



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Biologická aktivita látek fenyipropanoidního typu v hlísticích

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Romana Hendrychová
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Alena Kadlecová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2023

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Romana Hendrychová
Název práce	Biologická aktivita látek fenyylpropanoidního typu v hlísticích
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra experimentální biologie
Vedoucí práce	Mgr. Alena Kadlecová, Ph.D.
Rok obhajoby	2023

Abstrakt

Fytopatogenní hád'átka jsou rozšířenou skupinou parazitů zemědělsky významných plodin. Existuje řada strategií kontroly těchto škůdců. Pro kontrolu bývají často používány i chemické nematicidy, avšak tyto látky mohou mít negativní dopad na zdraví zvířat i lidí, ale také na životní prostředí. Je proto třeba hledat nové, bezpečnější látky. Slibnou skupinou jsou přírodní sloučeniny fenyylpropanoidního typu. Cílem této diplomové práce bylo zkoumat nematicidní aktivitu látek fenyylpropanoidního typu a vyvinout nové experimentální postupy pro testování látek na fytopatogenním hád'átku *Ditylenchus destructor*. V neposlední řadě byla testována předběžná cytotoxická aktivita připraveného lignanu na několika nerakovinových buněčných liniích.

Klíčová slova	<i>Ditylenchus destructor</i> , nematicidní aktivita, vysokokapacitní screening, fenyylpropanoidy
Počet stran	81
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Romana Hendrychová
Title of thesis	Biological properties of cyclophenyl lactones: Influence of the phenylsulfone group
Type of thesis	Master
Department	Department of the Experimental Biology
Supervisor	Mgr. Alena Kadlecová, Ph.D.
The year of presentation	2023

Abstract

Phytopathogenic nematodes are a widespread group of parasites of agriculturally important plants. Several strategies have been developed to prevent infestations. One of them is the use of chemical nematicides, but they can have negative impacts on both animal and human health, as well as on the environment. There is an urgent need to look for new, safer alternatives. Natural phenylpropanoid-type compounds seem to be especially promising. The aim of this thesis was to investigate the nematicidal activity of phenylpropanoid-type compounds and to develop new experimental procedures suitable for testing compounds on the phytopathogenic nematode *Ditylenchus destructor*. Finally, the preliminary cytotoxic activity of the prepared lignan was tested on several non-cancerous cell lines.

Keywords	<i>Ditylenchus destructor</i> , nematicidal activity, high-throughput screening, phenylpropanoids
Number of pages	81
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci dne

Podpis

Poděkování

Zejména bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce, Mgr. Aleně Kadlecové, Ph.D., za cenné rady, ochotu, trpělivost a čas, který mi věnovala během zpracování této závěrečné práce. Zároveň bych také chtěla poděkovat mému konzultantovi doc. RNDr. Jiřímu Pospíšilovi za cenné připomínky týkající se chemické syntézy, avšak také i celému jeho výzkumnému týmu za syntézu fenylypropanoidních sloučenin, a to hlavně Mgr. Danielu Chrenkovi za spoustu hodnotných rad a asistenci při chemické syntéze. Dále mé poděkování patří i Kateřině Fakové za vedení cytotoxického testování na buněčných liniích a Tomášovi Jirsovi za ochotu a praktické rady.

Obsah

Seznam zkratk.....	8
1 Úvod a cíle práce	9
3 Teoretická část.....	11
3.1 Hlístice	11
2.1.1 Patogenní hlístice rostlin	13
2.2 Nematicidy na chemické bázi	19
2.2.1 Seznam používaných nematicidních strategií v ČR.....	20
2.3 Fenylypropanoidní deriváty a jejich nematicidní účinky.....	22
2.4 Vysokokapacitní screening látek na hlísticích	27
2.5 Screeniny fenylypropanoidů na <i>C. elegans</i> – chitinasové testování	30
3 Experimentální část	32
3.1 Použité přístroje	32
3.2 Testované sloučeniny	32
3.3 Biologický materiál	33
3.4 Chemikálie	33
3.4.1 Roztoky pro vizualizaci na tenkovrstvé chromatografii (TLC)	34
3.5 Pufry a média	34
3.6 Metodika	38
3.6.1 Chemická syntéza	38
3.6.2 <i>C. elegans</i> – údržba, kultivace a hodnocení anthelmické aktivity	40
3.6.3 Údržba a pěstování hád'átka <i>B. mucornatus</i>	42
3.6.4 <i>D. destructor</i> – Údržba, kultivace, hodnocení anthelmické aktivity a chemotaktické testování	43
3.6.5 Cytotoxické testování	47

4	Výsledky a diskuse	49
4.1	Organická syntéza	49
4.2	Anthelmintická a nematicidní aktivita	49
4.2.1	Hodnocení mobility hád'átek pomocí wMT	49
4.2.2	Chitinasové screeniny	54
4.2.3	Chemotaktické testování za využití červů <i>D. destructor</i>	64
4.3	Cytotoxická aktivita	67
4.3.1	Stanovení hodnoty IC ₅₀ u látky L-32 na buněčných liniích resazurivoným testováním.....	67
5	Závěr	69
6	Literatura	70

Seznam zkratek

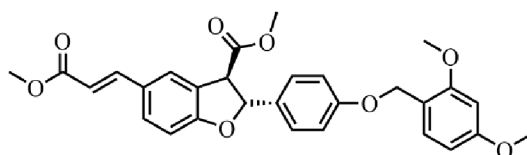
CI	Chemotaktický index
CMA	Kukuřičný agar
ČR	Česká republika
d	Dublet
dd	Dublet dublet
dH ₂ O	Destilovaná voda
DMSO	Dimethylsulfoxid
HTS	Vysokokapacitní screening
equiv	Ekvivalent
EtOH	Ethanol
IC ₅₀	Polovina maximální inhibiční koncentrace
<i>J</i>	Štěpící konstanta
<i>J</i> _{1/} <i>J</i> _{2/} <i>J</i> _{3/} <i>J</i> ₄	První/druhé/třetí/čtvrté larvální stádium fytopatogenní hlístice
<i>L</i> _{1/} <i>L</i> _{2/} <i>L</i> _{3/} <i>L</i> ₄	První/druhé/třetí/čtvrté larvální stádium <i>Caenorhabditis elegans</i>
LC	Kapalinová chromatografie
m	Multiplet
MS	Hmotnostní spektrometrie
NGM	Médium pro růst <i>Caenorhabditis elegans</i> (nematode growth medium)
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PDMS	Polydimethylsiloxan
PPN	Fytopatogenní hlístice
RFU	Relativní jednotka fluorescence
RVO	Rotační vakuová odparka
RT	Laboratorní teplota
s	Singlet
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
wMT	wMicroTracker

1 Úvod a cíle práce

Parazitické hlístice představují hrozbou pro lidi, zvířata i rostliny. Fytopatogenní hád'átka jsou navzdory svému významu často přehlížena. Jedná se o klíčovou, globálně rozšířenou skupinou škůdců zemědělsky významných plodin. Jedním z těchto parazitů je migrující endoparazitické hád'átko *Ditylenchus destructor*, jež se vyskytuje převážně v mírném pásmu. Jedná se o vysoce závažného škůdce bramborových a batátových hlíz, který parazituje dokonce na 70 různých hostitelských vyšších rostlinách.¹⁻³

Existuje řada strategií, které brání zamoření. Jednou z nich je použití chemických nematicidů. Valnou nevýhodou je, že existující prostředky mohou mají často negativní dopad na zdraví zvířat i lidí, ale také na životní prostředí. Proto se používání řady z nich v posledních letech buď zakázalo anebo významně omezilo.⁴ Jedním z potenciálních řešení tohoto problému by mohlo být použití přírodních sloučenin fenylypropanoidního typu s nematicidním účinkem. Tyto látky jsou sekundárními rostlinnými metabolity, které umožňují rostlině reagovat na abiotické i biotické faktory.^{5,6} U řady z nich byla popsána jejich nematicidní aktivita na fytopatogenních hád'átkách. Potenciální aplikace těchto fenylypropanoidů v praxi by mohla pomoc snížit negativní dopad konvenčních syntetických nematicidů na životní prostředí.

Výzkumná skupina doc. RNDr. Jiřího Pospíšila, Ph.D. se zabývá chemickou syntézou derivátů lignanů a neolignanů. Připravují rozmanitě orientovanou syntézou chemickou knihovnu sloučenin, která vychází ze základní kostry cyklopropylfenylsulfonfyl laknonu. Připravené sloučeniny jsou předávány do laboratoře Mgr. Aleny Kadlecové, Ph.D., kde dochází k otestování jejich anthelmintické/nematicidní aktivity. Během pravidelných screeningů fenylypropanoidů na hád'átkách *Caenorhabditis elegans* za využití chitinasových testů, bylo zjištěno, že látka L-32 (Obrázek 1) vykazovala slibnou aktivitu proti testovaným červům. Toto zjištění vedlo k vytvoření nového projektu, kterým se zabývám ve své diplomovou práci.



Obrázek 1: Strukturální vzorec látky L-32.

V této závěrečné práci je v rámci literární rešerše diskutována problematika fytopatogenních hlístic a vlivu fenylpropanoidních přírodních látek na hád'átka. Cílem práce bylo zkoumat nematocidní aktivitu látek fenylpropanoidního typu, a to zejména u sloučeniny L-32. Dalším cílem bylo vyvinout nové experimentální postupy vhodné pro testování látek (přírodního) původu na fytopatogenní hlístici *Ditylenchus destructor*. V neposlední řadě byla testována předběžná cytotoxická aktivita sloučeniny L-32 na několika nerakovinových buněčných liniích.

