₄. Tyto chemikálie byly vloženy do 500ml kultivační lahve, která byla následně doplněna destilovanou vodou do 500 ml a autoklávována. Následně bylo sterilní metodou v laminárním flowboxu přidáno 0,5 ml 5mg/ml cholesterolu v ethanolu, čímž vzniklo S-základní médium. Do takto připraveného média bylo přidáno 5 ml citrátu draselného (pH 6), 5 ml roztoku stopových prvků, 1,5 ml 1M CaCl₂ a 1,5 ml 1M MgSO₄.

3.4.1.3 Roztok M9

Na analytických váhách bylo naváženo 1,5 g KH₂PO₄, 3 g Na₂HPO₄, 2,5 g NaCl, což bylo následně vloženo do 500ml kultivační lahve. Ta byla doplněna destilovanou vodou do 500 ml a autoklávovaná po dobu 12,5 minut. Toto médium bylo poté sterilně obohaceno o 0,5 ml 1M MgSO₄.

3.4.1.4 Lyzační roztok.

Do 15 ml zkumavky typu Falcon bylo napipetováno 2,5 ml Sava, 3 ml 3M NaOH a 4,5 ml destilované H₂O.

3.4.1.5 Tryptonem pufrované médium (TB)

Na analytických váhách bylo naváženo 3 g tryptonu, 6 g kvasničního extraktu, 3,135 g K₂HPO₄ a 0,578 g KH₂PO₄. Tyto chemikálie byly promíchány a vloženy do kultivační lahve s 200 ml destilované vody. Po rozpuštění bylo médium obohaceno 1 ml glycerolu, objem byl doplněn do 250 ml a médium bylo sterilizováno v autoklávu.

3.4.1.6 Příprava E. coli kmene OP50 v TB roztoku

Za sterilních podmínek bylo do 50ml zkumavky se šroubovacím uzávěrem odebráno 50 ml TB média. To bylo inokulováno 1 ml E. coli kmene OP50 z původního TB média. Takto připravené médium bylo kultivované na třepačce (200 RPM) při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin a následně umístěno do chladničky o teplotě 4 °C.

3.4.1.7 Příprava OP50 v S-complete médiu

V laminárním floboxu bylo 200 ml TB média v kultivační lahvi obohaceno o 2 ml OP50 o koncentraci 50mg/ml. Takto připravené médium bylo kultivováno na třepačce (200 RPM) při 37 °C po dobu 24 hodin. Po kultivaci byl obsah rozlit do čtyřech 50ml zkumavek se šroubovacím uzávěrem a centrifugovány při 5000 RCF po dobu 10 minut. Následně byl odebrán supernatant a pelet byl resuspendován v 10 ml S-complete médiu. Takto připravené roztoky byly opět centrifugovány při 5000 RCF po dobu 10 minut a tento proces se 3x opakoval. Po posledním odebrání supernatantu byly zkumavky s peletem zváženy na analytických vahách. Zjištěná hmotnost byla odečtená od předem zvážených hmotností 50ml zkumavek a byla tak vypočítaná hmotnost samotného peletu. Dle zjištěné hmotnosti OP50 došlo k doplnění S-complete média tak, aby celková koncentrace byla 50mg/ml.

3.5 Metody kultivace *C. elegans*

V této diplomové práci bylo pro získání validních výsledků bylo nutné zajistit synchronizovanou populaci *C. elegans*. Příprava této populace zahrnovala několik postupů, které jsou rozepsány níže.

3.5.1 Příprava NGM misek s kulturou *E. coli*

Na již připravené Petriho misky s NGM bylo nejprve zapotřebí aplikovat 0,1 ml tekuté kultury *E. coli* OP50 v TB médiu, a to sterilní metodou v laminárním flowboxu. Tento objem byl po médiu rozprostřen za pomoci sterilní skleněné bakteriální hokejky, a následně byly takto připravené Petriho misky kultivovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C.

3.5.2 Přenos *C. elegans* pěstovaných na NGM miskách

C. elegans bylo nutné pravidelně přenášet do nového prostředí. Pro přenos ze staré kultury do nové byla využita metoda „chunking“, kdy za použití sterilizovaného skalpelu byl agar nařezán na malé čtverečky o velikosti 5 mm. Na nový NGM misky s již kultivovanou *E. coli* kmene OP50 byly nanесeny 4 čtverečky a následně byly inkubovány ve 20 °C po dobu 72 hodin.

3.5.3 Synchronizace vývoje

C. elegans byly nejprve pomocí sterilních metod ze 3 Petriho misek přeneseny do plastové sterilní 15ml zkumavky se šroubovacím uzávěrem typu Falcon, a to spláchnutím destilovanou vodou. Následně byly centrifugovány při 280 RCF po dobu

2 minut. Po odstranění supernatantu byl objem doplněn destilovanou vodou na 15 ml a centrifugace byla opakována. Po odstranění supernatantu bylo k *C. elegans* přidáno 5 ml čerstvě připraveného lyzačního roztoku. Takto připravený roztok byl přibližně po dobu 3-4 minut pravidelně protřepáván a vortexován, čímž došlo k rozrušení dospělců a uvolnění vajíček, která jsou díky svému chitinovému obalu odolnější. Tento krok byl pomocí světelného mikroskopu vizuálně monitorován za účelem určení správného momentu pro neutralizaci reakce, ke kterému došlo okamžitě po rozrušení dospělců. Neutralizace byla provedena přidáním 10 ml roztoku M9 a následnou centrifugací při 1100 RCF po dobu 2 minut. Po odstranění supernatantu bylo přidáno 15 ml roztoku M9 a centrifugace byla opakována. Tento proces se 3x opakoval. Následně byl roztok M9 nahrazen 15 ml roztoku S-complete a zkumavka byla naposledy centrifugována. Po opětovném odstranění supernatantu byl pelet resuspendován a objem doplněn na 10 ml roztokem S-complete. Zkumavka byla poté umístěna na vertikální rotátor, kde byla ponechána po dobu 24 hodin, což umožňovalo vylíhnutí *C. elegans*.

3.5.4 Stanovení počtu vajíček *C. elegans* po synchronizačním procesu

Po přípravě vzorku byl počet vajíček zjištěn pomocí 384jamkové destičky. V první fázi bylo do prvních devíti jam (uspořádaných do tří horizontálních a tří vertikálních sloupců) napipetováno 25 μ l destilované vody. Následně bylo do prvních tří vertikálních jam napipetováno stejné množství *C. elegans* v roztoku S-complete. Tento vzorek byl poté rovnoměrně rozpipetován do zbývajících jam destičky za vzniku ředící řady, což za pomoci mikroskopu umožňovalo snadné zjištění počtu vajíček ve vzorku.

3.5.5 Přenesení L1 na NGM misky

Po vylíhnutí *C. elegans* byla koncentrace L1 stádia háďátek opět stanovena pomocí výše popsané metody. Následně došlo k centrifugaci při 280 RCF, přebytečný supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován ve vhodném objemu. *C. elegans* byly poté transferovány na NGM misky s již kultivovanou *E. coli*, a to v množství 2 000 až 3 000 háďátek na misku. Takto připravené misky byly zabaleny do hliníkové fólie a inkubovány při 17 °C po dobu 72 hodin.

3.5.6 Přenos *C. elegans* do tekutého média

Po 72hodinové inkubaci byli dospělci pomocí destilované vody přeneseni do 15ml zkumavky. Následně byla stanovena koncentrace dospělců pomocí výše popsané metody. Takto přenesená háďátka byla promyta destilovanou vodou, a to centrifugací

při 280 RCF, přebytečný supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován ve vhodném objemu roztoku S-complete.

3.6 Optimalizace přípravy vzorků s protektivními látkami

Látky byly přidávány k dospělcům v S-complete médiu dokrmených *E.coli* OP50 (1 mg/ml) a ošetřených FUDR (500 μ M).

3.6.1 Aplikace s inkubací v mikrozku mavkách na rotátoru bez promytí

Při první metodě byli dokrmení a ošetření dospělci vloženi do šesti 1,5ml mikrozku mavek tak, aby se v každé nacházelo 1000 jedinců v objemu 1 ml. Následovala mikrocentrifugace, po které došlo k odebrání 750 μ l supernatantu. Pelet byl resuspendován ve zbytku supernatantu, do kterého bylo následně přidáno 25 μ l testované látky tak, aby finální koncentrace v celkovém objemu 275 μ l činila 100 či 30 μ M. Takto připravené vzorky byly inkubovány na vertikálním rotátoru po dobu 3 h. Nakonec byl objem mikrozku mavek doplněn na 1 ml připraveným roztokem S-complete s obsahem FUDR a OP50, čímž byla zamezena reprodukce hád'átek a zároveň došlo k jejich dokrmení.

3.6.2 Aplikace s inkubací v mikrozku mavkách na rotátoru s promytím

Druhá metoda se lišila tím, že po 3. hodinové inkubaci byly vzorky přeneseny do laminárního flowboxu a za sterilních podmínek byl jejich objem doplněn na 1 ml a opět došlo k centrifugaci při 280 RCF po dobu 2 minut, po které následovalo odstranění supernatantu. Tento krok byl 3x zopakován, což umožnilo odstranění potenciálních protektivních látek v médiu a ponechalo pouze ovlivněné *C. elegans*. Nakonec byl objem mikrozku mavek doplněn na 1 ml připraveným roztokem S-complete s obsahem FUDR a OP50, čímž byla zamezena reprodukce hád'átek a zároveň došlo k jejich dokrmení.

3.6.3 Aplikace s inkubací ve 24jamkové destičce na třepačce s promytím

U této metody byly dokrmení a ošetření dospělci vloženi do šesti jamek 24jamkové destičky, každá obsahující 1000 jedinců v objemu 270 μ l. Následně došlo k přidání 30 μ l testované látky tak, aby finální koncentrace v celkovém objemu 300 μ l činila 100 či 30 μ M. Takto připravené roztoky s *C. elegans* byly umístěny na třepačku a inkubovány po dobu 3/24 hodin. Po inkubaci došlo za sterilních podmínek k přenesení *C. elegans* do 1,5ml mikrozku mavek a následovalo promytí a doplnění objemu do 1 ml stejným způsobem, jako u první metody.

3.7 Optimalizace parametrů měření pomocí WMicrotrackeru

Před samotným měřením bylo nezbytné provést optimalizaci podmínek, za kterých WMicrotracker One¹ poskytuje validní a reprodukovatelné výsledky, tedy motilitu *C. elegans*. Počáteční hodnoty testovaných parametrů vycházely z práce Nguyễn (2024). Testované parametry jsou popsány níže.

3.7.1 Počet háďátek na jamku

Nezbytným parametrem pro úspěšnost měření je právě počet háďátek na jamku. Příliš malý nebo naopak příliš vysoký počet háďátek může vést k falešným hodnotám. Za sterilních podmínek byli jedinci ošetřeni FUdR (1200 μ M) a dokrmeni *E. coli* OP50 (0,5 mg/ml) umístěny do 96jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem tak, aby se v každé jamce nacházel požadovaný testovaný počet jedinců (50, 80) v objemu 100 μ l.

3.7.2 Koncentrace floxuridinu

Floxuridin (FUdR), syntetický analog pyrimidinu, byl k jedincům ve stádiu L4 či k dospělcům přidán do růstového média S-complete za účelem zamezení reprodukce a zastavení dalšího larválního vývoje. K dosažení tohoto efektu byly do testovány různé koncentrace FUdR, kdy háďátka byla dokrmena OP50 (0,5 mg/ml). Testování probíhalo v 96jamkové mikrotitrační destičce s plochým dnem o objemu 100 μ l.

3.7.3 Vliv dokrmování

Pro ověření vlivu přítomnosti potravy na motilitu *C. elegans* byla provedena optimalizace, kdy se zkoumal rozdíl motility háďátek při dokrmení. Za sterilních podmínek bylo k testované skupině *C. elegans* přidáno 10 μ l OP50 (5 mg/ml), a to po 24 a 48 hodinách měření.

3.7.4 Koncentrace *E. coli* OP50

Pro získání validních výsledků bylo nezbytné zajistit také dostatečný přísun potravy, který udržuje *C. elegans* aktivní. K tomuto účelu byla využita *E. coli* kmene OP50, která byla za sterilních podmínek přidána do S-complete růstového média spolu s FUdR (500 μ M). Testování probíhalo v 96jamkové mikrotitrační destičce s plochým dnem o objemu 100 μ l s požadovanými koncentracemi OP50.

3.7.5 Objem pro měření

Objem nacházející se v jamce je dalším nezbytným parametrem pro úspěšnost měření pomocí WMicrotrackeru. Do 96jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem byli

vložení dospělci *C. elegans* ošetření FUdR (500 μ M) a OP50 (0,5mg/ml) o požadovaném objemu.

3.7.6 Optimalizace koncentrace látek navozující toxicitu

Měřením motility *C. elegans* byly testovány také optimální koncentrace látek indukujících toxicitu, přesněji juglonu a paraquatu. Do 96jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem byli sterilní metodou vloženi dospělci *C. elegans* ošetření FUdR (500 μ M) a OP50 (0,5mg/ml) o objemu 80 μ l, ke kterému bylo přidáno 20 μ l toxických látek v požadovaných koncentracích.

3.8 Metody měření

3.8.1 Měření motility pomocí WMicrotrackeru

Za sterilních podmínek byli ošetření dospělci umístěni do 96jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem. Pro zajištění signifikantního měření bylo do každé jamky vždy přidáno optimálně 80 jedinců tak, aby celkový objem činil 0,1 ml. Pro měření motility *C. elegans* byl využíván WMicrotracker, který zaznamenával aktivitu jedinců v 2hodinových intervalech po dobu 48 hodin.

3.8.1.1 Testování protektivních účinků

Dále byly testovány protektivní účinky látek. Dospělci *C. elegans*, ošetření podle postupu v kapitole 3.6.3, byli za sterilních podmínek vloženi do 96jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem o objemu 80 μ l. Následně byl přidán objem 20 μ l toxických látek o požadované koncentraci. Testování, zda zvolené látky mají protektivní účinky *C. elegans*, probíhalo měřením jejich motility pomocí WMicrotrackeru, který zaznamenával aktivitu jedinců v 30minutových intervalech po dobu 48 hodin.

3.8.1.2 Testování tepelného stresu

Dospělci ošetření FUdR a OP50 byli naneseni do Petriho misky o velikosti 60x15 mm tak, aby jejich počet byl optimálně 1000 jedinců ve 3 ml. Následně byli vloženi do inkubační komory o požadované teplotě po dobu 24 hodin, po které byla jejich motilita zkontrolována vizuálně pomocí světelného mikroskopu při zvětšení 40x.

Po optimalizačních procesech byl tepelný stres měřen pomocí WMicrotrackeru. Ošetření dospělci byli po 3/24hodinové inkubaci za sterilních podmínek umístěni do 96jamkové mikrotitrační destičky tak, jak je popsáno v kapitole

3.8.1 WMicrotraker byl umístěn do inkubační komory, ve které byla testována motilita *C. elegans* za požadovaných teplot.

3.8.2 Hodnocení motility automatickým mikroskopem

3.8.2.1 Testování protektivních účinků

Dospělci ošetření dle kapitoly 3.6.3 byli umístěni do 384jamkové mikrotitrační desky s plochým dnem tak, aby v každé jamce bylo 10 jedinců v objemu 80 μ l. K tomuto objemu byly přidány toxické látky o požadované koncentrace o objemu 20 μ l. Motilita *C. elegans* byla měřena pomocí automatického mikroskopu Yokogawa, který monitoroval aktivitu v časech 19 a 72 hodin po přidání juglonu.

3.8.2.2 Testování tepelného stresu

Dospělci ošetření FUDR a OP50 byli naneseni do 384jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem tak, aby se v jedné jamce nacházelo 10 jedinců v objemu 100 μ l. Pomocí automatického mikroskopu Operetta byla testována teplota 37 °C, a to po dobu 24 hodin.

3.9 Zpracování dat

Agregace událostí registrovaného pohybu do časových intervalů byla provedena pomocí softwaru dodaného k přístroji WMicrotracker, který automaticky zajistil výpočet průměrného počtu aktivit na interval, standardní chyby a dalších metrik.

Obrázky pořízené automatickým mikroskopem byly pro lepší vizualizaci oříznuty a jejich jas byl upraven pomocí online nástroje Photopea.

4 VÝSLEDKY

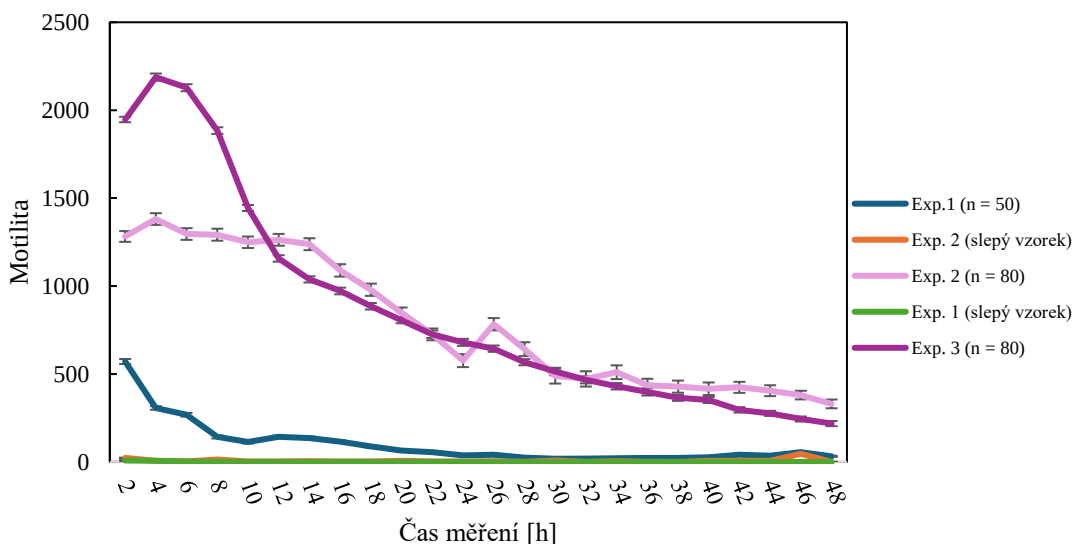
Cílem této diplomové práce bylo vyhodnocení efektu vybraných stresorů na *C. elegans* a testování účinků protektivních látek vůči vhodně voleným stresovým podmínkám. Konkrétně vůči toxicitě indukované fragmentem proteinu tau, oxidačnímu stresu indukovaným juglonem či paraquatem, a vůči tepelnému stresu. Protektivní účinky zkoumaných látek byly testovány metodou měření motility pomocí zařízení Wmicrotracker fungujícího na principu infračervených paprsků, a automatického mikroskopu.