3 Teoretická část

Rešerše se zpočátku orientuje na popis kmene hlístic s důrazem na obecně nejnebezpečnější fytopatogenní hád'átka, ale i na červa *Ditylenchus destructor*. Následně se věnuje syntetickým nematicidům a používaným nematicidním strategiím v České republice. Také se zaměřuje na aktivní účinky derivátů šikimátové dráhy, a to hlavně lignanů a neolignanů, proti rostlinným parazitickým hád'átkům. A v neposlední řadě teoretická část popisuje dostupné metody pro screening chemických sloučenin s potenciálními nematicidními účinky proti hád'átkům.

3.1 Hlístice

Kmen Hlístice (lat. *Nematoda*) se vyznačuje svou diverzitou, komplexností i biologickou specifitou.⁷ Jedná se o mnohobuněčné nesegmentované organismy, jejichž anatomie na první pohled působí velmi jednoduše, avšak jejich morfologie je dosti různorodá.^{7,8} Tito červovití bilaterálně symetriční živočichové s pseudocoelomovou dutinou dosahují délky v rozmezí od 0,1 mm do několika metrů.^{8,9} Běžně platí, že jejich tělo je úzkého, protáhlého a zároveň válcovitého tvaru.^{8,10} Kutikula, která je produkována pokožkou, pokrývá vnější povrch těla červů a také je příčinou zvýšené rozmanitosti jednotlivých taxonomických jednotek.^{11,12} Pokožka odděluje somatický sval od kutikuly, přičemž v určitých částech se objevuje zvýšený počet epidermálních buněk. Díky tomu vznikají čtyři hlavní podélné provazce, které umožňují připevnění svalů ke kutikule.¹² Hlístice obsahují svaly jenž zajišťují vlnivý pohyb a účastní se trávicích i reprodukčních procesů.¹³ Trávicí soustava je složena ze stomodea (dutinová ústní, hltan), střeva a proktodea (rektální otvor či kloaka).¹⁴ Obecně se u nich vyskytuje velmi primitivní vylučovací systém a kruhový nervový prsteneček. Oběhová a dýchací soustava nejsou vyvinuty a kyslík se v jejich těle distribuuje difúzí.^{8,9} Pohlavní soustava je trubcovitá. Existují hermafroditní, gonochoristické, ale i intersexuální druhy hlístic.¹⁵

Samooplodňující hermafroditismus se u dospělců *Caenorhabditis elegans* (Obrázek 2) objevuje v 99,8 % případů. Vzácněji se u tohoto druhu vyskytují samci, jejichž vznik je podmíněn nondisjunkcí chromozomu X.^{15,16} Hermafroditi i samci mají stejnou sadu autozomů, tj. pět autozomálních chromozomů. Jejich odlišnost spočívá v počtu chromozomů X (hermafrodit XX, samec XO).¹⁷ Hlavním genem pro určování pohlaví je gen *xol-1*, který je regulován poměrem pohlavních chromozomů vzhledem k sadám autozomů.^{17,18} *C. elegans*, stejně jako většina hlístic, po vylíhnutí z vajíčka prochází čtyřmi larválními stádii

(L_1-L_4) separovanými svlékáním kutikuly.^{10,16} Je jedním z nejnámějších háďátek a významným modelovým organismem, jenž přispěl k porozumění mnoha vývojových a buněčných procesů, interakcí eukaryotických buněk či interakcí mezi hostitelem a parazitem.¹⁷ Toto háďátko sehrálo klíčovou roli při objevu programované buněčné smrti a RNA interference, ale i při vývoji markeru genové exprese, a to zeleného fluorescenčního proteinu.¹⁰ Zároveň se jedná o první mnohobuněčný organismus, jehož genom byl plně sekvenován. Červi jsou volně žijící a jsou rozšířeni prakticky všude. Pro jejich izolaci lze využít hnojící rostlinný materiál s významným množstvím bakterií. V laboratorních podmínkách se chovají na agarových plotnách s obsahem bakterií *Escherichia coli* sloužící k potravě.¹⁷



Obrázek 2: Anatomie dospělého hermafrodita a vajíček *C. elegans* zachycená interferenční mikroskopií – Nomarského diferencíální interferenční kontrast (Internetový zdroj 1).

Stejně jako *C. elegans* jsou ostatní hlístice přítomny po celém světě např. v půdě, sladkovodních vodách, vyprahlých pouštích, ale dokonce i v hlubokomořských sedimentech a arktickém ledu. Některé druhy jsou ovšem parazitující.^{7,10} Parazitické hlístice zvířat jsou vysoce rozmanité. Způsobují infestace v řadě hostitelů, přes bezobratlé živočichy až po obratlovce, čímž mohou být příčinou velmi závažných chorob.^{19,20} Parazité hospodářských zvířat mohou negativně působit na jejich růst, chování, rozmnožování i fyziologii, což vede ke značným ekonomickým ztrátám.²⁰ Zhruba 60 druhů hlístic je schopno napadat člověka (Internetový zdroj 2). Nejvíce rozšířené jsou parazitické hlístice přenášené půdou, jež způsobují gastrointestinální infestace a dle odhadů Světové zdravotnické organizace (WHO) je jimi infikováno zhruba 1,5 miliardy lidí po celém světě. Jsou hojně rozšířené především v tropických a subtropických oblastech. Nejvíce ohroženi jsou lidé v ekonomicky slabších regionech s nedostatečnou infrastrukturou, která neumožní adekvátní inaktivaci parazitů, což vede k jejich snazšímu šíření. Gastrointestinální parazité způsobují především poruchy

vstřebávání živin, ztrátu chuti k jídlu, podvýživu, malátnost, slabost, anémii a hlavně u dětí mohou vést i k poruchám fyzického vývoje.²¹ Velký význam v medicíně má dále skupina onemocnění souhrnně zvaných filarióza, které způsobují parazitičtí červi *Filariae* (vlasovci), jež jsou hmyzem přenášeni na lidi. Parazité se usazují v mízních cévách, které blokují. Filarióza může mít za následek široké spektrum klinických projevů od asymptomatických po chronické.²² Může vést až ke slepotě i k deformaci končetin a orgánů.¹⁹ Mezi humánní léčivé přípravky proti hlístům patří: deriváty piperazinu, deriváty benzimidazolu, deriváty imidazothiazolu a makrocyclické laktony. Farmaceutický průmysl se potýká se vznikající rezistencí kmenů hlístic na anthelmintika, čímž se ztrácí účinnost mnoha léčebných postupů.^{23,24}

Boji proti parazitárním hlísticím se nevyhnul ani zemědělský průmysl.²³ Některé druhy parazitických hlístic jsou fytopatogenní a negativně ovlivňují zemědělskou produktivitu tím, že snižují výnosnost pěstovaných plodin, ovoce a zeleniny.^{19,25} Bohužel výčet aktivních látek proti fytopatogenním hlísticím (PPN) není neomezený stejně jako u veterinární a humánní medicíny.²³

2.1.1 Patogenní hlístice rostlin

Genomické studie naznačují, že parasitismus na rostlinách se v evoluci hlístic vyvinul několikrát nezávisle na sobě. To vedlo ke značné variabilitě v interakcích mezi PPN a jejich hostiteli.²⁶ PPN jsou klíčovou skupinou škůdců na zemědělsky významných plodinách.²⁵ Jejich nepříznivý dopad v zemědělském průmyslu se zejména týká kukuřice, rýže, obilí, cukrové třtiny, brambor, sójových bobů aj.^{25,27} PPN způsobily ztráty na produkci okolo 358 miliard dolarů v období od roku 2010 do 2013.²⁶ Roční celosvětové škody lze stěží vyčíslit, avšak pohybují se v rozmezí od 80 miliard do 157 miliard dolarů ročně, z toho ve Spojených státech sahají do výše 10 miliard dolarů.²⁸ Nicméně tato data budou patrně podhodnocená, z důvodu nevědomosti o PPN hlavně v zemích třetího světa.²⁹

Jedná se o velmi zákeřné škůdce, kteří disponují řadou mechanismů, díky kterým odolávají dosavadním strategiím kontroly. Některé druhy mohou například přecházet do klidových stádií, ve kterých jsou schopni přečkat nepříznivé podmínky, nedostatek potravy, ale i lépe odolávat chemickým pesticidům, a to po dobu několika měsíců i let. Zatímco někteří červi napadají úzké spektrum hostitelů, jiní infikují i stovky různých druhů plodin, které se mohou lišit, dokonce i v rodu. U zmíněného druhého případu pak ztrácí na efektivitě i jindy vysoce efektivní strategie kontroly (rotace a pravidelné střídání plodin na polích),

čímž je kontrola hlístic značně ztížena. PPN lze rozdělit na endoparazity vyskytující se po většinu času v hlízách, kořenech či cibulích a na volně žijící hlístice obývající především půdy, které parazitují na kořenech. PPN jsou převážně ektoparaziti, jež jsou zastupováni několika tisíci druhy.²⁷ Co se týče endoparazitů, ti se dále rozlišují na migratorní a sedenterní podle usazování/neusazování červů v pletivech rostliny.³⁰ Většina ekonomicky relevantních PPN se řadí mezi endoparazity.²⁹

Endoparazitičtí červi přímo infikují plodiny, ale také ulehčují napadení jinými patogeny (houby, bakterie aj.) anebo působí jako virové vektory.²⁷ Infekcí dochází k vyvolání biotického stresu a poklesu produktivity a výnosu rostlin.²⁵ Rostliny v raných stádiích nákazy po rozpoznání parazitujících hlístic produkují reaktivní kyslíkaté i dusíkaté radikály a také toxické sekundární metabolity (např. fytoalexiny), čímž dochází ke vzniku oxidativního stresu u hlístic. Radikály (tj. H_2O_2 , NO) také fungují jako signální molekuly spouštějící další obranné buněčné pochody. V konečné fázi nastává oxidativní vzplanutí. U řady PPN byly popsány adaptované reakce proti imunitní odpovědi rostlin, při které se snaží zmírnit poškození rostlinných buněk, aby mohly dlouhodobě na hostiteli cizopasit.³¹

Úplná devastace plodin po infekci PPN není častá, může však nastat při rozsáhlé infekci nebo například po zavlečení nepůvodního druhu na nové území, kdy hostitelské rostliny nemají vůči danému parazitovi vyvinutou rezistenci/toleranci. PPN se však typicky podílí na buněčné smrti, nekróze, chorobných stavech rostlinných pletiv, pozastavení růstu, opadu listů, vytváření skvrn i poškození kořenového orgánu.^{25,27} Při poruchách kořenových funkcí dochází k narušení příjmu esenciálních živin, kvůli čemuž se projevují symptomy nutričního stresu i sucha, což může komplikovat diagnostiku.²⁷ Mylné rozpoznání choroby může mít za následek použití nekompetentních i nerozlišujících pesticidů.²⁸ Mezi faktory, které ovlivňují míru patogenity PPN patří věk i druh hostitele, prahová hustota osídlení či půdní, klimatické a environmentální podmínky.²⁷

Podobnost u jednotlivých PPN lze nalézt v morfologii, ale i v biochemických reakcích. Ke společným rysům náleží silná vrstva kutikuly, malá velikost těla, zvýšená odolnost vůči oxidativnímu stresu, tvorba nespecifických symptomů v hostiteli a také některé metabolické procesy tuků.^{29,31} Velikost jejich genomů se pohybuje v rozmezí od 50 do 100 Mb. U některých PPN se mohou objevovat různé násobky ploidii.²⁶

2.1.1.1 Souhrn globálně nejškodlivějších PPN

K PPN bylo zařazeno přes 4100 druhů hlístic a jejich počet se kvůli novým objevům

neustále zvyšuje.^{26,27,32} Valná většina nejagresivnějších druhů PPN je biotrofní. Pro hospodářské a vědecké působení byl sestaven list deseti nejvýznamnějších PPN do nějž patří: hálkotvorná hád'átka (rod *Meloidogyne*); cytotvorná hád'átka (rody *Heterodera* a *Globodera*); rod *Pratylenchus*; *Radopholus similis*; *Ditylenchus dipsaci*; *Bursaphelenchus xylophilus*; *Rotylenchulus reniformis*; *Xiphinema index*; *Nacobbus aberrans* a také *Aphelenchoides besseyi*.²⁹

Rod *Meloidogyne* představuje nejzávažnější skupinu PPN, jejíž zástupci způsobují největší finanční ztráty. Jsou rozšířeny téměř do všech koutů světa. V daném rodě bylo objeveno 98 druhů,²⁹ z nichž čtyři jsou považovány za nejvýznačnější (*Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne incognita* a *Meloidogyne javanica*).^{33,34} Jedná se o obligátní biotrofní endoparazity kořenů.²⁹ Hostitelem je téměř jakákoliv cévnatá rostlina,³⁵ což představuje zhruba 5500 odlišných druhů rostlin.²⁵ *Meloidogyne* jsou zodpovědné za vytvoření hálek či „root-knots“ na kořenech plodiny, které brzdí růst, příjem živin a vody, ale i kvalitativní a kvantitativní výnosnost.^{25,35,36} Způsobují i zvýšený opad listů, nižší objem zakořenění, vadnutí a výskyt skvrn.^{25,29} Příznaky napadení *Meloidogyne* mohou být snadno zaměnitelné s poškozením kořenového systému rostlin.³⁵ Jednotlivé druhy hád'átek způsobují na různých plodinách odlišné závažnosti škod. Avšak poškození také závisí na hostiteli, sezoně i typu půdy.³⁵ Životní cyklus trvá 20-40 dní.²⁵ Většina druhů se rozmnožuje partenogenezi.²⁹ Samice uschovávají vajíčka v želatinových obalech. Po vylíhnutí larvy migrují ke kořenové špičce a směřují až k vaskulárnímu válci, kde po vyloučení sekretů endoreduplikací pozměňují normální rostlinné buňky v tzv. „buňky obří“, z nichž vysávají živiny. V nastávající fázích života až do vývinu v dospělce se stávají sedantními.^{25,33,37} Když už se v populaci za nepříznivých podmínek vytvoří samci, tak ti opouštějí kořen, kdežto samice v infekčním místě zůstávají a produkují další populace hád'átek.²⁹ Globálně za nejškodlivějšího parazita toho rodu je považován *M. incognita*.³⁶

Rody *Heterodera* i *Globodera* jsou známy jako obligátní endoparaziti infikující širší spektrum rostlin.^{38,39} Některé jejich druhy jsou omezeny pouze na několik málo hostitelů, kdežto jiné parazitují i na stovkách plodin, jejichž rozsah však nepřesahuje množství hostitelů u *M. incognita*.^{39,40} Například nejčastějším hostitelem *Heterodera glycines* je sója,⁴⁰ pro *Heterodera tabacum* tabák, pro *Globodera rostochiensis* naopak brambory, rajčata i lilek³⁹ a *Heterodera avenae* nejhojněji parazituje na obilninách, a to pšenici, ovsu a žitě. Cystotvorná hád'átka jsou rozšířená globálně, například na evropském kontinentu představují závažné potíže *H. avenae*.⁴⁰ Jejich životní cyklus je podobný jako u výše zmíněných sedantních hád'átek rodu *Meloidogyne* avšak liší se tím, že po vstupu druhého

larválního stádia (J_2) háďátek do kořene plodiny se netvoří „obří buňky“ sloužící k potravě, ale je indukována tvorba syncytia. Živná struktura syncytium, jenž je složená z vícero buněk, vzniká procesem částečného rozpuštění buněčné stěny, počínaje plasmodesmaty. Protoplasty okolních buněk se poté spojí a vytvoří se syncytium. Opakováním tohoto procesu se do syncytia přidávají další buňky.^{38,40} Dále se od *Meloidogyne* odlišují tím, že po oplodnění samice dochází ke vzniku cyst ze samičí kutikuly obsahující zhruba 500 vajíček. Cysty chrání vajíčka proti nepříznivým podmínkám, zároveň vajíčkům umožňují zůstat latentní řadu let, proto je jejich kontrola problematická.⁴⁰

Další skupinou, která nepříznivě ovlivňuje hospodářsky výnosné plodiny, je rod *Pratylenchus*. Tito pohybliví endoparaziti napadají kořeny hospodářsky významných plodin (mj. pšenice, cukrové třtiny, luštěniny, zeleniny, ovoce), čímž omezují distribuci živin v hostiteli.^{41–43} Rod je rozšířen globálně a zhruba 97 druhů je taxonomicky přisuzováno k tomuto rodu.⁴³ Často může docházet ke koinfekci patogenními bakteriemi či půdními houbami. Mezi další nežádoucí účinky parazitismu háďátek se řadí tvorba lézí kořenového orgánu a nekrózy.^{29,44} Mezi hospodářsky nejvýznamnější druhy patří háďátka *Pratylenchus thornei* a *Pratylenchus prohibitus*, která mají devastující efekt převážně na obilniny, ovšem infekci s mírnějším průběhem mohou způsobit i jiné druhy, např. *Pratylenchus penetrans*.⁴³

Mezi další silně agresivní endoparazity se řadí *Radopholus similis*. Primárně je usídlen v subtropickém a tropickém pásmu, bohužel byl také zavlečen do evropských skleníků.⁴⁵ Uvádí se, že tento patogen napadá 350 druhů rostlin, ne-li více.⁴⁶ Škodí zejména v kořenech citrusových stromů, pepřovníku černém, a dále pak v banánovnicích. *R. similis* způsobuje v banánovém průmyslu výrazný ekonomický propad.⁴⁵ Patologické jevy se u jednotlivých druhů rostlin odlišují. Tento červ způsobuje devastaci rostlinných buněk u široké škály hostitelů (přes tvorbu lézí a až po hnilobu kořenového systému).⁴⁶

Migrující endoparazit *Bursaphelenchus xylophilus* má původní stanoviště v Severní Americe, kde si na něj jehličnany, na kterých parazituje, vytvořily resistenci či toleranci. Nicméně byl dopraven do Japonska a následně rozšířen po celé Asii, kde jeho účinky byly naprosto ničující.⁴⁷ Ve srovnání s jinými PPN má *B. xylophilus* rozdílný styl parazitismu. Háďátka se živí jak z hub, tak i z umírajících či živých stromů, na které jsou přenášeni hmyzem během kladení vajíček.⁴⁸

V Indii bylo prokázáno, že semiendoparazitický nepohyblivý *Rotylenchulus reniformis* se dělí na dvě skupiny – A a B. Varianta *R. reniformis* A vzniká pohlavním křížením dvou jedinců, kteří se rozmnožují ve vigně či bavlně. V dalších studiích byla mikrosatelitními markery prokázána existence nové populace, a to partenogenetické.²⁹ *R.*

reniformis přebývá převážně v tropech a subtropích, ale byl nalezen i v mírném podnebném pásmu. Infikuje více než 314 druhů *Plantae*.⁴⁹ Typickou nákazu lze nalézt na bavlnících, u nichž snižuje výnosnost okolo 50 %. Tento patogen může být příčinou zmenšení růstu plodin, devastace kořenů až dokonce úhynu celé rostliny.⁵⁰

Ektoparazitické háďátko *Xiphinema index* je nejen parazitem kořenů vinné révy, ale zároveň se jedná i o vektor viru listů vinné révy. Způsobuje obrovské problémy na plantážích pěstující vinnou révu v Chile, kde jeho zastoupení v místních půdách činí okolo 48 %. Ošetření půd spočívá v aplikaci nematicidů – karbamátů a organofosfátů, avšak s nižší účinností.⁵¹ Přítomnost *X. index* je přetrvávajícím problémem i na Blízkém východě a v Evropě. Bylo zjištěno, že *X. index* se převážně rozmnožuje partenogenezí, avšak v menším měřítku i sexuálně.⁵²