4.1 Optimalizace experimentů měřících motilitu zařízením Wmicrotracker

Pro hodnocení účinků látek pomocí zařízení WMicrotracker bylo nejprve nutné optimalizovat experimentální parametry, které jsou podrobně rozebrány níže.

4.1.1 Ověření optimálního počtu *C. elegans*

Počet *C. elegans* na jamku je významný parametr nebytný pro získání spolehlivých a reprodukovatelných výsledků. Nízké počty povedou k nízké intenzitě signálu, kdy jedinci vzácně překříží paprsek, a vysoké k nelinearitě, kdy pohyb jedince uvede do pohybu jejich shluk. Experimenty byly zvoleny, že vhodný počet hád'átek na jamku pro měření motility pomocí WMicrotrackeru je 80, kdy byl signál jasně detekovatelný po 48 hodin. (Graf 1).

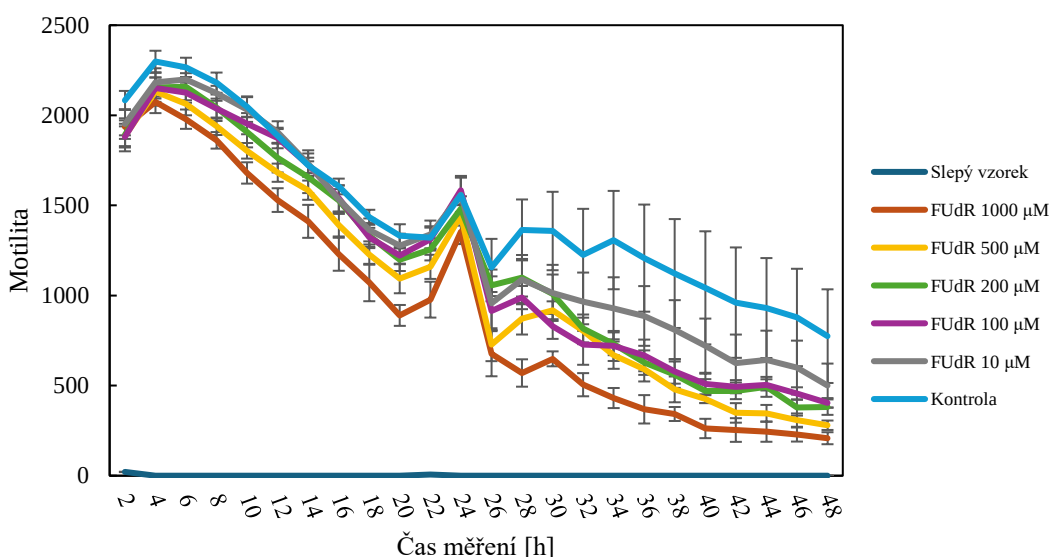


Graf 1: Počet hád'átek. Hád'átka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=0-80$ jedinců na jamku) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval $1200\mu\text{M}$ FUDR a krmění *E.coli* OP50 ($0,5\text{mg/ml}$) v den 0. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Graf zahrnuje data ze tří nezávislých experimentů, které byly sloučeny.

4.1.2 Optimalizace koncentrace floxuridinu

Pro zajištění synchronní populace háďátek bylo zapotřebí zamezit jejich reprodukci a dalšímu vývoji, k čemuž byl použit FUdR. Stanovení jeho vhodné koncentrace se odvíjelo od schopnosti zastavit tento vývoj a zároveň nenarušit fenotyp jedince a neusmrtit jej.

Tento experiment byl proveden v duplikátu, jehož hodnoty byly následně sloučeny. Na grafu 2 u koncentrace FUdR 1000 μM bylo možné pozorovat sníženou motilitu háďátek oproti kontrole i nižším testovaným koncentracím již od 4. hodiny. Druhou nejnižší motilitu vykazovala háďátka o koncentraci 500 μM , u kterých došlo k protnutí s koncentracemi 200 a 100 μM v krátkém časovém okně od 29. do 36. hodiny. Hodnoty motility jedinců u koncentrací 200 a 100 μM se během měření od 16. hodiny navzájem překrývaly a do 22. hodiny se výrazně nelišily od neošetřené kontroly. Motilita háďátek u koncentrace 10 μM se prakticky nelišila od kontroly a její pokles byl sledován až ve 26. hodině měření. Vysoká variabilita neumožňuje jasně říct, zda pozorujeme toxický efekt. Na grafu 2 v čase 24 hodin je výrazný krátkodobý nárůst motility, který byl pravděpodobně zapříčiněn mechanickým narušením měření vlivem pohybu v okolí zařízení WMicrotrackeru.

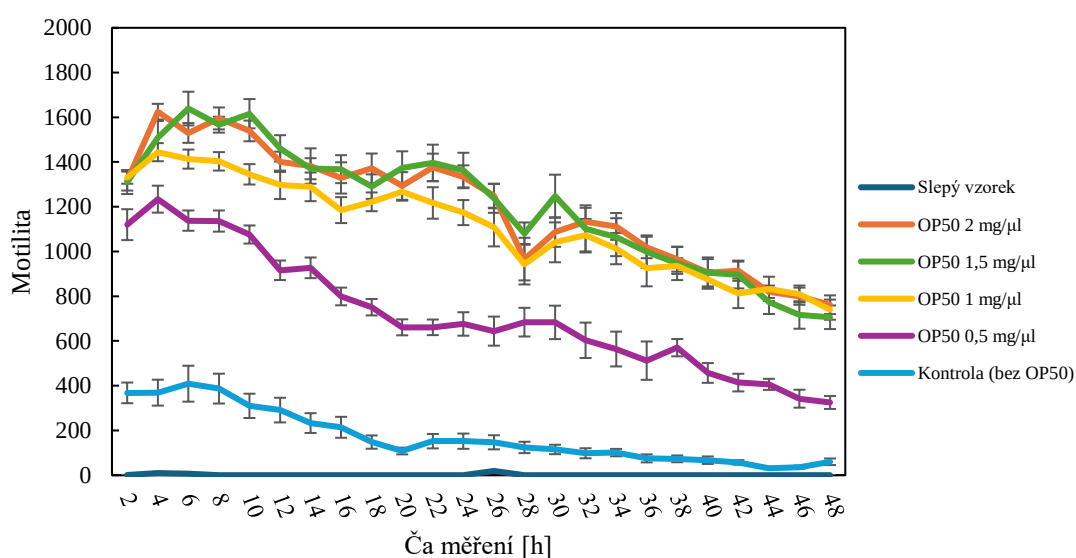


Graf 2: Vliv různých koncentrací FUdR na *C. elegans*. Háďátka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 0-1000 μM FUdR a krmení *E.coli* OP50 (0,5mg/ml) v den 0. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Experiment byl proveden v duplikátu, jejichž hodnoty byly sloučeny.

Nejvhodnější koncentrace FUDR pro testování protektivních látek na *C. elegans* byla vybrána tak, aby indukovala plynulý pokles motility v průběhu 48 hodin. Ten umožňuje ideální sledování dynamiky změny a srovnání mezi vzorky. Z těchto výsledků byla pro testování vybrána koncentrace FUDR 500 μ M. Ačkoliv tato koncentrace přesahuje běžně používané hodnoty, v rámci výše uvedených experimentů poskytovala konzistentní výsledky a lépe odpovídala požadovanému průběhu experimentu.

4.1.3 Optimalizace koncentrace *E. coli* OP50

Vhodná koncentrace potravy má klíčový vliv na zdraví a motilitu *C. elegans*. Graf 3 zobrazuje velmi nízkou aktivitu hád'átek bez dodání OP50, označenou jako kontrola, kdy snížená motilita je typickou reakcí na hladovění. Dále lze pozorovat motilitu při koncentraci OP50 0,5 mg/ml, která je výrazně vyšší. Nejvyšší motilita je pozorovatelná u koncentrací 1,5 a 2 mg/ml, které se sobě rovnaly. Avšak od 28 hodiny měření se motilita hád'átek těchto koncentrací nelišila ani od koncentrace 1 mg/ml, která byla předchozí hodiny měření nižší.



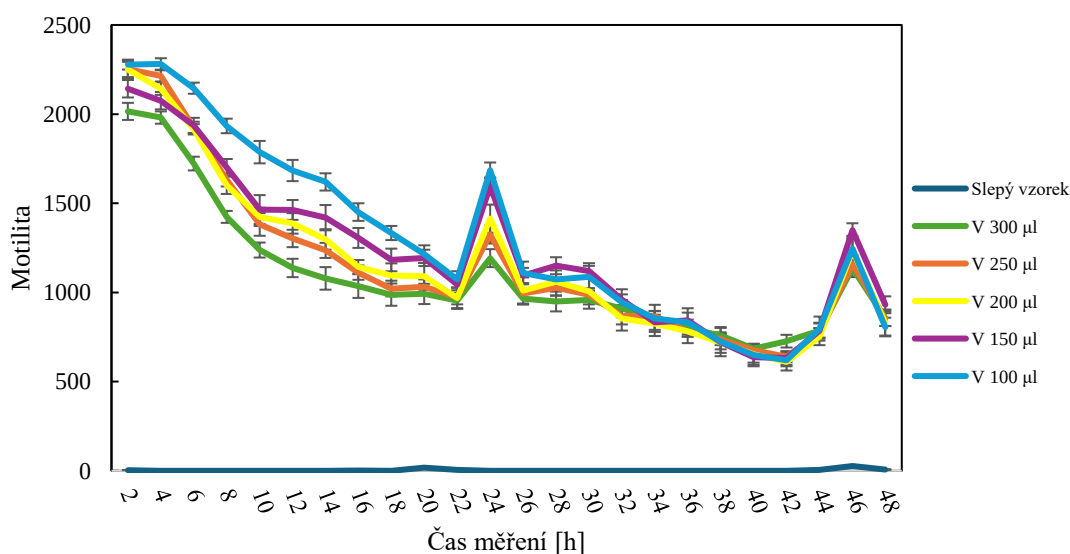
Graf 3: Vliv koncentrace *E. coli* OP50 na motilitu *C. elegans*. Hád'átka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μ M FUDR a krmení *E. coli* OP50 (0–2 mg/ml) v den 0. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE).

Dle potřeby zajištění optimálních podmínek pro testování protektivních látek byla z výše uvedených koncentrací OP50 použita 1mg/ml, jelikož z výsledků jasně vyplynulo, že vyšší koncentrace výrazně nevedly k odlišné motilitě háďátek.

4.1.4 Optimalizace objemu pro měření

Dalším sledovaným parametrem byl objem, jehož nízké hodnoty by mohly vést k narušení složení média kvůli relativně většímu odparu či naopak větší objem by mohl zapříčinit hypoxii háďátek a sníženou motilitu.

Tento experiment byl proveden v duplikátu, jehož hodnoty byly následně sloučeny. Na grafu 4 je zřetelné, že nejvyšší motilitu vykazovali jedinci nacházející se v objemu 100 μ l, a to do 22. hodiny měření, kdy došlo k srovnání hodnot motility s jedinci v objemu 150 μ l. Následně po 34. hodině se motilita v různých objemech nelišila. Z grafu lze jasně vyčíst, že větší objem vede k nižší motilitě testovaných jedinců. Ve 24. a 46. hodině je možné pozorovat krátkodobý nárůst motility u všech testovaných objemů, což bylo pravděpodobně zapříčiněno mechanickým narušením měření vlivem pohybu v okolí WMicrotrackeru.



Graf 4: Vliv objemu média na motilitu *C. elegans*. Háďátka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μ M FUDR, objem (V) 100-300 μ l a krmení *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Experiment byl proveden v duplikátu, jejichž hodnoty byly sloučeny.

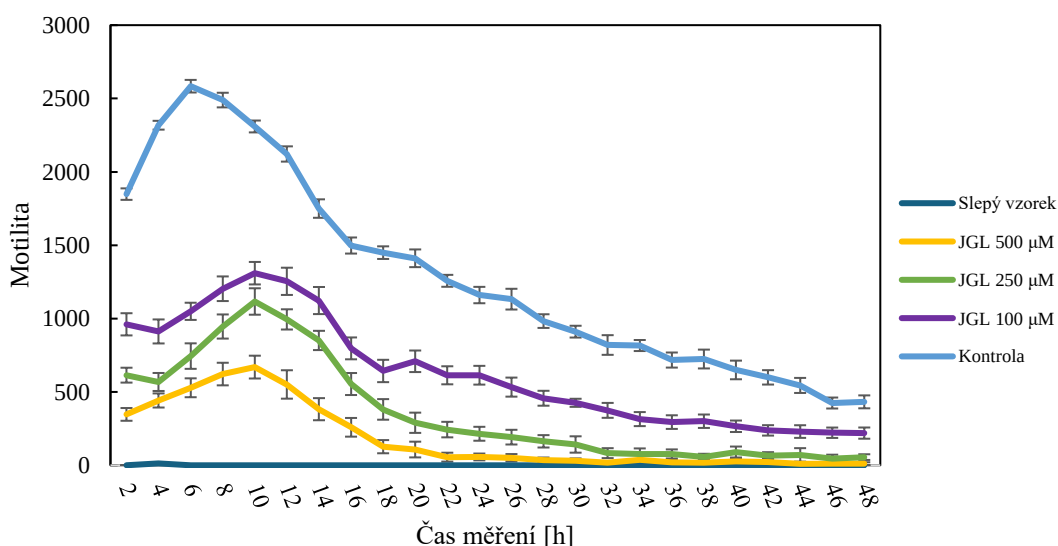
Z testovaných objemů byl jako nejvhodnější zvolen objem 100 μ l, který nejlépe zachovával motilitu *C. elegans* a zajišťoval tak optimální podmínky pro testování protektivních látek.

4.1.5 Optimalizace koncentrace látek indukujících toxicitu

Pro testování účinků protektivních látek bylo nejprve zapotřebí vyvolat u *C. elegans* oxidativní stres, který byl indukován pomocí juglonu či paraquatu. Pro zajištění optimální sestupné trajektorie křivky byly testovány různé koncentrace těchto látek.

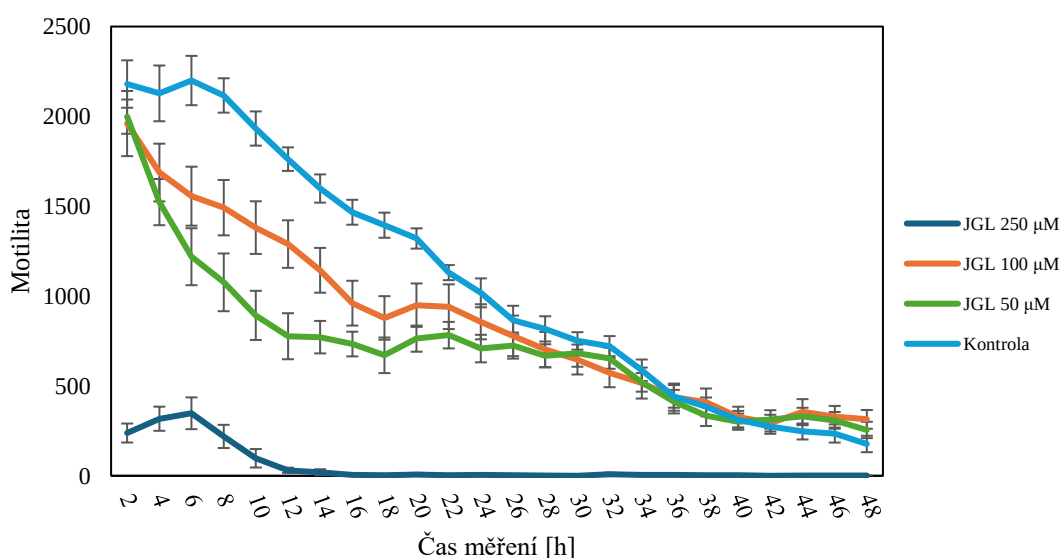
4.1.5.1 Juglon

Jako první byly testovány účinky juglonu na *C. elegans*, a to v různých koncentracích jako duplikáty, jehož hodnoty byly následně sloučeny. V experimentu byla pozorována jasná dávková závislost. Při podání juglonu o koncentraci 500 μ M, dosahovala motilita oproti kontrole velmi nízkých hodnot, přičemž již ve 28. hodině byla prakticky nulová. O poznání vyšší motility dosahovala hád'átka při koncentraci 250 μ M, avšak kolem 34. hodiny experimentu se již hodnoty prakticky rovnaly hodnotám motility u 500 μ M. Nejvyšší motility (mimo kontrolu) bylo dosaženo u koncentrace 100 μ M, kde bylo možné pozorovat postupný pokles motility v čase, aniž by však došlo k jejímu úplnému útlumu (Graf 5).



Graf 5: Vliv různé koncentrace juglonu na motilitu *C. elegans*. Hád'átka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μ M FUDR, krmení *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0 a 0-500 μ M juglonu v objemu 100 μ l. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Experiment byl proveden v duplikátu, jejichž hodnoty byly sloučeny.

Další juglonový optimalizační experiment byl zopakován v podobném uspořádání – tentokrát chyběla koncentrace 500 μM a přibyla koncentrace 50 μM . Opět byl tento experiment proveden v duplikátu, jehož hodnoty byly následně sloučeny. Dále byla opět pozorována dávková závislost, ale variabilita měření byla vyšší. Při koncentraci juglonu 250 μM tentokrát došlo k útlumu motility již ve 12. hodině testování, z čehož vyplynulo, že pro další testování je tato koncentrace nevhodná. Koncentrace 100 μM opět vykazovala s výjimkou kontroly nejlepší výsledky motility. Nově byla také testována koncentrace 50 μM , která vykazovala daleko nižší motilitu než u vyšší testované koncentrace (100 μM). Ke srovnání motility s koncentrací 100 μM došlo až ve 28. hodině a následně i s kontrolou ve 36. hodině (Graf 6).



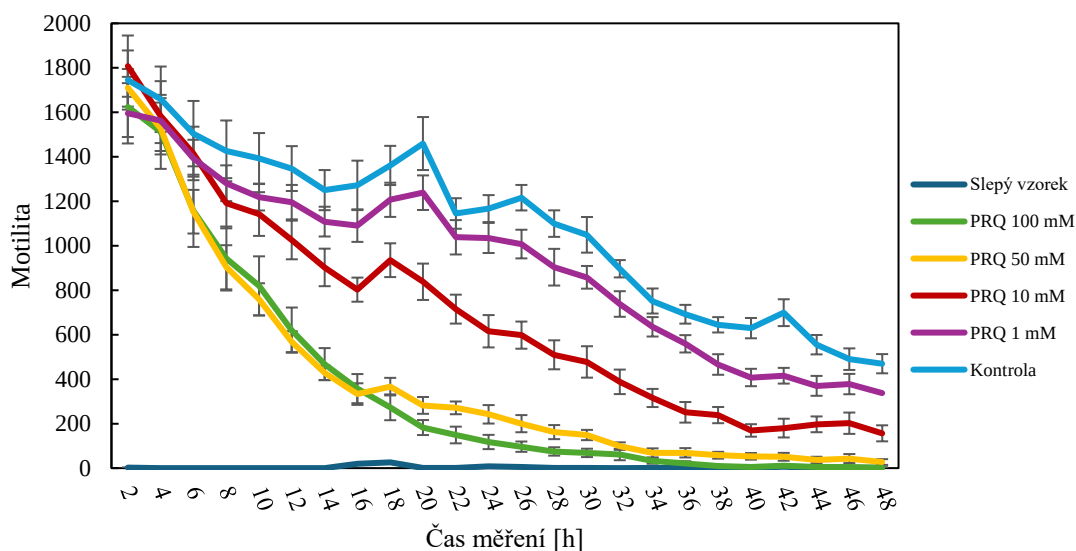
Graf 6: Vliv různé koncentrace juglonu na motilitu *C. elegans*. Hádátka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μM FUDR, krmení *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0 a 0-250 μM juglonu v objemu 100 μl . Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Experiment byl proveden v duplikátu, jejichž hodnoty byly sloučeny.

Z testovaných koncentrací juglonu vyplývá jako nejvhodnější koncentrace 100 μM , která účinně snižovala motilitu v čase měření tak, že tvořila plynulou sestupnou trajektorii křivky, což zajišťovalo optimální podmínky pro testování protektivních látek. Srovnání experimentů ale upozornilo na možnou variabilní odpověď na stresor danou různým zdravotním stavem připravených populací. Tato

variabilita stěžuje výběr vhodné koncentrace stresorů – hrozí, že odolná populace nebude umírat a oslabená naopak zemře rychle. Variabilita v odpovědi byla pak pozorována i u testování látek, a proto se s v průběhu diplomové práce s koncentrací pohybovalo (40-175 μ M).

4.1.5.2 Paraquat

Další látkou indukující oxidativní stres u *C. elegans* byl paraquat. V tomto experimentu byly testovány jeho různé koncentrace, a to v duplikátu, jejichž hodnoty byly následně sjednoceny. Opět byla pozorována dávková závislost, která je jasně patrná po 24 hodinách. Nejvyšší testovaná koncentrace 1 mM dosahovala od 8. hodiny nejvyšší motility oproti ostatním testovaným koncentracím. Dále byla testovaná koncentrace 10 mM, jejíž křivka vykazovala postupný pokles motility, která byla dle očekávání nižší než u nejnižší koncentrace. Koncentrace 50 a 100 mM byly nejvyšší testované koncentrace, jejich motilita byla do 16. hodiny měření srovnatelná. Následně koncentrace 50 mM dosahovala vyšší motility až do konce měření. Naopak u koncentrace 100 mM se motilita od tohoto času snižovala rychleji, kdy od 36. hodině byla prakticky nulová (Graf 7).

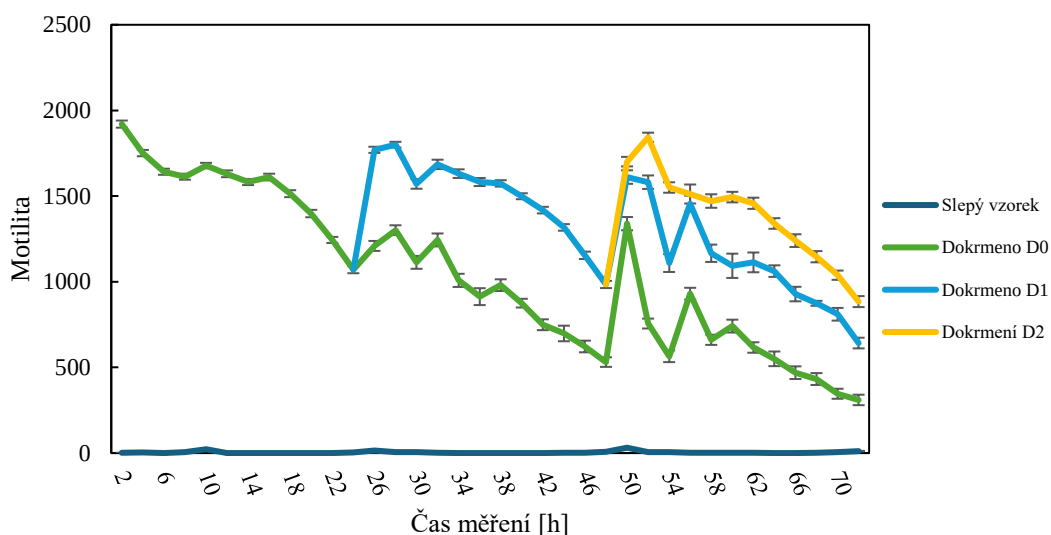


Graf 7: Vliv různé koncentrace paraquatu na motilitu *C. elegans*. Hádátka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu (n=80) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μ M FUDR, krmení *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0 a 0-100 mM paraquatu v objemu 100 μ l. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Experiment byl proveden v duplikátu, jejichž hodnoty byly sloučeny.

Pro zajištění optimálních podmínek pro testování protektivních látek byla z testovaných koncentrací paraquatu zvolena koncentrace 50 mM, která konstantně snižovala motilitu v čase měření a tvořila tak plynulou sestupnou křivku.

4.1.6 Vliv dokrmení

Graf 8 ukazuje vliv dokrmení na motilitu *C. elegans*. Výrazné rozdíly jsou znát už ve 24 hodině, kdy došlo k značnému nárůstu motility u dokrmených jedinců, který si zachovali po celý zbytek měření. Stejný trend se opakoval i u jedinců dokrmených po 48 hodinách. V 50. hodině lze pozorovat krátkodobé zvýšení motility všech testovaných skupin, což bylo pravděpodobně zapříčiněno mechanickým narušením měření vlivem pohybu v okolí WMicrotrackeru.



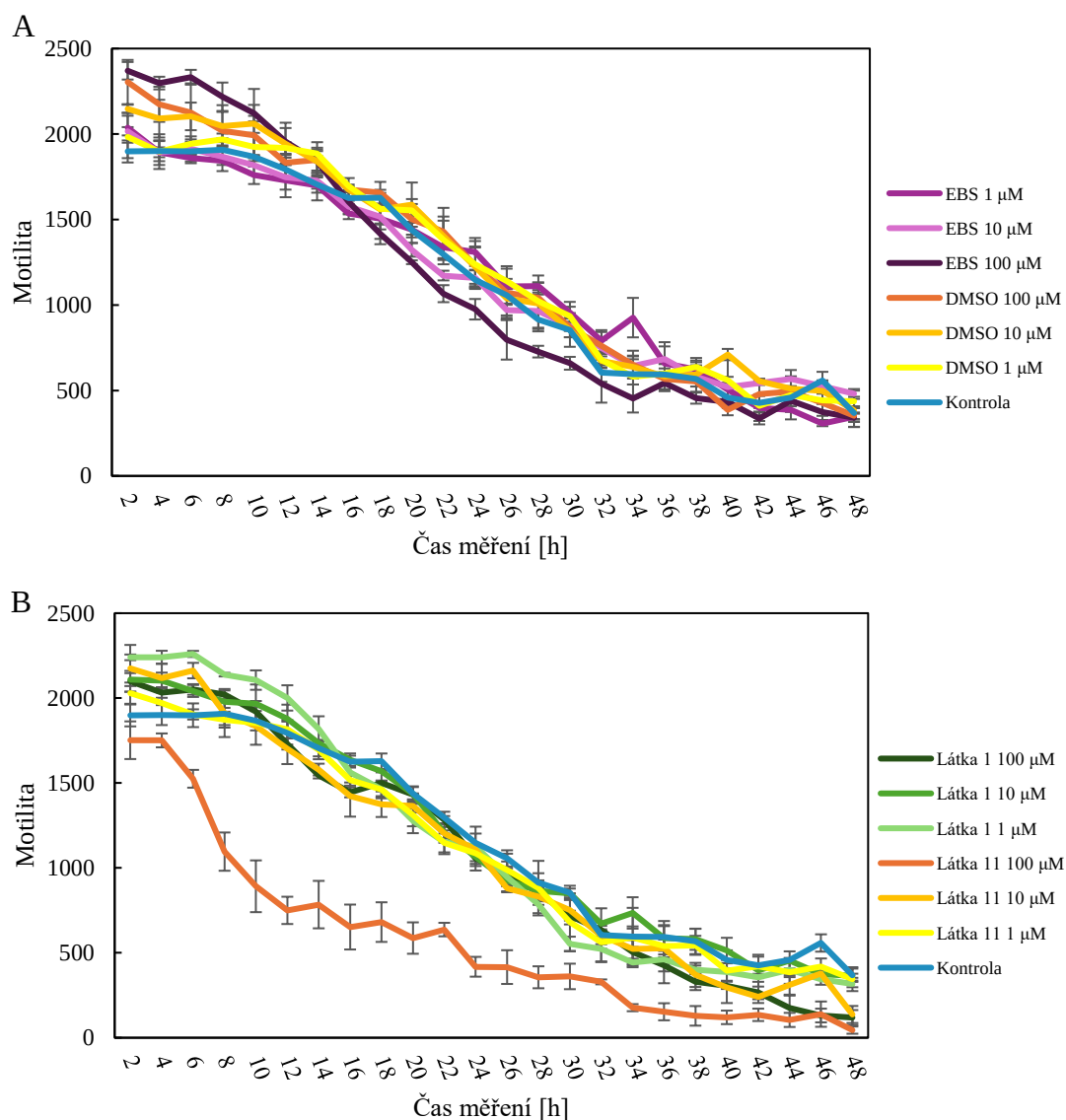
Graf 8: Vliv dokrmení *C. elegans* na motilitu. Hádátka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu (n=80) po dobu 72 h. Experiment zahrnoval 500 μ M FUdR a krmení *E.coli* OP50 (0,5mg/ml) v den 0, 1 a 2. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE).

4.1.7 Testování toxicity

Jelikož byl dimethylsulfoxid (DMSO) používán jako rozpouštědlo pro juglon, bylo potřeba zjistit jeho vliv na *C. elegans*. Zároveň byl testován potenciální toxický vliv ebselenu (EBS) a látky 1 a 11. Pro lepší přehlednost byly výsledky rozděleny do dvou grafů – A, B.

Z grafu 9A lze jasně vyčíst, že nižší motilitou oproti kontrole měli jedinci ošetření EBS o koncentraci 100 μ M, a to již od 16. hodiny do konce měření. Toxické účinky na motilitu *C. elegans* nebyly zaznamenány u žádné z koncentrací DMSO.

Graf 9B zobrazuje možnou toxicitu látky 1 a 11 na *C. elegans*, která byla potvrzena u látky 11 v nejvyšší testované koncentraci (100 μM). O mírné toxicitě by se dalo uvažovat i u koncentrace 10 μM , kdy v 10. hodině bylo možné pozorovat mírné snížení motility, a to až do konce měření. Látka 1 v koncentraci 10 μM kopírovala motilitu kontroly, stejně tak koncentrace 100 μM , u které došlo k finálnímu snížení motility až v 32. hodině. Celkově tato mírná snížení motility mohla být způsobená také biologickou variabilitou.

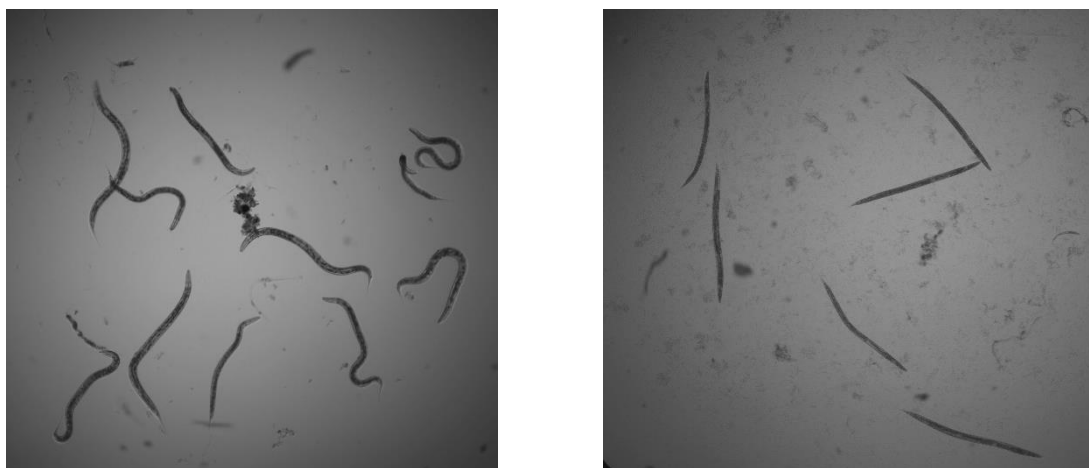


Graf 9: Vliv různé koncentrace EBS, DMSO (A), látky 1 a 11 (B) na motilitu *C. elegans*. Grafy 9A a 9B zobrazují jednotlivé výsledky odděleně pro lepší přehlednost, přičemž kontrola byla ve všech případech shodná. Hádátka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μM FUDR, v objemu 100 μl a krmení *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0. Dále zahrnoval EBS 0-100 μM , DMSO 0-100 μM , látku 1 0-100 μM a látku 11 0-100 μM . Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE).

4.2 Testování účinků látek na automatickém mikroskopu

Pomocí automatického mikroskopu byly testovány toxické účinky vybraných látek na *C. elegans* a protektivní účinky vybraných látek vůči oxidativnímu stresu. Hád'átka byla otrávena FUDR ($c = 500 \mu\text{M}$), krmena *E.coli* OP50 ($c = 1 \text{ mg/ml}$) a preinkubována s vybranými látkami po dobu 3 hodin. Látky nebyly po inkubaci odstraňovány. Testování bylo provedeno v triplikátech o koncentracích 100, 30, 1 a $0 \mu\text{M}$.

Po 19 hodinách od přidání juglonu ($c = 150 \mu\text{M}$) bylo u všech otrávených kontrol pozorováno natažení těla, bez pohybu, tedy jejich usmrčení (Obrázek 7B). V tomto časovém bodu byl pozorován efekt ochrany pouze v nejvyšších koncentracích některých testovaných látek – $100 \mu\text{M}$. Dvě látky: látka 1 a látka 14 dobře chránily před účinkem juglonu. Fenotyp a motilita takto ošetřených hád'átek byla srovnatelná s kontrolou (Obrázek 7A), s výjimkou jedné jamky látky 1, kde byla pozorována snížená motilita. Dále byla u látek 2 a 13 pozorovaná částečná ochrana před účinkem juglonu, ovšem hád'átka měla pozměněný fenotyp či sníženou motilitu oproti kontrole. Dalšími látkami, u kterých by se dalo uvažovat o efektu, jsou látky 3, 6 a 7, u nichž několik jedinců přežívalo s pozměněným fenotypem a sníženou motilitou. Posledním testovanou látkou byl EBS, u nějž bylo možné pozorovat nízkou míru ochrany, a to pouze v jedné jamce, kde měla hád'átka pozměněný fenotyp a sníženou motilitu.



Obrázek 7: Zobrazuje *C. elegans* ve stavu živých (A) a mrtvých (B) jedinců. Obrázek byl pořízen automatickým mikroskopem CV7000S (Yokogawa). Skutečná velikost jedinců se pohybuje kolem 1 mm. Vzorek byl fotografován na 384jamkové mikrotitrační destičce. Pro lepší vizualizaci byly obrázky oříznuty a následně upraveny ve Photopea, kde byla použita automatická úprava úrovně jasu.

Jediná testovaná látka, která chránila před působením juglonu i po 72 hodinách po otrávení byla látka 14, a to v nejvyšší koncentraci – 100 μM . Fenotyp i motilita byly ve dvou jamkách srovnatelné s kontrolou, avšak ve třetí jamce byla pozorována změna fenotypu se sníženou motilitou. Všechny ostatní jamky otrávené juglonem po dobu 72 hodin nepřežily.

Po 72 hodinách od přidání juglonu byla také pozorována toxicita testovaných látek na *C. elegans* bez přítomnosti juglonu. Bylo pozorováno, že látky 6 a 11 o koncentraci 100 μM zabíjely stejně účinně jako juglon. U těchto látek při koncentraci 30 μM byla pozorována změna fenotypu a u látky 6 dokonce i při koncentraci 1 μM . U látek 5, 10, 13, 14 a 15 byla při nejvyšších koncentracích zaznamenána mírná toxicita, a to lehkou změnu fenotypu či snížení motility. Všechny ostatní látky nevykazovaly efekt toxicity.

Pomocí automatické mikroskopie byl testován také toxický vliv fragmentu tau (WT R2R3) na *C. elegans*, kdy testovaní jedinci byly ošetřeny stejným způsobem, jaký je uvedený výše. U tohoto stresoru však nebyl pozorován vliv na fenotyp takto ošetřených jedinců, a to v žádné jamce. Z těchto pilotních experimentů lze usoudit, že WT R2R3 neměl na *C. elegans* vliv.

4.3 Testování účinků jednotlivých látek za současného působení stresoru

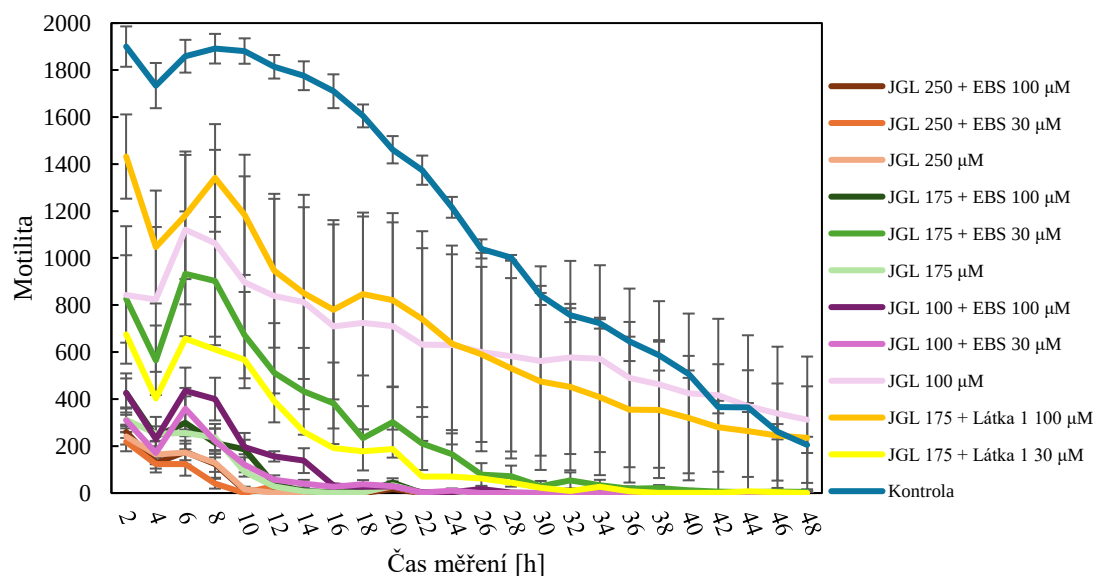
Protektivní účinky vůči působení juglonu nebo paraquatu na *C. elegans* byly testovány pomocí WMicrotrackeru u látek 1, 2, 13, 14 a EBS, a následně vyhodnoceny na základě získaných grafických dat. *C. elegans* byly preinkubovány s testovanými látkami po dobu 3 či 24 hodin, a to třemi metodami: 1) v mikrozkušnicích na rotátou bez následného promytí, 2) v mikrozkušnicích na rotátou s následným promytím, nebo 3) ve 24jamkové destičce na třepačce s následným promytím.