Nacobbus aberrans lze snadno zaměnit za háďátka z rodu *Meloidogyne*, protože také v kořenovém systému vyvolávají tvorbu hálek.⁵³ Tito červi obývají obzvláště severní a jižní americký kontinent. Škála hostitelských rostlin a stavba těla *N. aberrans* se liší v závislosti na oblastech výskytu háďátek.⁵⁴

Háďátko *Aphelenchoides besseyi* je považováno za závažného škůdce rýže. Infestace se projevuje typickým zbarvením horních částí listů doběla. Dochází tak k nekróze, deformaci listu, omezení růstu i kvetení. *A. besseyi* se vyskytuje i ve formě endoparazitické zodpovědné za léze na listech u fíkovníku pryžodárném a tuberózy hlíznaté.⁵⁵

Rod *Ditylenchus* se chlubí více než 60 druhy, z nichž pouze menšina infikuje vyšší rostliny.⁵⁶ Například *Ditylenchus africanus* napadá převážně podzemnici olejnou, *Ditylenchus angustus* zase rýži setou a *Ditylenchus destructor*, jemuž bude věnována celá kapitola 2.1.1.2, parazituje hlavně na bramborách a pak dále i na mrkvi nebo cibulích kosatce.⁵⁷ Valná část druhů je však mykofágní.⁵⁶ Za nejvýznamnějšího parazita z tohoto rodu je ale možné považovat *D. dipsaci*, který se v žebříčku deseti globálně nejinvazivnějších PPN umístil na pátém místě.²⁹ Jeho agresivita spočívá v mimořádně širokém rozsahu hostitelů, jenž přesahuje 500 odlišných druhů rostlin jako např. oves, hrách, česnek, brambory, jahody, tabák, různé druhy plevelu, např. rozrazil rolní aj.⁵⁷ Dalším důležitým faktorem agresivity je vyjma škod, které parazit zapříčiňuje, i odolnost vůči nepříznivým klimatickým podmínkám – teplotám pod nulou, teplotám okolo 50 °C, ale i extrémnímu suchu.^{29,56,58} Obligátní endoparazit *D. dipsaci* pojidající parenchymatické pletivo stonků a cibulí je rozšířen v oblastech mírného pásma.⁵⁶ Bylo popsáno, že tato hlístice má sedm různých variant, jenž jsou podmíněné na preferenčním druhu hostitele.^{56–}

2.1.1.2 *Ditylenchus destructor*

Migrující endoparazitické háďátko *D. destructor* se nachází v mírném pásmu severní polokoule. Naleziště bylo hlášeno obzvláště v mnoha zemích Evropy, Spojených státech amerických a v bývalém Sovětském svazu.^{1,3,59} Mnoho zemí jej označilo za karanténního parazita.³ *D. destructor* má neblahý vliv na hospodářství kvůli vytváření širokých ekonomických škod.¹

Infikuje houby a hlízovité i cibulovité plodiny. Bylo objeveno přinejmenším 70 hostitelských vyšších rostlin.¹⁻³ Jedná se o vysoce závažného škůdce bramborových a batátových hlíz. Kupříkladu v severní Číně způsobil škody, které snižovaly výnosnost batátů od 20% až do 100 %.³ Po invazi PPN se vytvářejí na bramborách povrchové léze často doprovázené popraskáním slupek a hnilobou zapříčiněnou koinfekcí hub či bakterií.¹ Prefektura Aomori se naopak potýká se zamořením česneku tímto patogenem. Jeho infestace je na počátku těžko rozpoznatelná, avšak při dlouhodobější úschově cibulky hnijí. Symbióza některých druhů hub s česnekem přispívá k šíření infestace, protože parazit se chemotaxí pohybuje k rostlině, na níž jsou přítomny houby, jimiž se především krmí, avšak poté přesedlá i na česnek. Ke kontrole hub by mohlo být nápomocné mykofágní háďátko *Aphelenchus avenae*, jenž také přispívá k snížení hustoty počáteční populace *D. destructor*.⁶⁰

Úspěšnou kultivaci v laboratorních podmínkách lze provést na kukuřičném agaru za přítomnosti hub *Alternaria tenuis* a *Aphelenchus solani*, sloužící jako krmivo^{2,61} anebo na celých částech rostlin či na jejich kalusech při pokojové teplotě.⁶² Životní cyklus je poměrně krátký (trvá přibližně 7 dní)⁵⁹ a za optimálních podmínek se může vytvořit několik generací během jednoho období sklizně.⁶¹

Mezi hlavní strategie umožňující kontrolu *D. destructor* ale i jiných PPN náleží zejména chemické nematicidy, jimž bude věnována kapitola 2.2, dále střídání plodin, šlechtění rezistentních odrůd, desinfekce půdy, správné zemědělské praktiky, biologická kontrola atd.^{1,25,63,64} V praxi dochází zejména ke kombinaci pesticidních a nepesticidních metod.⁶⁴ Bohužel žádná z uváděných strategií nepředstavuje ideální řešení. Valná část chemických nematicidů má neblahý environmentální dopad a odolných odrůd rostlin se vyskytuje pramálo. Z těchto důvodů je nutné stále vyvíjet výkonné a spolehlivé kontroly červů *D. destructor* i dalších PPN a také se snažit lépe porozumět interakcím mezi parazitem a hostitelem, které jsou klíčové pro rozvoj nových strategií.⁶³

2.2 Nematicidy na chemické bázi

Jako nematicidy jsou označovány sloučeniny, které inhibují PPN, zatímco termín anthelmintikum popisuje veterinární a humánní léky s účinnou složkou používající se proti cizopasným červům.²³ Pro kontrolu PPN je stále jednou z nejspolehlivějších strategií používání chemických nematicidů kvůli jejich vysoké účinnosti i přes řadu úskalí s nimi spjatými.⁴ Mezi jejich negativa patří toxické účinky na životní prostředí a zdraví ale i zvýšené riziko vzniku rezistence PPN vůči používaným nematicidům, čímž účinnost kontroly PPN klesá.^{23,25,64} Jedním z případů je poškození ozónové vrstvy kvůli rozsáhlému používání methylbromidu.⁶⁵ To je jedním z důvodů, proč je již zakázán.⁶⁶

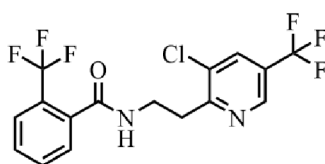
Kvůli zajištění bezpečnosti a ochraně ekosystému syntetické nematicidy podléhají v posledních letech markantním regulacím.^{66,67} Tím se škála používaných nematicidů rapidně snížila.⁶⁴ Absence efektivních alternativ konvenčních metod pro kontrolu PPN vyvolává v zemědělském průmyslu obavy.⁶⁶ Do budoucna je důležité vyvíjet stále nové účinné strategie, jež nebudou tak nebezpečné a zároveň budou participovat na zpomalení růstu rezistence PPN.⁴ Jednou z možností je hledat přírodní sloučeniny, které by podle všeho neměly být tak environmentálně nebezpečné.⁶⁸ Zároveň velkou výhodou nově vznikajících strategií pro kontrolu PPN v porovnání s tradičními nematicidy je, že jsou zacílené pouze na hád'átka a jejich toxicita pro okolní prostředí je nižší.⁶⁶

Tradiční prostředky kontroly PPN zahrnují použití nesespecifických a biocidních chemikálií fungující na bázi neurotoxinů, čímž jsou např. karbamáty či organické sloučeniny s molekulami fosforu anebo halogenů.⁶⁵ Karbamátové a organofosfátové deriváty se jako nematicidy používaly od šedesátých let dvacátého století.²³ Tyto látky jsou zodpovědné za narušení přenosu nervových impulzů u červů tím, že inhibují acetylcholinesterasu. Hád'átka se stávají dezorientované a jejich pohyblivost je omezena. Značným handicapem těchto sloučenin je jejich toxický účinek na okolní prostředí,⁶⁷ proto mnohé z nich již byly zakázány.⁶⁶

K hodnocení vztahu mezi chemickými látkami a PPN se často používají tři různé typy laboratorních testů: testy založené na chemotaxi, pohyblivost či životaschopnost a líhnutí.⁶⁹ Nematicidy mohou být klasifikovány vícero způsoby, například podle jejich funkčních skupin zajišťujících se o nematicidní aktivitu – amidy, ketony, thioestery, sulfony, hydrazony, organokovové komplexy aj.⁴ Jiná rozdělení se mohou týkat formy podání biologicky aktivních látek – fumiganty či nefumiganty.⁶⁶ Anebo se mohou dělit podle způsobu přípravy (extrahované sloučeniny/syntetické sloučeniny).^{68,70,71} Dosavadní

literatura je v tomto ohledu neucelená.