4.3.1 Výsledky získané preinkubací látky v mikrozkušnicích bez promytí

Všechny testované látky touto metodou byly preinkubovány s *C. elegans* před měřením pomocí WMicrotrackeru na rotátoru po dobu 3 hodin.

Graf 10 zobrazuje současné působení různých koncentrací juglonu s EBS či látkou 1. Látka 1 byla testována v koncentracích 100 a 30 μM při současném působení juglonu (175 μM), přičemž v obou případech byla motilita *C. elegans* výrazně vyšší než u negativní kontroly (JGL 175 μM), a to zejména při koncentraci 100 μM . Z těchto výsledků by se dalo uvažovat o protektivním účinku této látky. Dále byl testován EBS,

kdy při nejvyšší použité koncentraci juglonu (250 μM), nevykazoval žádné protektivní účinky, ani v jedné testované koncentraci. Při testování juglonu v koncentraci 175 μM bylo u EBS v koncentraci 30 μM pozorována výrazně vyšší motilitu ve srovnání s negativní kontrolou (JGL 175 μM), což naznačuje možný protektivní účinek. Avšak při testování koncentrace juglonu 100 μM nebyl u EBS prokázán žádný protektivní efekt, ani v jedné testovaných koncentrací.



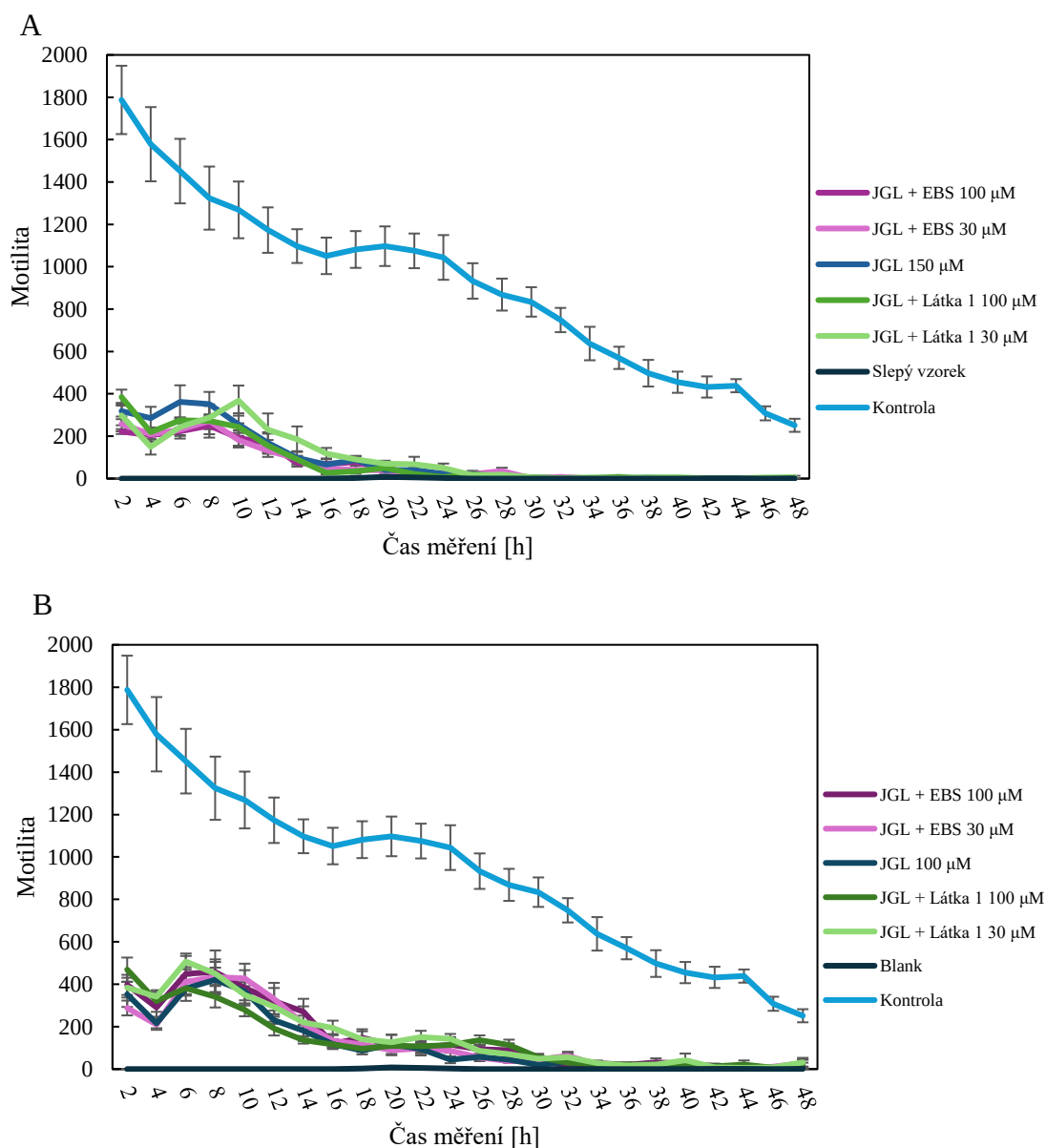
Graf 10: Vliv různé koncentrace juglonu na motilitu *C. elegans* a současné působení EBS a látky 1 při různých koncentracích. Hád'átka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μM FUdR, 0-250 μM juglonu, v objemu 100 μl a krmení *E. coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0. Dále zahrnoval 0-100 μM EBS, látku 1 0-100 μM . Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE).

4.3.2 Výsledky získané preinkubací látky v mikrozkušnicích s promytím

Všechny testované látky touto metodou byly preinkubovány s *C. elegans* před měřením pomocí WMicrotrackeru na rotátoru po dobu 3 hodin.

Graf 11 ukazuje vliv EBS a látky 1 za současného působení juglonu o různé koncentraci. Pro lepší přehlednost byl rozdělen (A, B). Graf 11A zobrazuje, že ve srovnání s negativní kontrolou (JGL 150 μM) dosahovala mírně vyšší motility pouze hád'átka ošetřená látkou 1 (30 μM), a to pouze od 9. do 18. hodiny. Hád'átka ošetřená ostatními látkami nevykazovala žádnou míru protekce. U grafu 11B je oproti negativní kontrole (JGL 100 μM) možné pozorovat mírně vyšší motilitu *C. elegans* ošetřenou

látkou 1 (30 μM) pouze do 8. hodiny. Motilitu negativní kontroly prakticky kopírují ostatní testované látky ve všech koncentracích. Pro posouzení reálného protektivního účinku těchto látek by bylo zapotřebí zopakovat testování za nižší koncentrace stresoru.

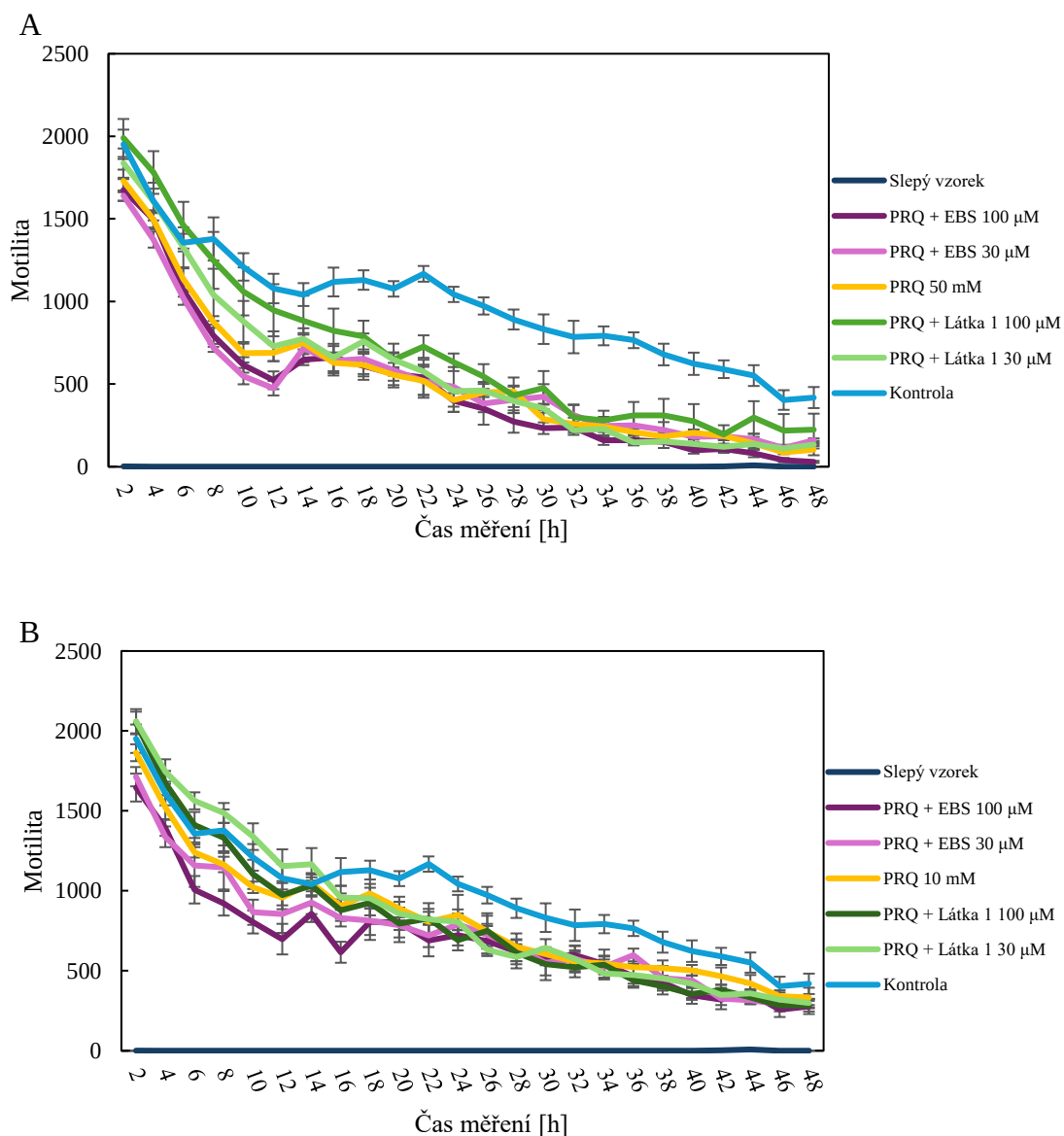


Graf 11: Vliv EBS a látky 1 při různých koncentracích na motilitu *C. elegans* za současného působení juglonu o koncentraci 150 (A) a 100 (B). Hádátka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v *S*-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μM FUDR, krmení *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0 a 0-150 μM juglonu v objemu 100 μl . Dále zahrnoval 0-100 μM EBS a 0-100 μM látky 1. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Kontrola byla provedena v duplikátu, jejíž hodnoty byly sloučeny.

Graf 12 zobrazuje vliv EBS a látky 1 za současného působení paraquatu o různé koncentraci, kdy pro lepší přehlednost byl graf rozdělen – A, B.

Z grafu 12A je zřejmé, že obě koncentrace EBS dosahují srovnatelných až nižších hodnot motility než negativní kontrola (PRQ 50 mM). Naopak látka 1 (30 μ M) až do 14. hodiny vykazovala mírně vyšší motilitu. V koncentraci 100 μ M vykazovala ve srovnání s negativní kontrolou konzistentně vyšší motilitu v průběhu celého měření, s výjimkou 28., 32. a 42. hodiny, kdy se hodnoty obou skupin rovnaly.

Motilita háďátek ošetřených EBS u grafu 12B je nižší i oproti negativní kontrole (PRQ 10 mM). Látka 1 (100 μ M) dosahovala ve srovnání s negativní kontrolou vyšší motility až do 12. hodiny, kdy se motilita obou skupin vyrovnala. Ovšem v koncentraci 30 μ M měla tato látka hodnoty motility vyšší než neošetřená kontrola až do 14. hodiny. A dalo by se tak u ní uvažovat o protektivním efektu. Při porovnání s grafem 12A je zřejmé, že EBS v obou koncentracích v kombinaci s paraquatem má pravděpodobně na *C. elegans* toxické účinky.



Graf 12: Vliv EBS a látky 1 při různých koncentracích na motilitu *C. elegans* za současného působení paraquatu o koncentraci 50 mM (A) a 10 mM (B). Hádátka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μ M FUdR, krmení *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0 a 0-150 μ M juglonu v objemu 100 μ l. Dále zahrnoval 0-100 μ M EBS a 0-100 μ M látky 1. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Kontrola byla provedena v duplikátu, jejíž hodnoty byly sloučeny.

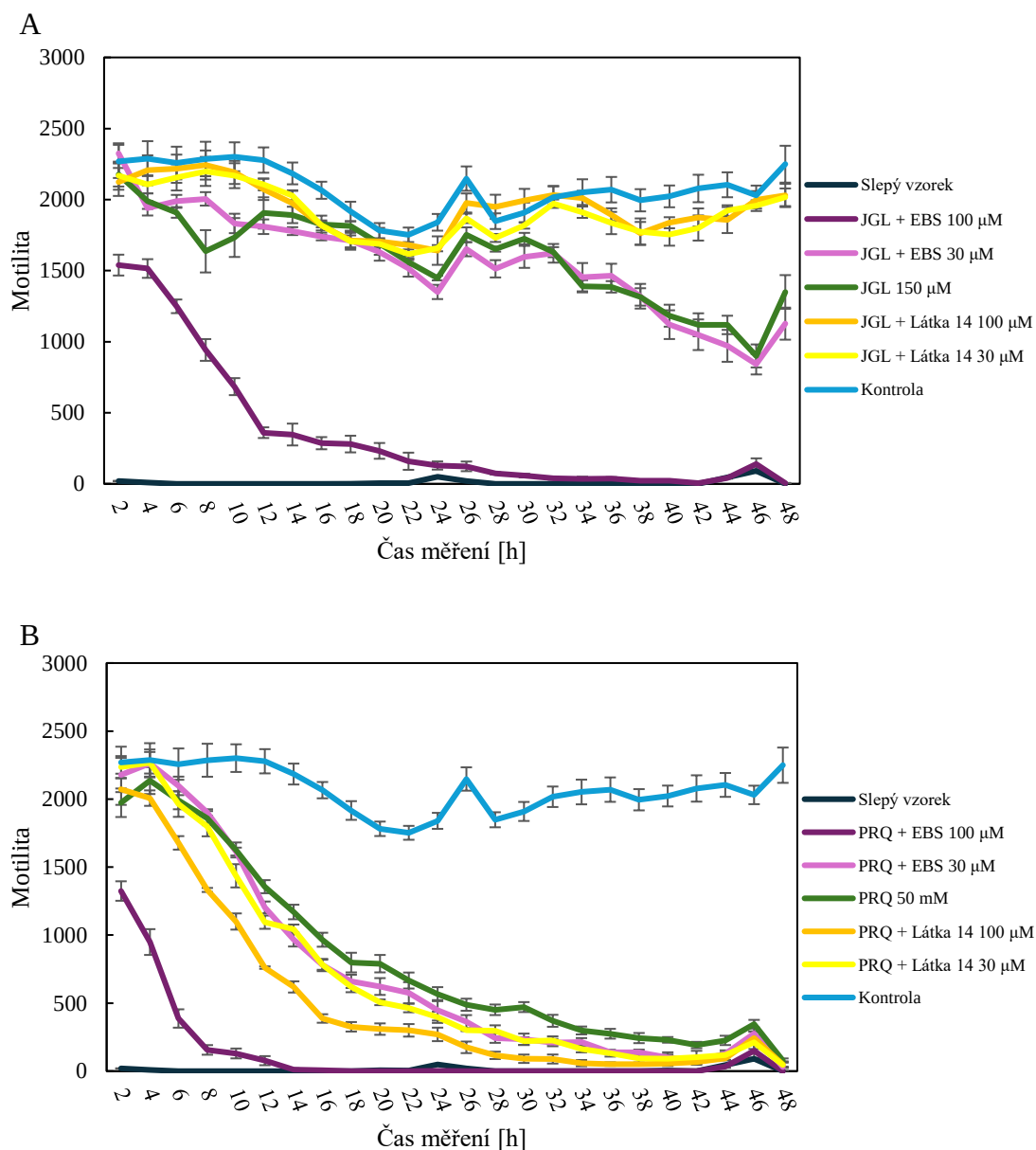
4.3.3 Výsledky získané preinkubací látky ve 24jamkové destičce s promytím

Vzhledem k nízkému objemu média při preinkubaci *C. elegans* s testovanými látkami by v mikrozkuvkách nemuselo docházet k jeho dostatečnému pohybu, což by mohlo vést k usazování *C. elegans* či k jejich uplívání na stěnách. Zavedením preinkubace ve 24jamkové destičce umístěné na třepačce byl tento možný rizikový faktor minimalizován a byl zajištěn konzistentní pohyb *C. elegans* během expozice. Všechny testované látky byly touto metodou preinkubovány s *C. elegans* po dobu 3 či 24 hodin.