O rozvoj amidů jakožto komerčně používaných pesticidů inhibující PPN se zasloužily především deriváty arylforamidu. U těchto sloučenin vazbu mezi nimi a kýženými proteiny umožňuje amidová funkční skupina tím, že se zajišťuje o tvorbu intermolekulární vodíkové vazby s daným proteinem. Jednou z těchto látek je **fluopyram (Chyba! N nalezen zdroj odkazů.)**,⁴ jehož nematicidní aktivita byla odhalena v roce 2008 společností Nihon Nohyaku CO. Tři roky poté firma Bayer poprvé objevila jeho fungicidní vlastnosti.⁶⁶ Fluopyram způsobuje inhibici sukcinátdehydrogenasy v metabolismu trikarboxylových kyselin a buněčného dýchání hub, které parazitují na hospodářsky výnosné rostliny. Bylo objeveno, že i při nízkých koncentracích je vysoce účinný pro likvidaci J_2 háďátek *M. incognita*.⁷² Navíc nematicidní aktivitu výrazně podporuje trifluormethylová skupina na fenylové části fluopyramu.⁷³ Nejenomže se vyznačuje svými likvidačními vlastnostmi hub a PPN, ale podporuje i růst a výnosnost plodin.⁷² Hendikepem fluopyramu může být může delší poločas rozpadu v půdě, který v závislosti na typu půdy trvá přibližně 746 dní.⁶⁶ V ČR je využívána zejména jeho fungicidní aktivita. Jako nematicid se v ČR nepoužívá.⁷⁴



Fluopyram

Obrázek 3: Strukturální vzorec fluopyramu.⁴

2.2.1 Seznam používaných nematicidních strategií v ČR

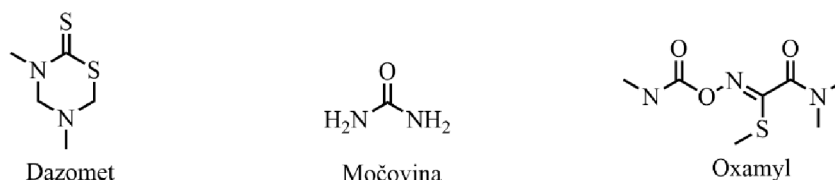
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ) k datu 21. ledna 2019 vydal věstník se seznamem povoleným přípravků na ochranu plodin, v němž bylo zahrnuto několik nematicidů, jež mají povolení se komerčně používat na území ČR. Jedná se o oxamyl, granulovanou močovinu, dusíkaté vápno, dazomet a careo combi granulát proti škůdcům.⁷⁴

Obchodní název přípravku obsahující aktivní sloučeninu **oxamyl** (Obrázek 4) se nazývá Vydate 10 G. Jeho prodej byl v ČR ukončen do data 11. 5. 2022, avšak používání do spotřeby zásob je možné do 11. 5. 2023 (Internetový zdroj 3). Oxamyl náleží do skupiny karbamátů. V ČR se používá na háďátky zamořené brambory, cukrové řepy, kapusty růžičkové, mrkve, petržele kořenové a pastináky seté. Například při napadení cukrové řepy je oxamyl zejména použit proti volně žijícím háďátkům a *Heterodera spp.* (zejména *H.*

schachtii) a *Meloidogyne spp.*⁷⁴ Jelikož se jedná o karbamát, inhibuje enzym acetylcholinesterasu, jak již bylo vysvětleno výše. Aplikace přípravku je buď řádková anebo plošná v závislosti na tom, která plodina je infikována.^{67,74} Z důvodu dobré rozpustnosti ve vodě by pravděpodobně oxamyl mohl znečistit vody. Ve studiích na modelovém organismu zebřiček vystavených oxamylu bylo odhaleno negativní ovlivnění vývoje neuronů, notochordů a vaskulatury při koncentracích, jež nebyly ještě smrtelné. Tento chybný vývoj byl spojen se supresí elektronového transportního řetězce na transkripční úrovni, stejně jako se změnami v signálních drahách proteinu p38 a protein kinasu B.⁷⁵

Močovina (Obrázek 4), jež má nematicidní účinek, se podává v granulované formě na ornou půdu. Pro anastaci půd od *G. rostochiensis* a *G. pallida* se využívá **dušikaté vápno** CaCN₂ (0,1-0,5 kg·m²). **Granulovaný přípravek careo combi** obsahuje účinnou látku acetamiprid, jež se váže na acetylcholinové nikotinové receptory. Lze jej použít i proti jiným škůdcům než jen hád'átkům. Je účinný např. proti mšicím, třásněnkám (s výjimkou třásněnky západní), červcům a křísím po infekci pokojových dekorativních rostlin, přičemž podmínkou je použití v uzavřených prostorách.⁷⁴ Nematicidní přípravek VOTiVO obsahuje bakterie *Bacillus firmus* (kmen I-1582), které osídlí kořeny ošetřených rostlin a pomáhají částečně potlačit infekci hlísticemi, lze použít na hád'átky zamořenou řepu krmnou, kukuřici a cukrovou řepu od 2. srpna 2019.⁷⁶

Dazomet (Obrázek 4) byl komerčně prodáván v ČR pod názvem Basamid® v granulované formě do data 5. 7. 2019 (Internetový zdroj 4). Tento fumigant byl používán proti hád'átkům, patogenním houbám, půdnímu hmyzu a plevelu.^{74,77} Dazomet se při kontaktu s vodou přemění na účinnou plynnou složku methylisothiokyanát, jež je zodpovědná za likvidaci škůdců. Avšak transformaci mohou vyvolat i jiné faktory (půdní pórovitost, pH aj.). Basamid® byl posouzen za vysoce toxický pro ryby, korýše a řasy, ale hodnocení expozice bylo provedeno pouze na aktivní složce prostřednictvím přímého ředění ve vodě, což zcela nevypovídá o možných scénářích, jež by pravděpodobně mohly nastat při aplikaci přípravku do půd. Přesto při testování výluhů z kontaminovaných půd přípravkem (při doporučené dávce: 145,7 mg dazometu/kg půdy) bylo zjištěno, že by pravděpodobně Basamid® mohl mít negativní dopad na vodní ekosystém. Také bylo prokázáno, že změnou pH půd se může zvyšovat anebo snižovat toxicita přípravku.⁷⁷



Obrázek 4: Strukturální vzorce vybraných nematicidů používaných v ČR do roku 2019.⁷⁴

2.3 Fenylypropanoidní deriváty a jejich nematicidní účinky

Z důvodu negativního dopadu valné části syntetických nematicidů na životní prostředí je nutné vyvíjet nové kontroly proti PPN. Ekologicky šetrnější strategie se slibnou účinností proti PPN by pravděpodobně mohla být aplikace nematofágních druhů hub nebo bakterií (biologická kontrola), či využití přírodních látek a jejich derivátů, jež řada organismů, typicky rostliny, produkují pro svoji obranu. Pozitivem některých z těchto přírodních produktů je jejich specifčnost a selektivnost.⁷⁸

Fenylypropanoidy jsou sekundární rostlinné metabolity vznikající biosyntézou z aromatických aminokyselin.⁶ Tato biosyntéza je označovaná jako šikimátová cesta, jež počíná reakcí erythrosa-4-fosfátem s fosfoenolpuruátem. Jedná se o komplexní několika krokovou řadu větvících se reakcí, jejichž nejvýznačnějším intermediátem pojmenovávající tuto dráhu je šikimát, který několika dalšími reakcemi dává za vznik třem aminokyselinám – Phe, Tyr a Trp.⁷⁹ Počátek fenylypropanoidové cesty tvoří Phe pomocí enzymu (fenylalanin amoniak-lyasa) směřující ke vzniku obrovské škály fenylypropanoidů.⁵

Sloučeniny fenylypropanoidního typu obsahují ve své struktuře fenylovou funkční skupinu připojenou ke tří uhlíkatému řetězci. Strukturální skelet je popisován jako C₃-C₆.⁸⁰ Jedná se o široce rozlišné látky v rostlinné říši. Jejich zastoupení u rostlin je druhově odlišné.⁸¹ Napomáhají rostlině reagovat na abiotické i biotické faktory. Zúčastňují se valné většiny fyziologických procesů rostlin jako např. růstu i vývoje rostlin, strukturální podpory, interakcí mezi rostlinami či jinými organismy, ale i odolnosti proti stresu (deficience minerálů, světelné záření, chemikálie atd.).^{5,6}

Získání látek fenylypropanoidního typu je umožněno extrakcí rostlinných celků či jejich buněčných kultur anebo chemickou syntézou, jejíž nevýhodou je vícero krokový postup na sebe navazujících reakcí. Tato široce zastoupená skupina sekundárních metabolitů se dále rozděluje na hydroxycinamové kyseliny, monolignoly, kumariny, flavonoidy, isoflavonoidy, skořicové aldehydy stilbenoidy, flavonoly, antokyany, lignany, neolignany aj. Mnohé

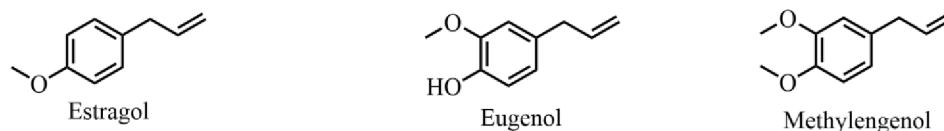
z těchto sloučenin se využívají v kosmetickém, farmaceutickém či zemědělském průmyslu.⁸¹

Během posledních dvou dekad se řada studií zaměřených na boj proti PPN věnovala hledání přírodních nematicidů (potenciálně bezpečných pro životní prostředí) a jejich následné syntéze a derivatizaci. Mnoho různých chemikálií s fenylypropanoidní kostrou bylo zkoumáno v laboratorních experimentech, v květináčích, ale i na polích pro posouzení jejich účinnosti v boji proti hád'átkům.⁶⁹ Například u fenylypropanoidů **trans-skořicové kyseliny** a **kyseliny (4E)-5-fenylypent-4-enové** (Obrázek 5) bylo prokázáno, že vykazují silnou nematicidní aktivitu proti J_2 fytopatogenních hád'átek *M. incognita* a *Tylenchulus semipenetrans*. Tyto sloučeniny lze získat izolací z *in vitro* kultur *Photorhabdus luminescens sonorensis*. Bylo zjištěno, že kyselina (4E)-5-fenylypent-4-enová je účinnější proti *M. incognita* v porovnání s *T. semipenetrans* při inkubační době 24 hodin, avšak s delší dobou expozice se daný rozdíl částečně vyrovná. Naproti tomu kyselina trans-skořicová nevykázala žádný významný rozdíl nematicidní účinnosti proti oběma zmíněnými PPN během experimentu.⁸²



Obrázek 5: Strukturální vzorce dvou druhů fenylypropanoidů – trans-skořicová kyselina, (4E)-5-fenylypent-4-enová kyselina.⁸²

Proti *M. incognita* vykazují slibnou účinnost i fenylypropanoidy jako **eugenol**, **methylenol** a **estragol** (Obrázek 6).^{83,84} Zároveň byla také prokázána nematicidní účinnost prvních dvou zmíněných látek na *B. xylophilus*.⁸³ Eugenol se také vyznačuje nematicidní aktivitou proti J_2 hád'átkům *M. javanica*.⁷⁶ Látky eugenol, methylenol a estragol jsou třemi hlavními složkami v esenciálním oleji z nadzemních částí *Agastache rugosa*, která se jeví jako potenciální slibný zdroj látek s nematicidním účinkem.⁸³