4.3.3.1 Látky 1, 14 a ebselen

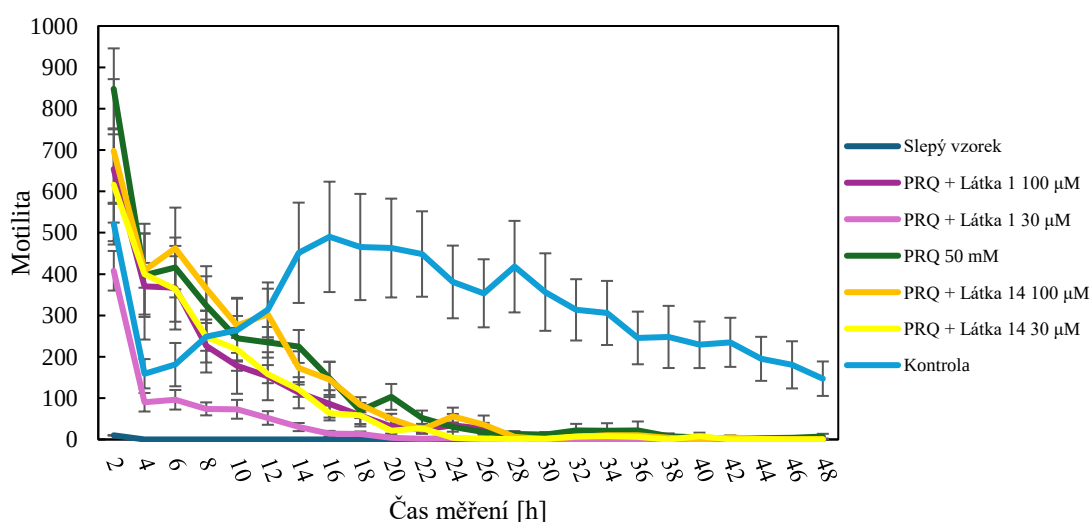
Graf 13 zobrazuje vliv EBS a látky 14 za současného působení juglonu a paraquatu. Testované látky byly preinkubovány po dobu 3 hodin. Pro lepší přehlednost byl graf rozdělen (A, B).

Na grafu 13A lze pozorovat výrazně nízkou motilitu hád'átek inkubovaných s 100 μM EBS, což opět poukazuje na toxicitu této koncentrace na *C. elegans*. Nižší testovaná koncentrace EBS (30 μM) se většinu měření rovnala motilitě u negativní kontroly (JUGL 150 μM). Naopak látka 14 v obou koncentracích konstantně dosahovala velmi podobné motility jako neotrávená kontrola, přičemž od 14. do 22. hodiny byl zaznamenán propad na hodnoty negativní kontroly. Ovšem v tomto časovém úseku bylo pozorováno krátkodobé snížení motility u všech testovaných skupin a následné krátkodobé zvýšení, což bylo pravděpodobně zapříčiněno mechanickým narušením měření vlivem pohybu v okolí WMicrotrackeru. Na grafu 13B lze opět pozorovat výrazně nízkou motilitu EBS (100 μM). I zbylé testované látky dosahovaly ve všech koncentracích nižší motility než negativní kontrola (PRQ 50 mM).



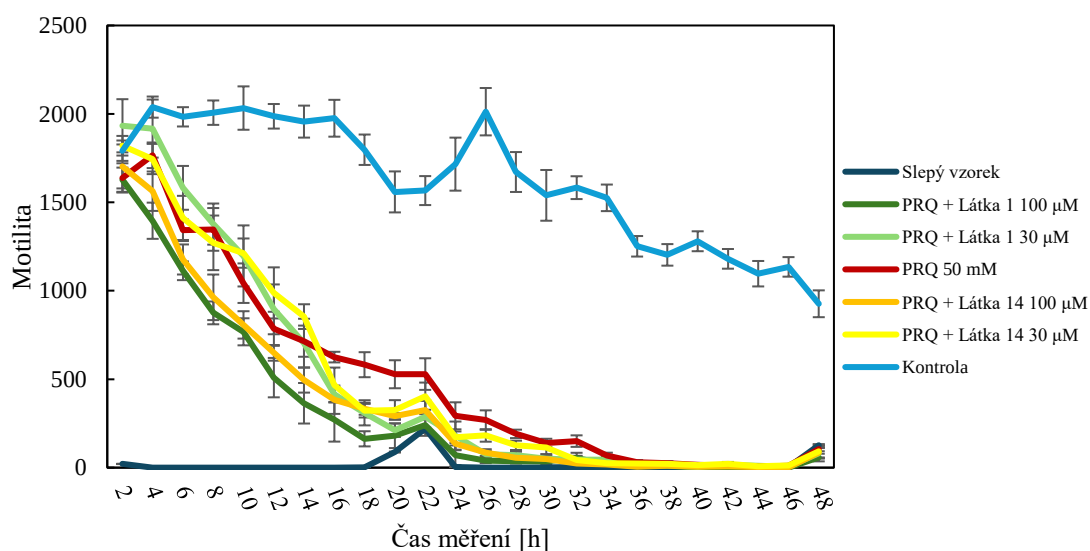
Graf 13: Vliv EBS a látky 14 při různých koncentracích na motilitu *C. elegans* za současného působení juglonu (A) a 50 mM paraquat (B). Hádátka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μM FUdR, krmení *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0 a 0-150 μM juglonu, 0-50 mM paraquat, v objemu 100 μl . Dále zahrnoval 0-100 μM EBS a 0-100 μM látky 14. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Kontrola byla provedena v duplikátu, jejíž hodnoty byly sloučeny.

Graf 14 zobrazuje vliv látky 1 a 14 na motilitu *C.elegans* za současného působení paraquatu. Testované látky byly preinkubovány po dobu 3 hodin. Na grafu lze pozorovat, že zpočátku měření dosahovala neošetřená kontrola velmi nízkých hodnot a na očekávanou úroveň motility se srovnala až ve 14. hodině měření, což mohlo být způsobeno několika důvody. *C. elegans* mohla být fázi klidu či regenerace způsobené manipulací po přenosu do jamek mikrotitrační destičky, nebo mohlo dojít k technickému problému při kalibraci na začátku měření. Celkově toto vychýlení však nenarušilo měření. Při porovnání motility háďátek negativní kontroly (PRQ 50 mM) s testovanými látkami o různé koncentraci, je patrné, že pouze jedinci inkubovaný s látkou 14 (100 μ M) dosahovaly mírně vyšší motility, a to pouze od 4. do 13. hodiny měření. Tato látka v koncentraci 30 μ M společně s látkou 1 v koncentraci 100 μ M dosahovaly srovnatelně nižších hodnot než negativní kontrola. Výrazně nízké hodnoty motility byly pozorované u háďátek ošetřených látkou 1 v koncentraci 30 μ M, kdy již v 16. hodině byla jejich aktivita nulová.



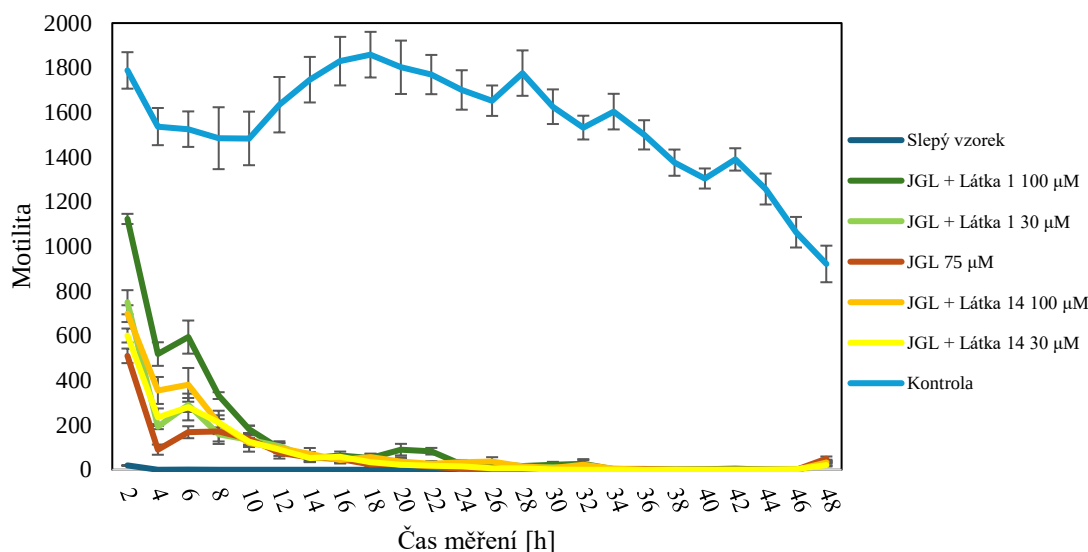
Graf 14: Vliv látky 1 a 14 při různých koncentracích na motilitu *C. elegans* za současného působení paraquatu. Háďátka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μ M FUDR, krmení *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0 a 0-50 mM paraquat, v objemu 100 μ l. Dále zahrnoval 0-100 μ M látky 1 a 0-100 μ M látky 14. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Kontrola byla provedena v duplikátu, jejíž hodnoty byly sloučeny.

Graf 15 opět zobrazuje vliv látky 1 a 14 na motilitu *C.elegans* za současného působení paraquatu, avšak testované látky byly tentokrát preinkubovány po dobu 24 hodin. Zde je možné pozorovat mírný protektivní efekt u látek 1 i 14 v koncentraci 30 μM . Hád'átka inkubovaná s látkou 1 (30 μM) vykazovala ve srovnání s negativní kontrolou (PRQ 50 mM) do 14. hodiny mírně vyšší motilitu s výjimkou 8. hodiny, kdy se sledované parametry protnulý. Ve stejné koncentraci byla motilita u látky 14 vyšší oproti negativní kontrole pouze od 9. do 15. hodiny. U obou testovaných látek v nejvyšší koncentraci (100 μM) byla po celou dobu měření pozorována nízká motilita, která se nacházela pod úrovní negativní kontroly. Od 18. do 24. hodiny lze pozorovat krátkodobé zvýšení aktivity hád'átek, což bylo pravděpodobně zapříčiněno mechanickým narušením měření vlivem pohybu v okolí WMicrotrackeru.



Graf 15: Vliv látky 1 a 14 při různých koncentracích na motilitu *C. elegans* za současného působení paraquatu. Hád'átka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μM FUDR, krmení *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0 a 0-50 mM paraquat, v objemu 100 μl . Dále zahrnoval 0-100 μM látky 1 a 0-100 μM látky 14. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Kontrola byla provedena v duplikátu, jejíž hodnoty byly sloučeny.

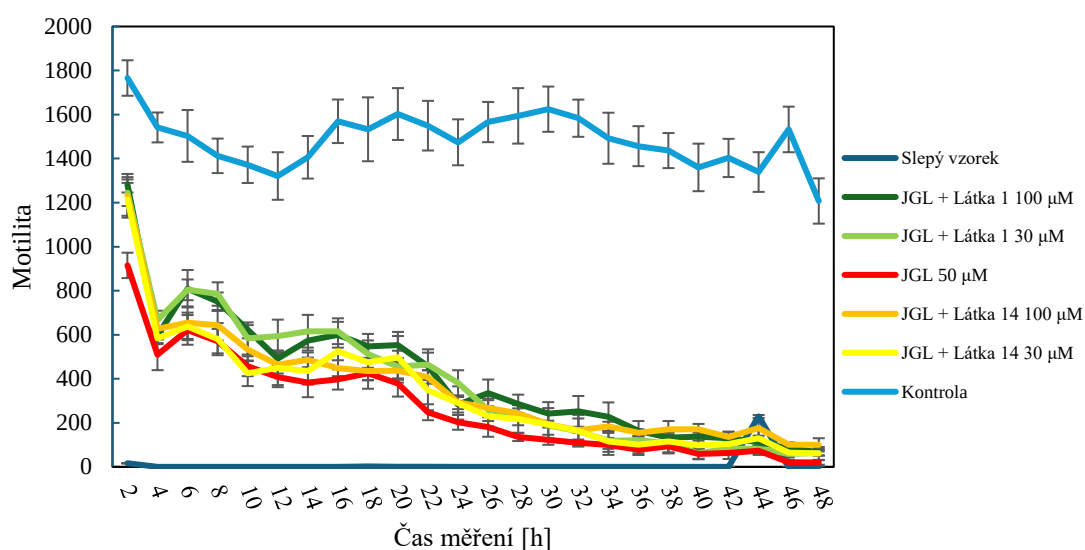
Graf 16 zobrazuje vliv látky 1 a 14 na motilitu *C.elegans* za současného působení juglonu. Testované látky byly preinkubovány po dobu 3 hodin. Ve srovnání s neotrávenou kontrolou dosahovala ošetřená hád'átka velmi nízké motility. Nejvýraznější aktivitu oproti negativní kontrole (JGL 75 μ M) vykazovaly jedinci inkubovaný s látkou 1 (100 μ M), které se srovnaly na stejnou úroveň ve 12. hodině. Dále byla pouze do 8. hodiny mírně vyšší motilita u zbylých testovaných látek.



Graf 16: Vliv látky 1 a 14 při různých koncentracích na motilitu *C. elegans* za současného působení juglonu. Hád'átka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μ M FUDR, krmění *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0 a 0-75 μ M juglonu, v objemu 100 μ l. Dále zahrnoval 0-100 μ M látky 1 a 0-100 μ M látky 14. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Kontrola byla provedena v duplikátu, jejíž hodnoty byly sloučeny.

Graf 17 zobrazuje vliv látky 1 a 14 na motilitu *C.elegans* za současného působení juglonu. Testované látky byly preinkubovány po dobu 3 hodin. Na grafu je možné pozorovat vyšší aktivitu hád'átek vůči negativní kontrole (JUGL 50 μ M) v obou koncentracích u látky 1, kdy ke srovnání pozorovaného parametru došlo pouze v koncentraci 30 μ M až ve 34. hodině. Mírně vyšší motility dosahovala i hád'átka ošetřená látkou 14. V koncentraci 100 μ M se s výjimkou 6. a 18. hodiny nacházela nad úrovní motility negativní kontroly. Naopak v koncentraci 30 μ M vyšší motility dosahovala pouze od 12. do 33. hodiny. Na konci měření, od 42. do 46. hodiny, byla

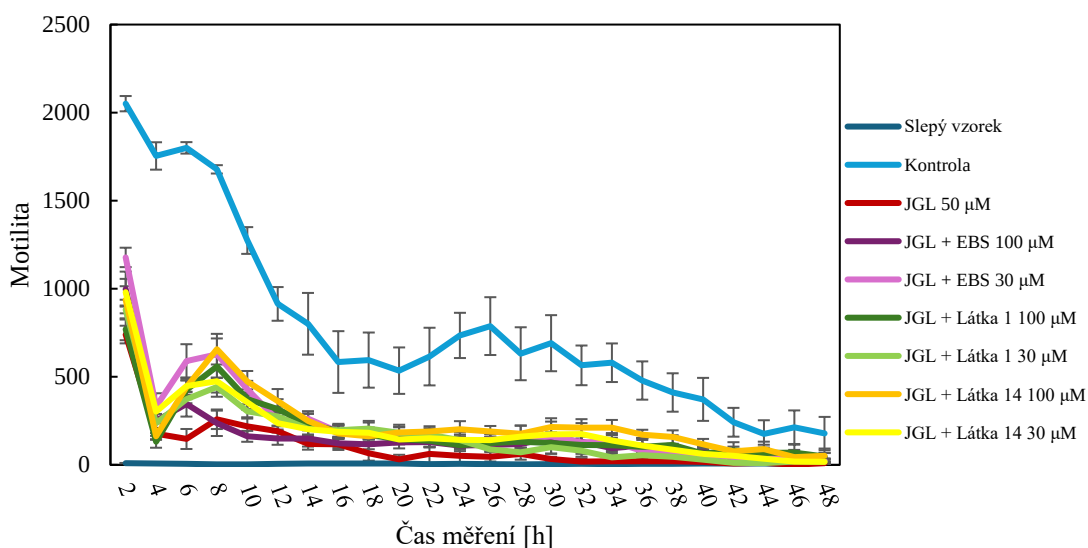
pozorována krátkodobá zvýšená motilita *C. elegans*, což bylo pravděpodobně zapříčiněno mechanickým narušením měření vlivem pohybu v okolí WMicrotrackeru.



Graf 17: Vliv látky 1 a 14 při různých koncentracích na motilitu *C. elegans* za současného působení juglonu. Hád'átka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μM FUDR, krmění *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0 a 0-50 μM juglonu, v objemu 100 μl . Dále zahrnoval 0-100 μM látky 1 a 0-100 μM látky 14. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Kontrola byla provedena v duplikátu, jejíž hodnoty byly sloučeny.

Graf 18 zobrazuje vliv EBS, látky 1 a 14 na motilitu *C. elegans* za současného působení juglonu. Látky 1 a 14 byly testovány ve dvou paralelních vzorcích, které byly následně sloučeny. Testované látky byly preinkubovány po dobu 24 hodin. U 100 μM EBS byl potvrzen jeho toxický efekt, kdy jím ošetření jedinci dosahovali motility srovnatelné s negativní kontrolou (JUG 50 μM), a to již v 8. hodině měření. Z tohoto grafu je také patrné, že motilita hád'átek s EBS (30 μM) a s látkou 14 (100 μM) dosahovala velmi podobných hodnot, které ve srovnání s negativní kontrolou byly mírně vyšší, což ukazuje na možný protektivní účinek. Nižší koncentrace látky 14 (30 μM) dosahovala také nižší motility, která avšak byla velmi podobná jako u látky 1 v obou koncentracích. Celkově tyto látky vykazovaly výraznější pozitivní vliv na motilitu ošetřených hád'átek od 4. do 14. hodiny měření, kdy následně došlo ke snížení motility, která ale stále byla nad úrovní negativní kontroly. Od 16. hodiny měření se u těchto látek pohybovala motilita v podobných hodnotách. Celkově by se dalo uvažovat

o protektivním efektu u látky 14 (100 μM), která si držela nejvyšší motilitu ze všech testovaných látek do konce měření, avšak ani ta se neblížila neotrávené kontrole.



Graf 18: Vliv látky 1, 14 a EBS při různých koncentracích na motilitu *C. elegans* za současného působení 50 μM juglonu. Hádátka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μM FUDR, krmení *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0 a 0-50 μM juglonu, v objemu 100 μl . Dále zahrnoval 0-100 μM EBS, 0-100 μM látky 1 a 0-100 μM látky 14. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Kontrola a látky 1 a 14 byly měřeny v duplikátu a jejich hodnoty byly sloučeny.

4.3.3.2 Látky 2 a 13

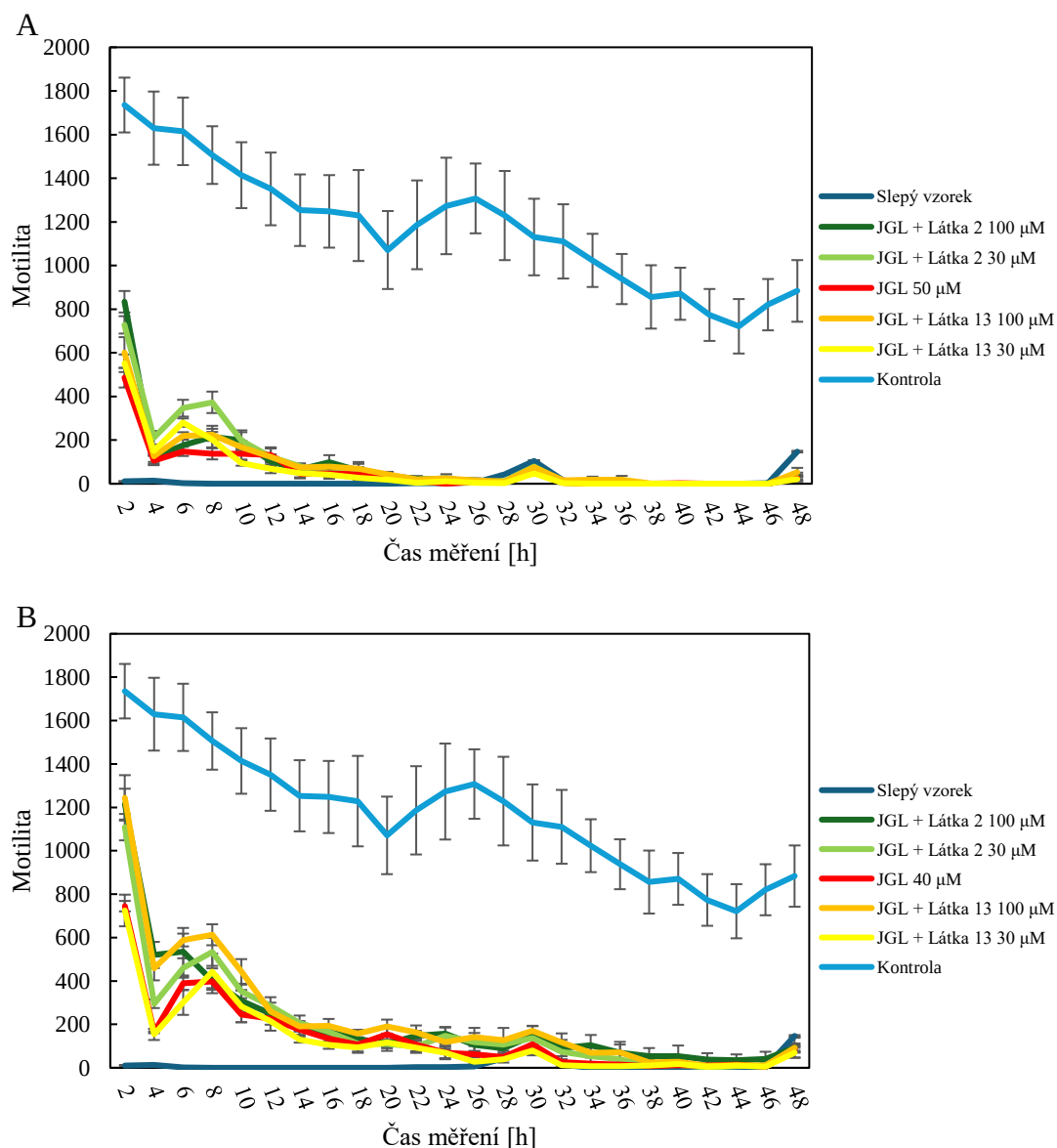
Graf 19 ukazuje vliv látky 2 a 13 na motilitu *C. elegans* za současného působení různých koncentrací juglonu. Testované látky byly preinkubovány po dobu 24 hodin. Pro lepší přehlednost byl graf rozdělen na A, B.

Graf 19A je zobrazuje, že obě testované látky v obou koncentracích nedosahovaly výrazně vyšší motility než negativní kontrola (JGL 50 μM). Z testovaných látek dosahovala nejvyšší motility hádátek ve srovnání s negativní kontrolou látka 2 v koncentraci 30 μM , avšak pouze do 10. hodiny.

U grafu 19B je s porovnáním s negativní kontrolou (JGL 40 μM) znatelně viditelná vyšší motilita u látky 13 v koncentraci 100 μM , která se však od 12. do 14. hodiny měření srovnala negativní kontrolou a následně se nacházela pouze mírně nad úrovní této kontroly. Dále se mírně vyšších hodnot dosahovala i látka 2 v obou

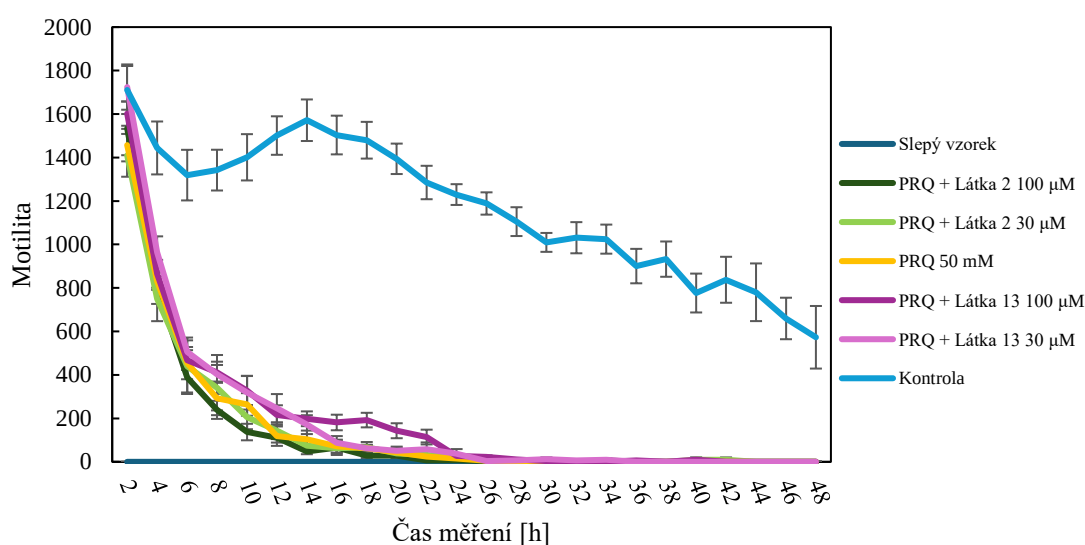
koncentracích, přičemž od 18. do 22. hodiny došlo k protnutí s negativní kontrolou. Toxicky zde působila koncentrace 30 μM látky 13, která od začátku do konce měření pohybovala pod úrovní negativní kontroly.

Při porovnání variant těchto grafů je patrné, že pro vyhodnocení protektivních vlastností testovaných látek byla indukce oxidačního stresu za pomoci juglonu ideálnější při použití koncentrace 40 μM .



Graf 19: Vliv látky 2 a 13 při různých koncentracích na motilitu *C. elegans* za současného působení juglonu o koncentraci 50 (A) a 40 μM (B). Hádátka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v *S*-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μM FUDR, krmení *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0 a 0-50 μM juglonu, v objemu 100 μl . Dále zahrnoval 0-100 μM látky 2 a 0-100 μM látky 13. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Kontrola byla měřena v duplikátu a její hodnoty byly sloučeny.

Graf 20 zobrazuje vliv látky 2 a 13 na motilitu *C. elegans* za současného působení paraquatu. Testované látky byly preinkubovány po dobu 3 hodin. Hád'átka ošetřená látkou 2 v obou koncentracích vykazovala srovnatelnou motilitu s negativní kontrolou (PRQ 50 mM). Naopak u látky 13 byla v nižší koncentraci (30 μ M) pozorována mírná protekce, avšak pouze do 16. hodiny měření. Vyšší koncentrace (100 μ M) této látky vykazovala vyšší motilitu hád'átek až do 24. hodiny měření, kdy se jejich motilita srovnala s negativní kontrolou.



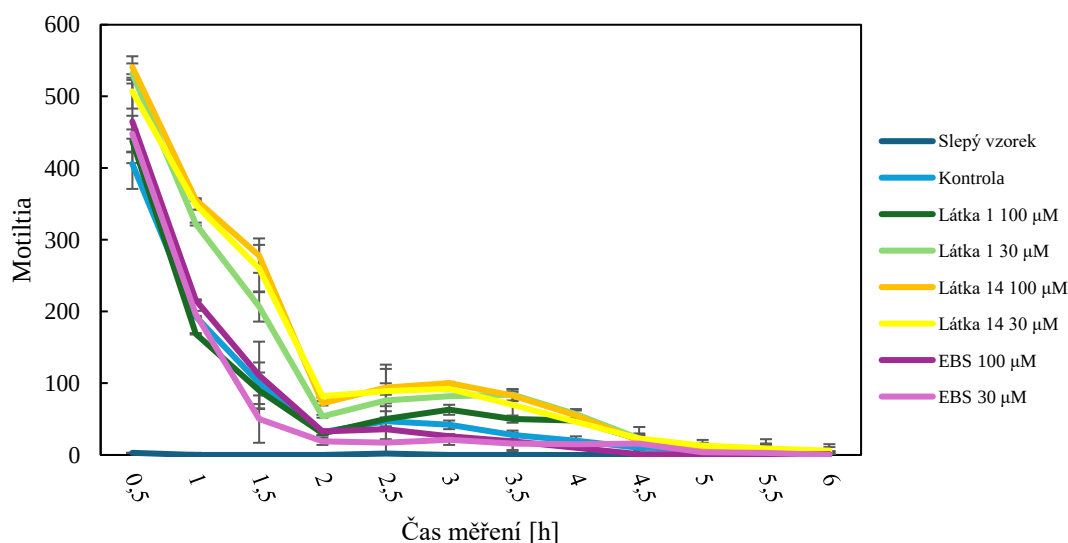
Graf 20: Vliv látky 2 a 13 při různých koncentracích na motilitu *C. elegans* za současného působení 50 mM paraquatu. Hád'átka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μ M FUDR, krmění *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0 a 0-50 mM paraquatu, v objemu 100 μ l. Dále zahrnoval 0-100 μ M látky 2 a 0-100 μ M látky 13. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Kontrola byla měřena v duplikátu a její hodnoty byly sloučeny.

4.4 Testování tepelného stresu

Testování tepelného stresu probíhalo na hád'átkách, která byla otrávená FUDR ($c = 500 \mu$ M) a krmena *E.coli* OP50 ($c = 1 \text{ mg/ul}$). Testování nejprve probíhalo v tekutém S-complete médiu v Petriho miskách v inkubátoru o teplotě 30 a 32 $^{\circ}$ C po dobu 24 hodin, kdy ani u jednoho experimentu nebyla vizuálně pozorována žádná změna motility. Toto zjištění neodpovídalo informacím z literatury, dle které jsou tyto hodnoty nad horní hranici přirozené teploty u *C. elegans*, kterou je 25 $^{\circ}$ C (Zhang et al., 2015). Důvod těchto výsledků je nejasný. Dále byla otestována teplota 37 $^{\circ}$ C

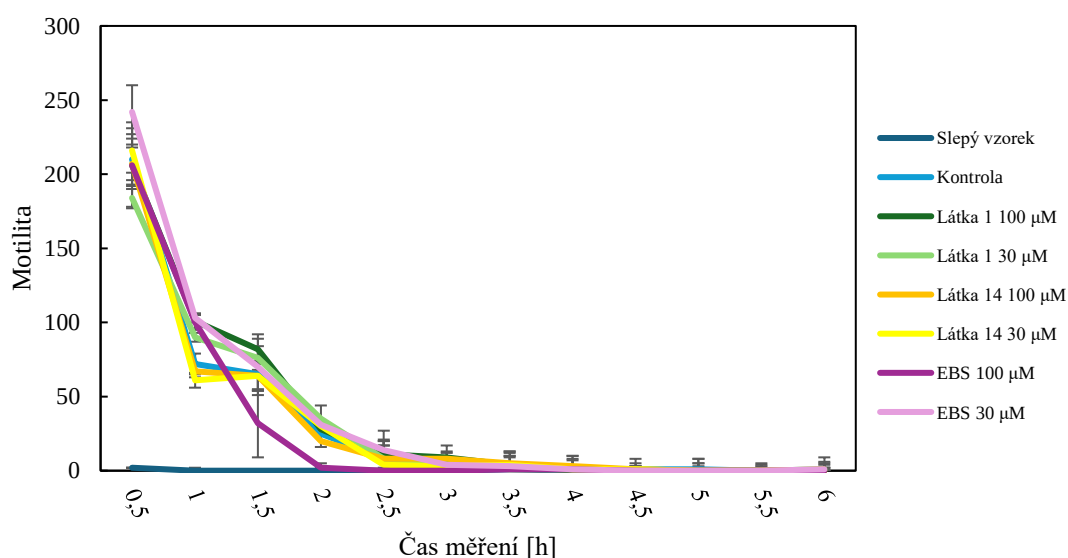
pomocí automatického mikroskopu Operetta s pravidelným snímáním po 1 hodině, u kterého bylo pozorováno úmrtí hád'átek do 3 hodin. Následně byl tepelný stres testován pomocí WMicrotrackeru umístěným v inkubátor, kdy byli jedinci nejprve preinkubováni s vybranými látkami ve 24jamkové mikrotitrační destičce na třepačce po dobu 3 a 24 hodin, které byly následně před měřením promyty.

Nejprve byl testován vliv 34,5 °C na *C.elegans*, kdy byl pozorován účinek látky 1, 14 a EBS. Tyto látky byly s *C. elegans* preinkubovány po dobu 24 hodin. Látka 1 v koncentraci 30 µM společně s látkou 14 v obou měřených koncentracích dosahovala podobné motility, která byla oproti kontrole výrazně vyšší. To by napovídalo o možném protektivním účinku těchto dvou látek vůči tepelnému stresu. Motilita u látky 1 o koncentraci 100 µM byla srovnatelná s kontrolou. Hád'átka ošetřená EBS byla v obou koncentracích vykazovala srovnatelné až nižší výsledky motility než kontrola, čímž byl možný protektivní účinek vyloučen. Celkově došlo k úmrtí hád'átek velmi rychle, a to již v 5. hodině měření prakticky všech testovaných skupin (Graf 21).



Graf 21: Vliv EBS, látky 1 a 14 na motilitu *C. elegans* za působení 34,5 °C. Hád'átka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu (n=80) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 µM FUdR, v objemu 100 µl, krmení *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0. Dále zahrnoval 0-100 EBS, 0-100 µM látky 1 a 0-100 µM látky 14. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 0,5 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). I přes to, že měření probíhalo po dobu 48 hodin, byla osa x zkrácena z důvodu brzkého úhynu všech jedinců, což umožňovalo pozorovat rozdíly mezi ošetřenými skupinami.

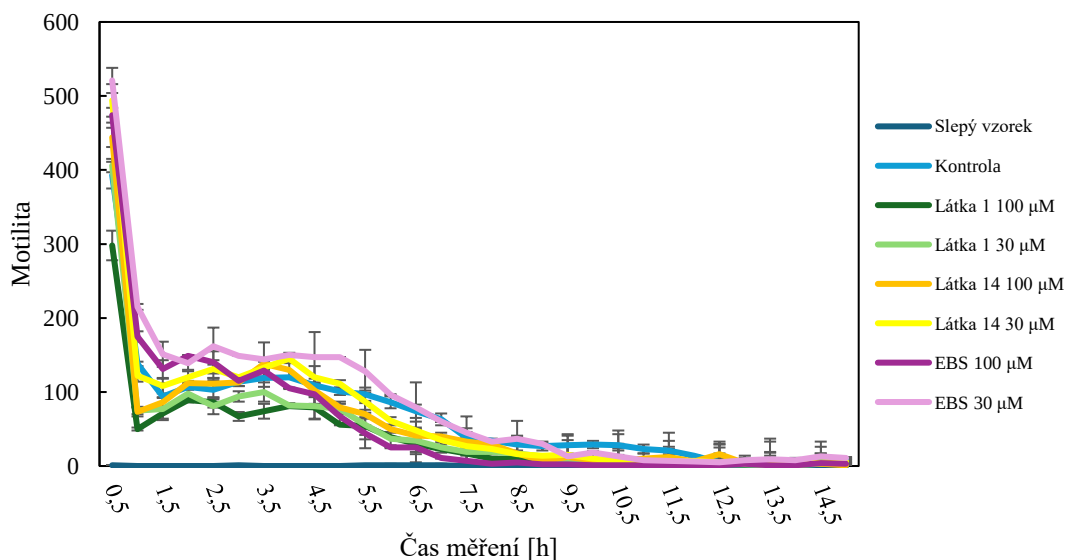
Dále byl testován vliv 33,5 °C, kdy *C. elegans* byla preinkubována s látkami 1, 14 a EBS po dobu 3 hodin. Z grafu 22 je zřejmé, že háďátka ošetřená testovanými látkami, dosahovala srovnatelné motility s kontrolou. Tudíž nebyl prokázán žádný protektivní účinek testovaných látek v žádné koncentraci. U EBS v koncentraci 100 µM bylo dokonce možné pozorovat rychlejší úmrtí testovaných háďátek. Celkově oproti výsledkům z grafu 21 došlo k úmrtí háďátek rychleji, a to již ve 4. hodině měření.



Graf 22: Vliv EBS, látky 1 a 14 na motilitu *C. elegans* za působení 33,5 °C. Háďátka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu (n=80) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 µM FUdR, v objemu 100 µl, krmení *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0. Dále zahrnoval 0-100 EBS, 0-100 µM látky 1 a 0-100 µM látky 14. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 0,5 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). I přes to, že měření probíhalo po dobu 48 hodin, byla osa x zkrácena z důvodu brzkého úhynu všech jedinců, což umožňovalo pozorovat rozdíly mezi ošetřenými skupinami.

Na grafu 23 byla testovaná reakce *C. elegans* na teplotu 32 °C, kdy háďátka byla preinkubována s látkami 1, 14 a EBS po dobu 24 hodin. Háďátka ošetřená látkou 1 v obou koncentracích dosahovala oproti kontrole nižší motility a k úmrtí došlo již v 9. hodině. Mírně vyšší motilitu oproti kontrole bylo možné pozorovat u látky 14 v koncentraci 30 µM, která se však vyrovnala již v 5. hodině a následně klesla pod úroveň kontroly. Do 5. hodiny měření šlo pozorovat srovnatelnou motilitu u EBS o koncentraci 100 µM s látkou 14 (30 µM), ta ovšem následně prudce klesla. Nejdéle

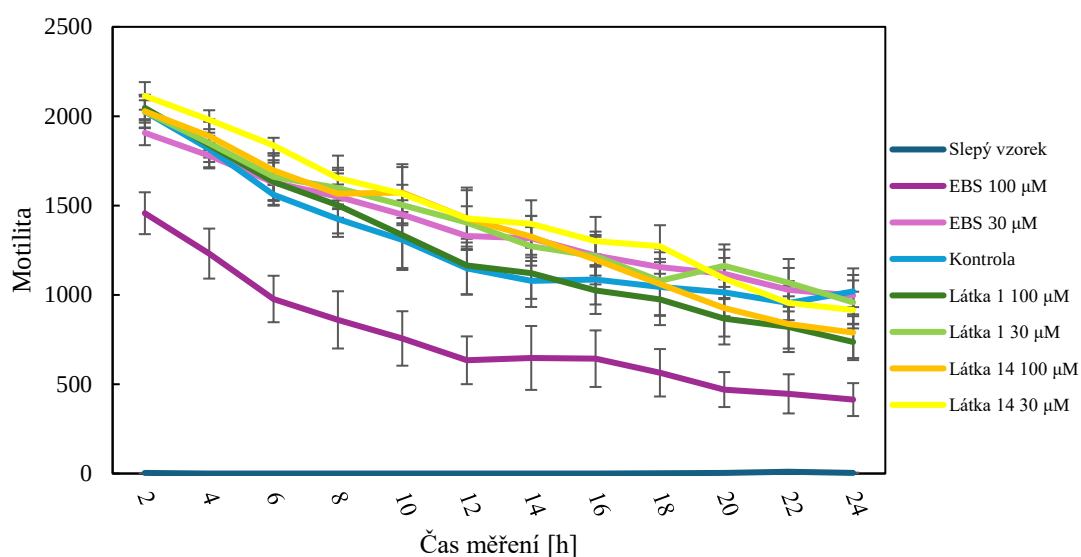
bylo možné pozorovat vyšší motilitu oproti neošetřené kontrole u EBS (30 μM), která po jeho úroveň klesla až po 9. hodině. Oproti teplotě 34,5 °C byla délka života u kontroly prodloužena z 5 na 12 hodin.