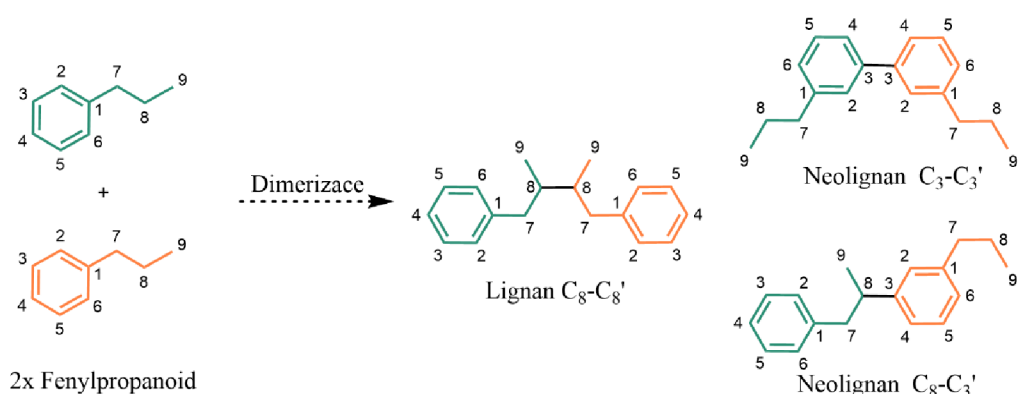
Obrázek 6 Chemické struktury estragolu, eugenolu a methylenolu.⁸³

Hlístice *M. incognita* je chemotakticky přitahována ke **kyselině salicylové** (Obrázek 7), která působí nematocidně a inhibuje mobilitu i líhnutí.^{69,85} Testováním **kyseliny ferulové** (Obrázek 7) byla prokázána nematostatická i nematocidní aktivita v háďátku *R. similis* a s menší účinností i v *M. incognita*. Inhibici líhnutí parazitů *M. incognita* bez poškození larválních stádií či dospělců způsobuje dále i **kyselina kávová** (Obrázek 7). Předpokládá se, že vyšší počet hydroxylů ve fenylypropanoidech pravděpodobně zvyšuje toxicitu na PPN, ale na druhé straně se snižuje lipofilní vlastnost látek a tím pádem hůře pronikají membránami.⁶⁹



Obrázek 7: Strukturální vzorce kyseliny ferulové, salicylové a kávové.⁸⁶

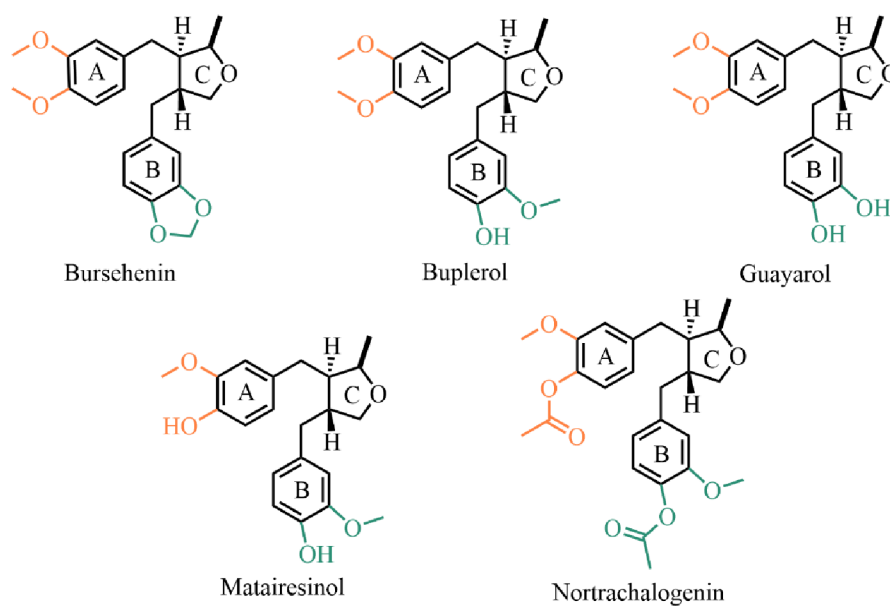
Dimerizace dvou fenylypropanoidních jednotek vede k tvorbě lignanů a neolignanů. U lignanů je vazebné místo obou fenylypropanoidních monomerů vždy na osmém uhlíku. V případě, že je spojení jakékoliv jiné než C₈-C_{8'} a to i za podmínky substituce jakýmkoliv jiným typem této vazby, se dané látky označují jako neolignany (Obrázek 8). Naopak norlignany jsou přírodní sloučeniny, které mají jádrovou strukturu menší než C₁₈. Běžně se vyskytují vedle lignanů nebo neolignanů. Předpokládá se, že tyto struktury vznikají ztrátou jednoho či dvou uhlíků z fenylypropanoidových dimerů, podle všeho v důsledku dekarboxylace.⁸⁷



Obrázek 8: Dimerizace fenylypropanoidů za vzniku lignanu a neolignanů.⁸⁷

V různých rostlinách byla identifikována řada lignanů i neolignanů vykazující biologickou aktivitu, kterou lze využít v lékařském ale i zemědělském odvětví. Zemědělské studie naznačují, že rostlinné lignany a jejich příbuzné sloučeniny mají insekticidní,

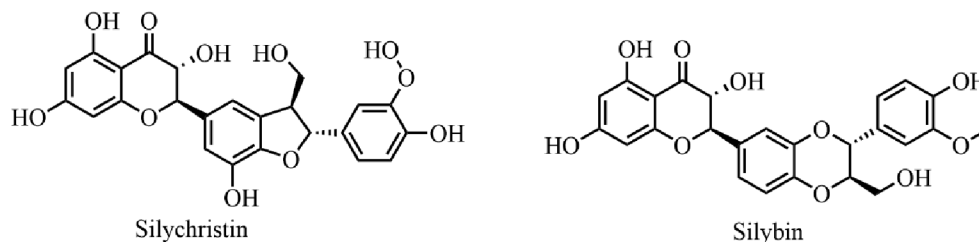
antifungální, ba dokonce i nematocidní vlastnosti.⁸⁸ González a spol. studovali aktivitu lignanů **burseherninu**, **matairesinolu**, **buplerolu**, **guayarolu** a **nortrachalogeninu** (Obrázek 9) izolovaných z *Bupleurum salicifolium*. Ukázali, že tyto látky inhibují líhnutí vajíček cystotvorných háďátek *Globodera pallida* a *G. rostochiensis* (směs 50:50), avšak nevykazují nematocidní aktivitu v infekčních *J*₂ larvách. Nejaktivnější byly lignany bursehernin a matairesinol, které v koncentraci 50 ppm snížily líhnutí vajíček o 69, respektive 55 %. Nejaktivnější sloučenina, bursehernin, v aromatickém kruhu B obsahuje methyldioxylovou skupinu, kdežto u méně aktivního guayarolu se zde vyskytují dvě hydroxy skupiny a u nejméně aktivního buplerolu je methyldioxylová skupina nahrazena methoxylem a hydroxylem. Druhý nejaktivnější matairesinol má v aromatickém kruhu B stejné substituce jako buplerol, avšak v aromatickém kruhu A je jeden methoxyl nahrazen hydroxylem, což zvyšuje nematostatickou aktivitu v souladu s hypotézou, že účinek proti hlísticím roste se zvyšujícím se počtem hydroxylů.⁷⁰



Obrázek 9: Strukturální vzorce vybraných nematostatických lignanů – bursehernin, buplerol, guayrol, matairesinol a nortrachalogenin.⁷⁰

Extrakcí rostliny *Silybum marianum* lze izolovat chemické složky – **silybin**, **silychristin** (Obrázek 10), **silymarin**, a **deriváty silybinu**, jež inhibují líhnutí háďátka *M. incognita*. Účinnost těchto látek nejspíše spočívá v blokaci chloridových kanálků oocytů, které bývají běžně aktivovány změnami napětí. Tuto funkci patrně zajišťuje 5-nitro-2-(3-

fenylpropylamino)benzoová skupina. Ovicidní efekt těchto sloučenin byl významnější než jejich nematicidní aktivita v *J2*.⁶⁸



Obrázek 10: Chemická struktura silychristinu a silybinu.⁸⁹

Z léčivé rostliny *Daphne acutiloba* lze získat lignany s nematicidními, ale i s antibakteriálními vlastnostmi, a to **1-(4-hydroxyfenyl)-5-fenylpentanon** a **dafneolon** (Obrázek 11). Jejich zmíněné aktivity byly prokázány testováním na bakterii *Ralstonia solanacearum* a směsných larválních stádiích hád'átek *M. incognita* odebraných z infikovaných kořenů tabáku. Autoři studie se domnívají, že tyto lignany by pravděpodobně mohly být stavebním pilířem pro vývoj nových syntetických derivátů anebo bioagens, jenž by měly potenciál pro využití v boji proti PPN.⁹⁰



Obrázek 11: Chemická struktura látek - 1-(4-hydroxyfenyl)-5-fenylpentanon a dafneolon.⁹⁰

Jak již bylo výše zmíněno deriváty šikimátové dráhy, a to např. lignany a neolignany, by pravděpodobně mohly být užitečným pomocníkem při kontrole parazitických hád'átek v rostlinách. Jejich použití by nejspíše mohlo pomoci snížit negativní dopad konvenčních syntetických nematicidů na životní prostředí, kvůli čemuž by jejich další studium mohlo být důležitou součástí programů integrované ochrany proti fytopatogenním škůdcům.^{65,70} Avšak je nutno zdůraznit, že zkoumání biologické aktivity lignanů a neolignanů je především zaměřeno na potenciální použití těchto sloučenin v medicíně.⁸⁷ Posuzováním nematicidní aktivity těchto látek se mnoho výzkumů nezaobírá. Neblahým aspektem, jenž znesnadňuje zkoumání nematicidních sloučenin na PPN, je i vysoká manuální náročnost a z ní vyplývající nízká testovací kapacita tradičních biotestů. Z toho důvodu se pro testování a identifikaci slibných chemických sloučenin často používá nepatogenní *C. elegans*, pro které již existuje řada efektivních metod vysokokapacitního screenování (HTS).⁹¹

2.4 Vysokokapacitní screening látek na hlísticích

Pro modelový organismus *C. elegans* byla zavedena celá řada vysokokapacitních metod screeningu (HTS), jejichž princip se vždy odvíjí od zamýšlené aplikace. Využívají se k výzkumu různých molekulárních dějů a interakcí i ke studiu reakcí na biotické i abiotické podněty. Pro účely této práce byly tyto přístupy rozděleny do dvou skupin: genetické a chemické screeningu.⁹² Tato práce se prvním jmenovaným zabývá pouze okrajově.

Genetický screening je často považován za jednu z nejsilnějších stránek *C. elegans* jakožto modelového organismu. Zahrnuje buď selektivní, cílené vyřazení funkce genu s následným pozorováním výsledných změn fenotypu (reverzní genetika)⁹³ anebo náhodnou mutagenezi hlístic, přičemž posléze bývají jedinci s žádaným fenotypem izolováni a blíže zkoumání s cílem nalézt neznámý gen zodpovědný za biologický proces (klasická genetika).⁹⁴ V *C. elegans* je možno velmi snadno provádět RNA interferenci, což je přístup reverzní genetiky, kdy stačí červy nakrmit bakteriemi nesoucími plasmid, jež kóduje část cílového genu obklopenou dvěma antiparalelními promotory. Knihovny transformovaných bakterií, jež umožňují selektivně umlčet téměř každý gen *C. elegans*, jsou komerčně dostupné.⁹³ Pro hodnocení klasického genetického screeningu se často využívá jednoduché vizuální hodnocení, avšak pro identifikaci jemných nebo méně zjevných fenotypů může být zapotřebí zobrazování s vysokým rozlišením.⁹²

Jako chemický screening označujeme testování souboru sloučenin s cílem identifikace těch, jež vyvolávají požadovaný specifický účinek.⁹² Obvykle jsou hodnoceny parametry jako míra přežití populace, inhibice líhnutí vajíček⁹⁵ či reprodukce,⁹⁶ nebo změny v mobilitě červů.⁹⁷ Konvenční metody hodnocení vlivu chemikálií na tyto parametry u háďátek obvykle spočívají v mikroskopickém hodnocení a manuálním počítání a jsou proto časově náročné a pracné. Kvůli tomu nejsou zcela vhodné pro testování ve větším měřítku⁹⁸ a pro zkoumání biologické aktivity velkých chemických knihoven látek v krátkém časovém úseku jsou používány automatizované/poloautomatizované HTS.^{99,100} Ty si dávají za cíl nalézt biologicky aktivní struktury z chemických knihoven s obsahem několika tisíců látek v krátkém časovém úseku.¹⁰¹ HTS drží krok s inovacemi v molekulární biologii, technologických oblastech i informatice. Velkou zásluhu v pokroku vývoje těchto screeningových metod nese farmaceutický průmysl, nicméně dané platformy jsou nyní široce využívány i v jiných sférách biologického výzkumu. HTS se obvykle skládá ze čtyř hlavních komponent: knihovny látek, kvalitních a spolehlivých testů, sledovacích

mechanismů a analytických i anotačních procesů.¹⁰⁰ Celkově mohou HTS metody napomoci získat cenné poznatky o biologii i chování hád'átek vystavených efektu různých sloučenin, jež lze pak využít pro další testování a vývoj.^{92,102} Využití HTS zasahuje i do genetické oblasti, kde se sloučeniny používají k simulaci účinků genetických mutací, což umožňuje identifikovat a analyzovat spektrum chemických struktur způsobujících změnu některých produktů genové exprese.¹⁰⁰

I při vyhledávání nových látek s anthelmintickou/nematicidní aktivitou je důležitá kapacita biologických testů. Proto se k experimentům v první fázi často používá *C. elegans* jakožto „modelový parazit“, hlavně díky tomu, že pro něj již řada efektivních metod existuje, a také díky jeho snadné kultivaci, hlavně v porovnání se savčími parazity. Ačkoliv je však *C. elegans* užitečným modelem, je to nepatogenní organismus, díky čemuž je mezi ním a parazity řada fyziologických a biologických rozdílů. Bohužel není zaručeno, že aktivita látky v *C. elegans* a parazitech bude korelovat. V dalších fázích výzkumu je proto vhodné aktivitu látek před-vybraných s pomocí *C. elegans* ověřit i v parazitech. Ideální by bylo provádět HTS přímo v parazitech. V literatuře již existují pokusy adaptace některých vysokokapacitních postupů z *C. elegans* i pro savčí parazity,¹⁰³ avšak zmínky o podobných snahách pro fytoparazitické hlístice jsou jen velmi vzácné. Screeningy na PPN stále využívají nejčastěji klasické přístupy pro detekci a to především mikroskopické metody.^{68,104,105} Jedním z cílů této práce bylo proto adaptovat některé metody běžně používané v naší laboratoři pro *C. elegans* i pro fytoparazitického *D. destructor*. V poslední fázi hledání nových látek je pak nutno prozkoumat jejich efekt i v reálných podmínkách a v systému hostitel-parazit. Pro PPN toto znamená i získání poznatků o fytotoxicitě či chování chemikálií v půdě (*in vivo*).⁹¹

Jako potenciálně slibný přístup, jež umožňuje vysoce výkonnou analýzu *C. elegans*, byly identifikovány mikrofluidní platformy.¹⁰² Zároveň patří mezi výjimky v tom, že již byly použity i pro testy na fytoparazitických hlísticích. Termín mikrofluidika vyjadřuje manipulaci a zkoumání tekutin ve strukturách, jejichž velikostí nepřesahují řády mikrometrů.¹⁰⁶ Během posledních několika let byla mikrofluidní technologie aplikována v různých biologických oblastech, čímž přispěla i k vývoji metod screeningu chemických složek i biologických agens¹⁰⁷ a studiu jejich dopadu na chování hád'átek. Zároveň také umožnila zkoumat paměť, učení, neuronální obnovy po zranění i zachytit aktivitu neuronů červů.¹⁰⁸ V nematologii je většina těchto systémů vytvořena pomocí polydimethylsiloxanu (PDMS). Ultrafialová fotolitografie umožňuje tvarovat PDMS do specifických tvarů s funkcí i v mikroměřítku. Z důvodu příznivých vlastností materiálu, čímž je

biokompatibilita a propustnost pro plyny, může být PDMS použit pro celoživotní výzkum hád'átek na čipu.⁹² Mikrofluidní systémy je možné také dále zefektivnit kombinací s dalšími technologiemi, například pro automatizované nanášení vzorků, monitoringu v reálném čase, záznamu a analýzy dat i paralelního testování.¹⁰⁷ Carr a spol. demonstrovali užitečnost tohoto přístupu pro screening biologicky aktivních substancí na *C. elegans* a savčím parazitu *Oesophagotomum dentatum*. Autoři vyvinuli mikrofluidní technologii na čipu s vysokou citlivostí. Jejich metoda umožňuje sledování jednotlivých červů po celou dobu expozice látkám. Hlavním monitorovaným parametrem je rychlost mobility hlístic v tekutém prostředí, díky níž se dá vyjádřit biologická účinnost sloučenin. Směr pohybu hlístic je kontrolován elektrickým polem. Platforma se skládá z mikrokanálů umožňující studium mobility hád'átek a vzorkovací jamky. Pomocí těchto hlavních komponent je možné sledovat účinky podaných látek na hlísticích v průběhu času. Testování odezvy červů na bioaktivní molekuly zahrnuje před expoziční studii (charakterizace pohybů hlístů v mikrokanálech, do kterých byli červi vloženi), studii expozice červů s látkou (hád'átka jsou naváděny do vzorkovací jamky a dochází k monitorování jejich přechodné reakce na látku) a po expoziční studii (červi se vrací do mikrokanálů a jejich mobilita v odezvě na látku je srovnávána s pohybem před expozicí).¹⁰⁹ V rámci studie provedené Bemmanem a spol. byly vytvořeny dva typy mikrofluidních čipů, s pomocí kterých je možné také měřit chemotaxi PPN (*J₂ M. incognita* a *H. glycines*) k chemikáliím (chemický čip) nebo ke kořenům mladých rostlin (kořenový čip). Snímání PPN zajišťuje buď mikroskop anebo skener. Metoda je méně pracná a zřejmě umožňuje lepší distribuci látek v porovnání s klasickými chemotaktickými testy prováděnými na agaru, avšak kvůli nutnosti vizuální identifikace a označení každého hlístu uživatelem zřejmě není v současné podobě vhodná pro HTS. Je však možné, že bude v budoucnu inovována a zefektivněna.¹⁰⁷ Možnou komplikací, jež znemožňuje přímé převzetí nástrojů vyvinutých pro vysoce pohyblivou *C. elegans*, by mohl být i fakt, že řada parazitů, jak savčích tak rostlinných, je obecně v nepřítomnosti signálů od hostitele méně aktivní ve snaze šetřit omezené zásoby energie.