Graf 23: Vliv EBS, látky 1 a 14 na motilitu *C. elegans* za působení teploty 32 °C. Hádátka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 48 h. Experiment zahrnoval 500 μM FUDR, v objemu 100 μl , krmění *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0. Dále zahrnoval 0-100 EBS, 0-100 μM látky 1 a 0-100 μM látky 14. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 0,5 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). I přes to, že měření probíhalo po dobu 48 hodin, byla osa x zkrácena z důvodu brzkého úhynu všech jedinců, což umožňovalo pozorovat rozdíly mezi ošetřenými skupinami.

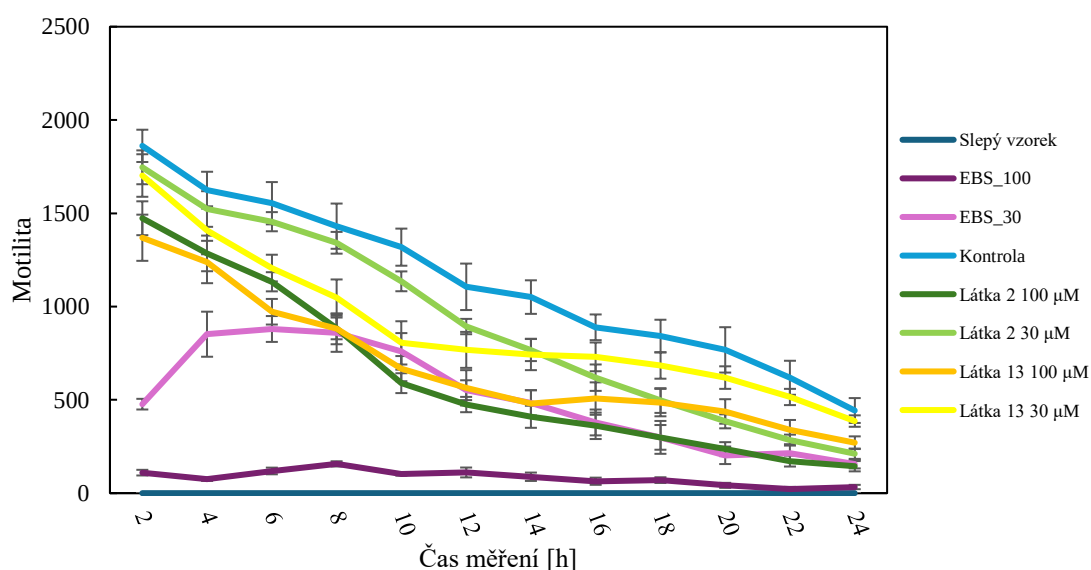
Další testovanou teplotou bylo 25 °C, která je hraniční přirozenou teplotou u *C. elegans*. Testované látky byly preinkubovány s *C. elegans* po dobu 24 hodin. Na grafu 24 lze pozorovat, že hádátka ošetřena EBS v koncentraci 100 μM dosahovala velmi nízké motility, což potvrzovalo hypotézu o jejím toxickém efektu, která byla v předchozím testování pozorována. Naopak v koncentraci 30 μM byla jejich aktivita ve srovnání s neošetřenou kontrolou od 4. do 22. hodiny výrazně vyšší. Stejný trend byl pozorován také u látky 1 (30 μM) a 14 v obou koncentracích, přičemž u látky 14 (100 μM) byl pozorován pokles motility pod hladinu kontroly již v 18. hodině. Látka 1 v nejvyšší testované koncentraci (100 μM) do 15. hodiny kopírovala motilitu neošetřené kontroly, přičemž následně klesla pod její úroveň. Celkově by šlo o

protektivním efektu uvažovat u látky 1 v koncentraci 30 μM a u látky 14 v obou koncentracích a u EBS (30 μM).



Graf 24: Vliv EBS, látky 1 a 14 na motilitu *C. elegans* za působení 25 °C. Hád'átka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 24 h. Experiment zahrnoval 500 μM FudR, v objemu 100 μl , krmení *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0. Dále zahrnoval 0-100 EBS, 0-100 μM látky 1 a 0-100 μM látky 14. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Kontrola a látky 1 a 14 byly měřeny v duplikátu, jejichž hodnoty byly sloučeny.

Dále byly testovány možné protektivní účinky látek 2 a 13 vůči teplotě 25 °C, kdy preinkubace s *C. elegans* probíhala 24 hodin. U grafu 25 nebyla pozorovaná protekce u žádné z testovaných koncentrací látky 2 i 13, kdy tedy motilita háďátek ošetřených těmito látkami byla nižší než samotná kontrola. Zároveň byla nižší motilita pozorovaná i háďátek ošetřených EBS (30 μ M), která v předchozím měření dosahovala vyšší motility a vedla k úvaze o jejím možném protektivním účinku, který zde nebyl potvrzen. Naopak její koncentrace 100 μ M i v rámci tohoto měření potvrdila svůj toxický účinek.



Graf 25: Vliv EBS, látky 2 a 13 na motilitu *C. elegans* za působení 25 °C. Háďátka byla kultivovaná na NGM plotnách a měřena v S-complete médiu ($n=80$) po dobu 24 h. Experiment zahrnoval 500 μ M FUdR, v objemu 100 μ l, krmení *E.coli* OP50 (1 mg/ml) v den 0. Dále zahrnoval 0-100 EBS, 0-100 μ M látky 2 a 0-100 μ M látky 13. Motilita *C. elegans* byla v čase měřena pomocí zařízení WMicrotracker a je vyjádřena jako počet přerušení paprsku za 2 h. Výsledky jsou zobrazeny ve spojnicovém grafu se standardní chybou (SE). Kontrola a látky 1 a 14 byly měřeny v duplikátu, jejichž hodnoty byly sloučeny.

5 DISKUZE

Tato práce se zabývala optimalizací metod pro testování vlivu látek na motilitu a přežití *C. elegans* s použitím mikrotitračních destiček. Tyto metody by mohly najít uplatnění ve studiu neurodegenerace a neuroprotektce v modelu *C. elegans*. Používané metody zahrnovaly měření motility *C. elegans* pomocí zařízení WMicrotracker za použití 96jamkové mikrotitrační destičky a automatickou mikroskopii využívající 384jamkové mikrotitrační destičky. WMicrotracker funguje na principu detekce pohybu hád'átek pomocí infračervených paprsků, které procházejí skrz jamky mikrotitrační destičky. V případě pohybu hád'átka dochází k přerušení paprsku, což je zaznamenáno jako motilita (PhylumTech, 2025).

Studované stresory zahrnovaly juglon, paraquat, fragment tau proteinu a teplotu v rozmezí od 25 do 37 °C. Jelikož testovaný fragment tau nevykazoval zjevné toxické efekty v pilotních experimentech, byly pro testování protektivních účinků skupiny organoselenových látek, u kterých byla dříve pozorována neuroprotektivní aktivita na lidských buňkách, použity pouze ostatní uvedené stresory.

Jako kontrolní látka byl použit organoselenový derivát ebselen (EBS), jehož antioxidační a neuroprotektivní aktivita byla prokázána na *C. elegans* v modelu toxicity vyvolané manganem ve studii Avila et al. (2012). Jeho neuroprotektivní, protizánětlivé a mitochondriálně ochranné účinky byly potvrzeny také na modelu myši ve studii Klann et al. (2020).

5.1 Optimalizace testovaných parametrů

Pro zajištění stability signálu pro testování motility pomocí zařízení WMicrotracker byla zvolena 96jamková mikrotitrační destička oproti 384jamkové, jelikož dnem desky tak procházely dva infračervené paprsky, zatímco u 384jamkové pouze jeden. Volena byla deska s plochým dnem, aby pohyb jedince neovlivňoval pohyby jedinců ostatních. Ze stejných důvodů byl optimalizován i počet jedinců na jamku. Zde se vycházelo z pilotních experimentů v laboratoři školitele Nguyễn (2024).

Počáteční testované hodnoty vycházely z výsledků práce Nguyễn (2024), doporučujících 40-50 hád'átek na jamku. Avšak jako optimální byla zvolena hodnota 80, kdy signál byl jasně vyšší, méně variabilní a aktivitu helmintů bylo možné sledovat déle. Tento počet byl v souladu s prací Sun (2023), ve které nebyl pozorován významný rozdíl v motilitě při počtech 70-100 jedinců.

Dalším optimalizovaným parametrem byl objem média v jednotlivých jamkách, kdy cílem bylo omezit vliv odparu a zároveň se vyhnout hypoxii hád'átek. Jako vhodný byl vybrán byl objem 100 μ l, což je i hodnota odpovídající literatuře Sun (2023).

Pro udržení synchronizované stárnoucí populace *C. elegans* bez kontaminace potomky byl využit inhibitor syntézy DNA FUdR, jehož optimální koncentrace byla stanovena na 500 μ M, protože spolehlivě bránila produkci potomstva. Jeho snížení v několika případech nemělo potřebný efekt. Ačkoliv tato koncentrace přesahuje běžně používané hodnoty, v rámci provedených experimentů poskytovala konzistentní a plynulý pokles motility v průběhu 48 hodin srovnatelný s kontrolou. I přes to, že se v této práci jednalo o krátkodobé experimenty, pro něž není délka života *C. elegans* kritická, je třeba zmínit, že tyto vyšší koncentrace FUdR (400 μ M) mohou při dlouhodobé expozici dle studie Rooney et al. (2014) vést ke zkrácení délky života tohoto organismu.

Bakterie *E. coli* OP50 se v laboratorních podmínkách běžně využívá jako potrava pro *C. elegans*. Přestože počáteční testované koncentrace této bakterie vycházely z práce Nguyễn (2024), ve které se využívá 0,5 mg/ml, byla stanovena její optimální koncentrace na 1 mg/ml, neboť při ní byly pozorovány vyšší hodnoty motility. Avšak vliv této koncentrace na dlouhodobou životnost nebyl testován, což by mohlo být předmětem budoucího výzkumu.

Dále byly optimalizovány vhodné koncentrace stresoru – juglonu a paraquat. Cílem bylo najít koncentraci, která by zajistila konzistentní sestupnou křivku motility *C. elegans* v čase 48 hodin. Tím bylo možné získat představu nejen o závislosti odpovědi na dávce stresoru, ale také na variabilitě v odpovědi mezi různými populacemi. Z optimalizačních experimentů pro juglon byly jako nejvhodnější koncentrace vybrány 50–100 μ M. Juglon je známý induktor oxidativního stresu, a to díky své schopnosti generovat reaktivní formy kyslíku, avšak dle studie Hernández-Cruz et al. (2023) může při nízkých koncentracích působit také jako antioxidant. Optimalizační výsledek odpovídá běžně používaným hodnotám, které jsou uvedeny i v práci Hernández-Cruz et al. (2023). Oxidativní stres, zejména na úrovni mitochondrií, byl u *C. elegans* indukován pomocí paraquat, který je kvůli tvorbě superoxidového aniontu považován za potenciální rizikový faktor pro rozvoj PD.

Paraquat redukuje a přenáší elektron na kyslík, čímž tvoří superoxidový anion. Z testovaných koncentrací paraquatu byla jako vhodná vybrána hodnota 50 mM. Tato koncentrace poskytovala konzistentní sestupnou křivku závislosti motility na čase. To je v souladu s výsledky studie Gonzales-Moreno et al. (2023), která testovala koncentrace 10, 50 a 100 mM, kdy koncentrace 50 mM a vyšší vedly k rychlejší mortalitě.

Kontrolním experimentem bylo i testování vlivu dokrmování během měření motility *C. elegans*. Ukázalo se, že dokrmení má na motilitu, a to i v pozdní době, zásadní vliv. Potenciálně by šlo informativnost testování zvýšit dokrměním v čase, kde už i kontrolní vzorek vykazuje minimální motilitu. Tento kontrolní experiment byl však proveden až v závěrečné fázi práce, dokrmení pomocí OP50 mohlo potenciálně odlišit toxicitu od energie šetřící inaktivity.

Dále je nutné uvést komentář k možnému statistickému vyhodnocení dat. V diplomové práci nebyl použit statistický test pro porovnání křivek, jelikož k dispozici nebyly vhodné nástroje. Smíšené modely, které by umožnily práci s nespojitými daty a nepravidelnou variabilitou, nebyly na pracovišti dostupné v softwarech bez nutnosti programování. Uvažované široce používané metody, jako je analýza křivek přežití nebo ANOVA pro opakovaná měření, nebyly kompatibilní se strukturou dat měření z WMicrotrackeru. Například analýza přežití pomocí Kaplan-Meierovy křivky a log-rank testu vyžaduje, aby pro každý subjekt byl pouze jeden čas do události (například do úmrtí nebo ochrnutí). Toho nebylo možné dosáhnout, jelikož u WMicrotrackeru mohou jednotlivá hádátka generovat více pohybových událostí v každém měřeném časovém intervalu. Dalším problémem je, že hodnoty měření často neklesají monotónně kvůli vysoké variabilitě měření, která může být zapříčiněna i rušením měření právě pohybem v okolí přístroje. Dalším příkladem je ANOVA pro opakovaná měření, která předpokládá spojitou proměnou a to, že data jsou přibližně normálně rozdělená a mají stejnou variaci každém časovém bodě s konstantními kovariancemi mezi nimi. Avšak v této práci jsou data o motilitě z WMicrotrackeru celočíselné hodnoty, které mají rozdílnou varianci v čase a mezi různými podmínkami, tudíž požadované předpoklady tato data nesplňují.

5.2 Testování účinku látek vůči juglonu a paraquatu

Pilotní studie organoselenových látek byly provedeny pomocí automatické mikroskopie, kdy po 19 a 72 hodinách byly *C. elegans* hodnoceny na základě fenotypu (motilita a tvar těla). Pozorována byla vysoká míra toxicity u látek 6 a 11. Naopak protektivní činnost vůči oxidativnímu stresu indukovaným juglonem byla pozorována pouze u látek 1, 2, 13, 14 a velmi mírná u EBS, a to obvykle v nejvyšší testované koncentraci (100 μ M). Na tyto látky se pak zaměřilo testování pomocí přístroje WMicrotracker, pomocí kterého byl tento efekt potvrzen u látky 1, který byl ale přítomen pouze pokud látka po preinkubaci nebyla odstraněna. Po odmytí žádná látka neposkytovala konzistentní protekci, což by naznačovalo, že testované látky vyvazují nebo chemicky neutralizují juglon v médiu. Stejný efekt byl zaznamenán i při indukci oxidativního stresu paraquatem.

Zajímavé bylo, že EBS i v koncentraci 100 μ M při samotném působení na *C. elegans* nevykazoval toxický efekt, což odpovídá zjištěním ve studii Avila et al. (2012). Avšak při jeho aplikaci společně s látkami indukující toxicitu byl i při promytí pozorován výrazný toxický vliv. Z těchto výsledků lze předpokládat, že tato koncentrace EBS synergicky účinkuje s juglonem i paraquatem a zvyšuje tak oxidativní stres organismu. Prooxidativní účinky při vyšších koncentracích byly u organoselenových derivátů různých typů již dříve popsány.

Testování látek probíhalo ve dvou variantách preinkubačních časů, a to po dobu 3 a 24 hodin. Při prodloužení inkubačního času testovaných látek byl očekáván vyšší protektivní účinek vůči oxidativnímu stresu, avšak byla někdy pozorována nižší motilita ošetřených *C. elegans*. Tato absence účinku podpořila hypotézu z předchozích výsledků, že testované látky pravděpodobně efektivně nepronikají do buněk *C. elegans*.

5.3 Testování účinku látek vůči tepelnému stresu

Je známo, že tepelný stres vede k výraznému snížení přežití hád'átek v čase. V této diplomové práci výsledky poukazují, že kombinace nízké teploty během larválního stádia (17 °C) a následné vystavení vysokým teplotám (30-37 °C) v dospělosti vede k teplotnímu šoku, což se projevuje snížením motility a délkou života jedinců. U *C. elegans* bez ohledu na přítomnost testovaných látek byla již při 32 °C pozorována smrt většiny dospělců do 10 hodin, při 33,5-33,4 °C do 5 hodiny a při 37 °C dokonce do 3

hodin, kdy doba přežití poslední zmiňované teploty odpovídá výsledkům ve studii Zevian and Yanowitz (2014). Naopak při teplotě 25 °C, která představuje horní hranici tolerance pro tento organismus, docházelo ke snížení na nejnižší motilitu většiny jedinců až ve 40. hodině měření. Celkově tyto výsledky korelují s výsledky studie Zhang et al. (2015).

Ze zkoumaných teplot bylo možné pozorovat výrazné rozdíly v motilitě a délce života mezi testovanými látkami až při 25 °C. Ošetření testovanými organoselenovými látkami nezvýšilo životaschopnost *C. elegans*, naopak zvýšilo toxicitu, a to především u EBS ve 100 µM koncentraci. Tyto výsledky odpovídají závěru ze studie Stefanello et al. (2015), která studovala vliv tepelného šoku (35°C) na životnost tohoto druhu za přítomnosti organických sloučenin selenu. Uvedená studie se zároveň zabývala antimikrobiálními účinky těchto látek na *E.coli* OP50, se kterými jsou organoselenové sloučeniny spojovány. Tento parametr nebyl v rámci této diplomové práce studován, a proto by měl být do budoucích studií těchto látek zahrnut. Zároveň je třeba zmínit, že se jednalo o pilotní testování vlivu tepelného stresu, tudíž je zapotřebí celkově tato měření zopakovat.

6 ZÁVĚR

V této diplomové práci byla úspěšně optimalizována metodika testování účinku látek na modelovém organismu *C. elegans* v 96jamkových deskách pomocí přístroje pro měření motility WMicrotracker. Optimalizované parametry zahrnovaly počet *C. elegans* na jamku, koncentraci FUDR, koncentraci *E. coli* kmene OP50, objem pro měření a vliv dokrmování. Podařilo se najít koncentrace stresorů juglonu a paraquat a do určité míry i hodnoty teploty použitelné pro testování protektivních látek. Původně nadějně výsledky pro antioxidační účinek látek 1, 2, 13, 14 a nebyly jednoznačně potvrzeny, pokud byli červi po preinkubaci promyti, což naznačovalo, že testované látky pravděpodobně vyvazovaly či neutralizovaly látku indukující oxidační stres (juglon, paraquat). Překvapení bylo pozorování, že ebselen (100 uM) má v kombinaci s juglonem, paraquatem či tepelným stresem na *C. elegans* toxické účinky. Následné testování tepelného stresu na *C. elegans* potvrdilo jeho vliv mortalitu v čase. Ani proti tomuto stresoru nevykazovaly testované látky protektivní účinky, avšak pro tato testování byly provedeny pouze pilotní experimenty a bylo by třeba je zopakovat.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- Abualassal, Q., Abudayeh, Z., Sirhan, A., Mkia, A., 2025. Exploring Quinazoline as a Scaffold for Developing Novel Therapeutics in Alzheimer's Disease. *Molecules* 30, 555. <https://doi.org/10.3390/molecules30030555>
- Al-Ghraiyyah, N.F., Wang, J., Alkhalifa, A.E., Roberts, A.B., Raj, R., Yang, E., Kaddoumi, A., 2022. Glial Cell-Mediated Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 10572. <https://doi.org/10.3390/ijms231810572>
- Altun, Zeynep F., Hall, David H., Herndon, Laura A., 2009. Introduction. *WormAtlas*. <https://doi.org/10.3908/WORMATLAS.1.1>
- Anastassopoulou, C.G., Fuchs, B.B., Mylonakis, E., 2011. *Caenorhabditis elegans*-based Model Systems for Antifungal Drug Discovery. *Curr. Pharm. Des.* 17, 1225–1233.
- Ashleigh, T., Swerdlow, R.H., Beal, M.F., 2023. The role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease pathogenesis. *Alzheimers Dement.* 19, 333–342. <https://doi.org/10.1002/alz.12683>
- Athar, F., Templeman, N.M., 2022. *C. elegans* as a model organism to study female reproductive health. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 266, 111152. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.111152>
- Avila, D.S., Benedetto, A., Au, C., Manarin, F., Erikson, K., Soares, F.A., Rocha, J.B.T., Aschner, M., 2012. Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1903–1910. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.044>
- Bell, S.M., Barnes, K., De Marco, M., Shaw, P.J., Ferraiuolo, L., Blackburn, D.J., Venneri, A., Mortiboys, H., 2021. Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease: A Biomarker of the Future? *Biomedicines* 9, 63. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9010063>
- Biga, P.R., Duan, J.E., Young, T.E., Marks, J.R., Bronikowski, A., Decena, L.P., Randolph, E.C., Pavuluri, A.G., Li, G., Fang, Y., Wilkinson, G.S., Singh, G., Nigrin, N.T., Larschan, E.N., Lonski, A.J., Riddle, N.C., 2025. Hallmarks of aging: A user's guide for comparative biologists. *Ageing Res. Rev.* 104, 102616. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102616>

- Brettschneider, J., Tredici, K.D., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., 2015. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 109–120. <https://doi.org/10.1038/nrn3887>
- Castillo-Rangel, C., Marín, G., Diaz-Chiguer, D.L., Zarate-Calderon, C.J., Viveros-Martinez, I., Caycho-Salazar, F.D.M.D.J., Torres-Pasillas, J.G., Hernández-Contreras, K.A., Vega-Quesada, L.A., Cano-Ortega, Y., García-Hernández, L., Vásquez-Celaya, L., 2023. Animal models in Alzheimer’s disease: Biological plausibility and mood disorders. *Neurol. Perspect.* 3. <https://doi.org/10.1016/j.neurop.2023.100110>
- Chen, L., Zhang, S., Liu, S., Gao, S., 2024. Amyotrophic Lateral Sclerosis Mechanism: Insights from the *Caenorhabditis elegans* Models. *Cells* 13, 99. <https://doi.org/10.3390/cells13010099>
- Chen, Z.-Y., Zhang, Y., 2022. Animal models of Alzheimer’s disease: Applications, evaluation, and perspectives. *Zool. Res.* 43, 1026–1040. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2022.289>
- Chong, Z.Z., Menkes, D.L., Souayah, N., 2024. Pathogenesis underlying hexanucleotide repeat expansions in C9orf72 gene in amyotrophic lateral sclerosis. *Rev. Neurosci.* 35, 85–97. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2023-0060>
- Collins, J.J., Huang, C., Hughes, S., Kornfeld, K., 2007. The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans* [WWW Document]. WormBook. URL http://www.wormbook.org/chapters/www_measurementanalysisCelegans/measurementanalysisCelegans.html (accessed 3.24.25)
- Conradt, B., 2005. Programmed cell death. WormBook. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.32.1>
- Cooper, J.F., Van Raamsdonk, J.M., 2018. Modeling Parkinson’s Disease in *C. elegans*. *J. Park. Dis.* 8, 17–32. <https://doi.org/10.3233/JPD-171258>
- Corsi, A.K., Wightman, B., Chalfie, M., 2015. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. WormBook 1–31. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.177.1>
- Cullinane, P.W., Wrigley, S., Parnera, J.B., Valerio, F., Millner, T.O., Shaw, K., Pablo-Fernandez, E.D., Warner, T.T., Jaunmuktane, Z., 2024. Pathology of

- neurodegenerative disease for the general neurologist. *Pract. Neurol.* 24, 188–199. <https://doi.org/10.1136/pn-2023-003988>
- Dugger, B.N., Dickson, D.W., 2017. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9, a028035. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035>
- Durbin, R.M., 1987. Studies on the development and organisation of the nervous system of *Caenorhabditis elegans* (Doctoral dissertation). University of Cambridge.
- GBD 2016 Neurology Collaborators, 2019. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 18, 459–480. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30499-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30499-X)
- Gonzales-Moreno, C., Fernandez-Hubeid, L.E., Holgado, A., Virgolini, M.B., 2023. Low-dose N-acetyl cysteine prevents paraquat-induced mortality in *Caenorhabditis elegans*. *MicroPublication Biol.* <https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000815>
- Guo, T., Zhang, D., Zeng, Y., Huang, T.Y., Xu, H., Zhao, Y., 2020. Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer’s disease. *Mol. Neurodegener.* 15, 40. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00391-7>
- Hernández-Cruz, E.Y., Eugenio-Pérez, D., Ramírez-Magaña, K.J., Pedraza-Chaverri, J., 2023. Effects of Vegetal Extracts and Metabolites against Oxidative Stress and Associated Diseases: Studies in *Caenorhabditis elegans*. *ACS Omega* 8, 8936–8959. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07025>
- Hernandez-Zimbron, L.F., Luna-Muñoz, J., Mena, R., Vazquez-Ramirez, R., Kubli-Garfias, C., Cribbs, D.H., Manoutcharian, K., Gevorkian, G., 2012. Amyloid- β Peptide Binds to Cytochrome C Oxidase Subunit 1. *PLoS ONE* 7, e42344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042344>
- Hernando, G., Turani, O., Bouzat, C., 2019. *Caenorhabditis elegans* muscle Cys-loop receptors as novel targets of terpenoids with potential anthelmintic activity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007895. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007895>
- Herndon, L.A., Wolkow, C.A., Driscoll, M., Hall, D.H., 2017. Effects of Ageing on the Basic Biology and Anatomy of *C. elegans*, in: Olsen, A., Gill, M.S. (Eds.),

- Ageing: Lessons from *C. Elegans*. Springer International Publishing, Cham, pp. 9–39. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44703-2_2
- Huang, Z., Ma, L., Mishra, A., Turnbull, J.E., Tu, H., 2022. Editorial: *C. elegans* as an emerging model of pharmacological innovation. *Front. Pharmacol.* 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1029752>
- Jeayeng, S., Thongsroy, J., Chuaijit, S., 2024. *Caenorhabditis elegans* as a Model to Study Aging and Photoaging. *Biomolecules* 14, 1235. <https://doi.org/10.3390/biom14101235>
- Kiontke, K., 2006. Ecology of *Caenorhabditis* species. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.37.1>
- Klann, I.P., Martini, F., Rosa, S.G., Nogueira, C.W., 2020. Ebselen reversed peripheral oxidative stress induced by a mouse model of sporadic Alzheimer's disease. *Mol. Biol. Rep.* 47, 2205–2215. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05326-5>
- Korábečný, J., Soukup, O., Vališ, M., 2020. Alzheimerova nemoc: patofyziologie, klinika, farmakoterapie, Jessenius. Maxdorf, Praha.
- Lamprey, R.N.L., Chaulagain, B., Trivedi, R., Gothwal, A., Layek, B., Singh, J., 2022. A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23031851>
- Lee, E.-G., Chen, S., Leong, L., Tulloch, J., Yu, C.-E., 2021. TOMM40 RNA Transcription in Alzheimer's Disease Brain and Its Implication in Mitochondrial Dysfunction. *Genes* 12, 871. <https://doi.org/10.3390/genes12060871>
- Lin, J., Yu, J., Wang, X., Shi, R., Liang, Y., Li, J., Zhou, T., Chen, C., Duan, X., Deng, Y., Yang, S., Zeng, S., Shen, X., Chen, X., Wang, Y., Sun, G., Shu, Z., 2025. Research progress on the anti-aging effect of polysaccharides of traditional Chinese medicine: Using *Caenorhabditis elegans* as an animal model. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 39, e70454. <https://doi.org/10.1096/fj.202403250RR>
- Lints, R., Hall, D. H., 2009. Male introduction. *WormAtlas*. <https://doi.org/10.3908/WORMATLAS.2.1>
- Liu, C.-C., Kanekiyo, T., Xu, H., Bu, G., 2013. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 106–118. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.263>

- Magistrelli, L., Contaldi, E., Comi, C., 2021. The Impact of SNCA Variations and Its Product Alpha-Synuclein on Non-Motor Features of Parkinson's Disease. *Life* 11, 804. <https://doi.org/10.3390/life11080804>
- McIntyre, G., Wright, J., Wong, H.T., Lamendella, R., Chan, J., 2021. Effects of FUDR on gene expression in the *C. elegans* bacterial diet OP50. *BMC Res. Notes* 14, 207. <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05624-6>
- Misrani, A., Tabassum, S., Yang, L., 2021. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* 13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.617588>
- Müller, B., Grossniklaus, U., 2010. Model organisms — A historical perspective. *J. Proteomics, Model organism proteomics* 73, 2054–2063. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.08.002>
- Müller, U.C., Zheng, H., 2012. Physiological Functions of APP Family Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006288. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006288>
- Munguía, B., Saldaña, J., Nieves, M., Melian, M.E., Ferrer, M., Teixeira, R., Porcal, W., Manta, E., Domínguez, L., 2022. Sensitivity of *Haemonchus contortus* to anthelmintics using different in vitro screening assays: a comparative study. *Parasit. Vectors* 15, 129. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05253-3>
- Nguyễn, T.K., 2024. Optimization of High-throughput Screening Methods on Nematodes (Bachelor's thesis).
- Nigon, V.M., Félix, M.-A., 2017. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. *WormBook* 1–84. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.181.1>
- Nuytemans, K., Theuns, J., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., 2010. Genetic Etiology of Parkinson Disease Associated with Mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 Genes: A Mutation Update. *Hum. Mutat.* 31, 763–780. <https://doi.org/10.1002/humu.21277>
- O'Reilly, L.P., Luke, C.J., Perlmutter, D.H., Silverman, G.A., Pak, S.C., 2014. *C. elegans* in high-throughput drug discovery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 0, 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.001>
- Pereira, I., Lopez-Martinez, M.J., Samitier, J., 2023. Advances in current in vitro models on neurodegenerative diseases. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 11, 1260397. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1260397>

- Peterson, N.D., Pukkila-Worley, R., 2018. *C. elegans* in high-throughput screens for anti-infective compounds. *Curr. Opin. Immunol.* 54, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.06.003>
- PhylumTech, n.d. WMicrotracker ONE [WWW Document]. PhylumTech. URL <https://www.phylumtech.com/home/en/wmicrotracker-one-eng/> (accessed 5.5.2025)
- Pires-daSilva, A., 2007. Evolution of the control of sexual identity in nematodes. *Semin. Cell Dev. Biol., Signal Transduction in the Myometrium* 18, 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2006.11.014>
- Przedborski, S., Vila, M., Jackson-Lewis, V., 2003a. Series Introduction: Neurodegeneration: What is it and where are we? *J. Clin. Invest.* 111, 3. <https://doi.org/10.1172/JCI17522>
- Purice, M.D., Lago-Baldaia, I., Fernandes, V.M., Singhvi, A., 2025. Molecular profiling of invertebrate glia. *Glia* 73, 632–656. <https://doi.org/10.1002/glia.24623>
- Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., Priess, J.R., 1997. Anatomy, in: *C. Elegans II*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rooney, J., Luz, A., González-Hunt, C., Bodhicharla, R., Ryde, I., Anbalagan, C., Meyer, J., 2014. Effects of 5'-Fluoro-2-deoxyuridine on Mitochondrial Biology in *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.* 0, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.021>
- Rostagno, A.A., 2022. Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 107. <https://doi.org/10.3390/ijms24010107>
- Rui, Q., Ni, H., Li, D., Gao, R., Chen, G., 2018. The Role of LRRK2 in Neurodegeneration of Parkinson Disease. *Curr. Neuropharmacol.* 16, 1348–1357. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180222165418>
- Salminen, A., Kaarniranta, K., Kauppinen, A., Ojala, J., Haapasalo, A., Soininen, H., Hiltunen, M., 2013. Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The potential role of Beclin 1 interactome. *Prog. Neurobiol.* 106–107, 33–54. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.06.002>
- Scheltens, P., Strooper, B.D., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C.E., Cummings, J., Flier, W.M. van der, 2021. Alzheimer's disease. *Lancet Lond. Engl.* 397, 1577. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)

- Sepúlveda-Crespo, D., Reguera, R.M., Rojo-Vázquez, F., Balaña-Fouce, R., Martínez-Valladares, M., 2020. Drug discovery technologies: *Caenorhabditis elegans* as a model for anthelmintic therapeutics. *Med. Res. Rev.* 40, 1715–1753. <https://doi.org/10.1002/med.21668>
- Sheppard, O., Coleman, M., 2020. Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis, in: Huang, X. (Ed.), *Alzheimer's Disease: Drug Discovery*. Exon Publications, Brisbane (AU).
- Silva, C.F.M., Guerrinha, A.P.D. de M.S., Carvalho, S., Pinto, D.C.G.A., Silva, A.M.S., 2025. 1,3,5-Triazine: A Promising Molecular Scaffold for Novel Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 26, 882. <https://doi.org/10.3390/ijms26030882>
- Slanzi, A., Iannoto, G., Rossi, B., Zenaro, E., Constantin, G., 2020. In vitro Models of Neurodegenerative Diseases. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 328. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00328>
- Stefanello, S.T., Gubert, P., Puntel, B., Mizdal, C.R., Campos, M.M.A. de, Salman, S.M., Dornelles, L., Avila, D.S., Aschner, M., Soares, F.A.A., 2015. Protective effects of novel organic selenium compounds against oxidative stress in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol. Rep.* 2, 961–967. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.06.010>
- Stevens, L., Félix, M., Beltran, T., Braendle, C., Caurcel, C., Fausett, S., Fitch, D., Frézal, L., Gosse, C., Kaur, T., Kiontke, K., Newton, M.D., Noble, L.M., Richaud, A., Rockman, M.V., Sudhaus, W., Blaxter, M., 2019. Comparative genomics of 10 new *Caenorhabditis* species. *Evol. Lett.* 3, 217–236. <https://doi.org/10.1002/evl3.110>
- Sun, Y.U., 2023. A *Caenorhabditis elegans* infrared-based motility assay for anthelmintic drug discovery. UC San Diego.
- Tekieli, T., Yemini, E., Nejatbakhsh, A., Varol, E., Fernandez, R.W., Masoudi, N., Paninski, L., Hobert, O., 2021. Visualizing the organization and differentiation of the male-specific nervous system of *C. elegans*. <https://doi.org/10.1101/2021.04.06.438718>
- Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., Nair, M., 2019. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int. J. Nanomedicine* 14, 5541. <https://doi.org/10.2147/IJN.S200490>
- Watts, G., 2006. Work on RNA interference brings Nobel triumph. *BMJ* 333, 717.

- Wu, Y., Chen, Y., Yu, X., Zhang, M., Li, Z., 2023. Towards Understanding Neurodegenerative Diseases: Insights from *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 443. <https://doi.org/10.3390/ijms25010443>
- Yasuda, K., 2025. The usefulness of *Caenorhabditis elegans* lifespan analysis in screening for functional foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 89, 319–323. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbae178>
- Zevian, S.C., Yanowitz, J.L., 2014. Methodological Considerations for Heat Shock of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Methods San Diego Calif* 68, 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.04.015>
- Zhang, B., Xiao, R., Ronan, E.A., He, Y., Hsu, A.-L., Liu, J., Xu, X.Z.S., 2015. Environmental temperature differentially modulates *C. elegans* longevity through a thermosensitive TRP channel. *Cell Rep.* 11, 1414–1424. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.066>
- Zhang, Jifa, Zhang, Y., Wang, J., Xia, Y., Zhang, Jiaxian, Chen, L., 2024a. Recent advances in Alzheimer's disease: mechanisms, clinical trials and new drug development strategies. *Signal Transduct. Target. Ther.* 9, 1–35. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01911-3>
- Zhang, Jifa, Zhang, Y., Wang, J., Xia, Y., Zhang, Jiaxian, Chen, L., 2024b. Recent advances in Alzheimer's disease: mechanisms, clinical trials and new drug development strategies. *Signal Transduct. Target. Ther.* 9, 1–35. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01911-3>
- Zhang, S., Li, F., Zhou, T., Wang, G., Li, Z., 2020. *Caenorhabditis elegans* as a Useful Model for Studying Aging Mutations. *Front. Endocrinol.* 11, 554994. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.554994>
- Zhou, W., Xu, R., 2023. Current insights in the molecular genetic pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Neurosci.* 17. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1189470>