Pro posouzení aktivity látek na *C. elegans* byly dále vytvořeny různé metody zaměřené na pozorování metabolických aktivit či chování červů. První typ lze analyzovat kolorimetrickými anebo fluorescenčními testy. Na druhé straně existuje řada přístupů pro hodnocení a analýzu behaviorálních změn. Ty často využívají automatizované snímání obrazu (př. skenery, automatické mikroskopy, kamerové systémy aj.) a následnou obrazovou analýzu. Oba typy testů se pro vyšší efektivitu často kombinují s metodami pro automatizovanou distribuci vzorků do více jamkových desek. Existují i zařízení principiálně

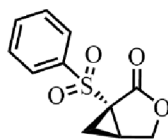
vycházející z průtokového cytometru jež jsou uzpůsobena pro práci s většími objekty jako jsou hlístice.¹¹⁰

V roce 2004 byla popsána jednoduchá, poloautomatická metoda screeningu chemických sloučenin na *C. elegans* založená na měření aktivity enzymu chitinasy, která byla používána i v rámci řešení této práce.¹¹¹ Chitinasu produkují líhnoucí se červi, jelikož zodpovídá za štěpení chitinového obalu vajíček.¹¹² Množství enzymu uvolněného do kultivačního média je indikátorem líhnutí vajíček. Cílem této metody bylo dosažení rychlejšího testování tím, že se oprostí od využití vizuálních technik. Enzymatickou aktivitu lze zjistit přidáním fluorogenního substrátu pro chitinasu s následnou detekcí pomocí fluorimetru. Nižší detekovaný signál vypovídá o snížené reprodukční kapacitě *C. elegans*.¹¹¹

V neposlední řadě byl v rámci řešení této práce používán i přístroj wMicrotracker (wMT), což je poloautomatizovaný, kvantitativní systém, který umožňuje zaznamenávat pohybovou aktivitu populací háďátek pomocí detekce počtu zlomů infračerveného světelného paprsku, které jsou způsobeny pohybem červů. Paprsky procházejí skrz každou jamku na mikrotitrační destičce a výsledný signál každého přímá fototranzistor. Platforma poté automaticky data zpracuje a poskytne informaci o celkové aktivitě v jednotlivých jamkách.^{110,113}

2.5 Screeningy fenylypropanoidů na *C. elegans* – chitinasové testování

Výzkumná skupina doc. Jiřího Pospíšila se zabývá chemickou syntézou derivátů lignanů a neolignanů. Vytváří chemickou knihovnu sloučenin, která vychází ze základní kostry cyklopropylfenylsulfonyl laknonu (Obrázek 12), u níž byla objevena antileshmaniální aktivita testováním látek připravenými rozmanitě orientovanou syntézou na promastigotických prvocích *Leishmania major* na Hebrejské Univerzitě v Izraeli. Cytotoxickými testy na buněčných liniích lidských makrofágů THP-1 bylo zjištěno, že látky toxické nejsou. Sloučeniny, jež v rámci své výzkumné skupiny připraví, předávají i do laboratoře Mgr. Aleny Kadlecové, Ph.D., kde dochází k otestování jejich anthelmintické/nematicidní aktivity chitinasovým testem na *C. elegans*.¹¹⁴



Cyklopropylfenylsulfonylakton

Obrázek 12: Strukturní vzorec cyklopropylfenylsulfonyl laktonu.¹¹⁴

Při takovémto screeningu nasynthetizovaných lignanů a neolignanů bylo zjištěno, že látka **L-32**, jež byla připravena výzkumnou skupinou doc. RNDr. Jiřího Pospíšila, Ph.D., vykazovala slibnou aktivitu proti *C. elegans* (Tabulka 1). Byla stanovena polovina maximální inhibiční koncentrace IC_{50} , tedy koncentrace, u níž dochází ke inhibici reprodukce o 50 % v porovnání s kontrolou. Toto testování tak odstartovalo nový projekt, jímž se zabývám ve své diplomové práci.

Tabulka 1: Zkoumání dopadu sloučeniny L-32 na „wild-type“ kmene *C. elegans* N2 a na další čtyři kmene *C. elegans* s odolností vůči anthelmintikům, jmenovitě CB211 (levamisol rezistentní), ZZ15 (levamisol rezistentní), CB3474 (mebendazol rezistentní), DA1316 (ivermektin rezistentní). Standardizovaným chitinasovým testem (Kapitola 3.6.2) byla vyhodnocena průměrná hodnota IC_{50} v μM a standardní chyba průměru (SEM) z triplikátů/tetraplikátů.

Název látky	Strukturální vzorec	Koncentrace ($\mu mol \cdot l^{-1}$)				
		N2	CB211	ZZ15	CB3474	DA1316
L-32		2,20	1,85	3,09	3,00	2,96
		±	±	±	±	±
		0,26	0,10	1,10	0,27	0,13

3 Experimentální část

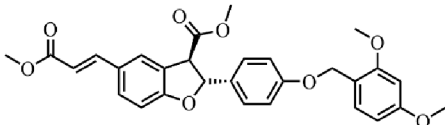
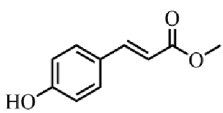
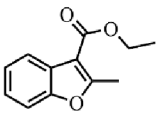
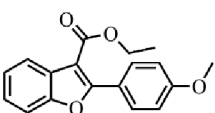
3.1 Použité přístroje

- 8 kanálová pipeta Transferpette typu S-12 (BRAND; Německo)
- Analytická váha typu ER-182A (A&D Company; Japonsko)
- Automatické pipety (Eppendorf; Německo)
- Centrifuga typu 5702 (Eppendorf; Německo)
- Centrifuga typu BR4i (Jouan; Francie)
- CO₂ Inkubátor typu MCO-19M (Panasonic; Japonsko)
- Inkubátory Q-Cell (Pol-lab; Polsko)
- Laminární box typu aura HZ 72T (BIOAIR, Itálie)
- Laminární box MSC-Advantage (Thermo Fisher Scientific; USA)
- Magnetická míchačka WiseStir typu MSH-30D (Witeg; Německo)
- Mikroskop Olympus typu CKX41 (Olympus; Japonsko)
- wMicroTracker ONE wMT (NemaMetrix, USA)
- Mini centrifuga typ C1301-B (Labnet International; USA)
- Multifunkční modulární reader infinite typ M200 PRO (TECAN; Švýcarsko)
- pH metr pH1000L (VWR International s. r. o.; ČR)
- Pipetor Swiftper PRO (HTL; Polsko)
- Skener Epson Perfection V800 Photo (EPSON; Indonésie)
- Stereo mikroskop ICD LED (Bresser; Německo)
- Invertovaný mikroskop Leica typu DMIL LED (Progolab s.r.o; ČR)
- Thermoshaker Mixing Block typ MB-102 (BIOER, Čína)
- Třepačka BioSan typu OS-10 (BioSan; Lotyšsko)
- Třepačka IKA KS typu 260 basic (IKA; Německo)
- Ultrazvuková lázeň typu USC100T (VWR International s. r. o.; ČR)

3.2 Testované sloučeniny

Veškeré testované fenylpropanoidní sloučeniny byly připraveny výzkumným týmem doc. RNDr. Jiřího Pospíšila, Ph.D. (Tabulka 2). Dané látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) za vzniku zásobního roztoku o koncentraci 50 mmol·l⁻¹ a skladovány v mrazničce. Před všemi experimenty byly roztoky sonikovány a vortexovány.

Tabulka 2: Strukturální vzorce a molekulové hmotnosti testovaných sloučenin

Název látky	Strukturální vzorec	Molekulová hmotnost
L-32		504,54
L-147		178,19
L-148		204,23
L-179		296,32

3.3 Biologický materiál

- Buněčná linie pigmentového epitelu lidské sítnice ARPE-19 (American Type Culture Collection, USA)
- *Bursaphelenchus mucronatus* (ÚKZÚZ, ČR)
- *D. destructor* (ÚKZÚZ, ČR)
- Uracil auxotrofní kmen *E. coli* OP50 znemožňující další množení bakterií v médiu určeném pro kultivaci hlístic, jenž je chudé na uracil (Ceanorhabditis genetic center; USA)
- Imortalizované kožní keratinocyty HaCaT (German Cancer Research Center; Německo)
- Lidské kožní fibroblasty BJ (American Type Culture Collection, USA)
- „Wild-type“ linie *C. elegans* N2 (Ceanorhabditis genetic center; USA)

3.4 Chemikálie

Pro biologické testování byly použity tyto chemikálie: DMSO, 70% ethanol (EtOH), ivermektin, NaN_3 , destilovaná voda (dH_2O), 4-methylumbelliferyl β -D-N, N', N''-triacetylchitotriosid, 14% NaClO , amfotericin B ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), streptomycin ($10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), kaolín a $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Chemikálie byly zakoupeny od firmy Merck (Německo) či firmy Lachner (ČR). Všechny sloučeniny byly použity v takové čistotě, kterou deklaruje výrobce,

pokud ovšem není uvedeno jinak. Pro chemické syntézy byly použity tyto chemikálie: CH_2Cl_2 , DMSO, 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en, p-toluensulfonová kyselina zakoupené od firem Sigma-Aldrich, Merck, Lachner a Fluka. Všechny sloučeniny byly použity v takové čistotě, kterou deklaruje výrobce, pokud ovšem není uvedeno jinak. Sloučeniny 2,4-dimethoxyfenyl)methanol **1** a methyl (2S,3S)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-(3-methoxy-3-oxopropyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát **5** byly předem připraveny výzkumnou skupinou doc. RNDr Jiřího Pospíšila, Ph.D.

3.4.1 Roztoky pro vizualizaci na tenkovrstvé chromatografii (TLC)

- Hannesianův roztok pro vizualizaci připraven rozpuštěním 12 g fosfomolybdenové kyseliny v 250 ml EtOH
- Vanilín byl připraven rozpuštěním 2 g vanilínu v 100 ml EtOH s 1 ml koncentrované H_2SO_4
- Zásaditý roztok KMnO_4 byl připraven rozpuštěním 9 g KMnO_4 a 20 g K_2CO_3 ve 150 ml 10% NaOH

3.5 Pufry a média

Agar pro chemotaktické testy

- Agar (7,8 g)
- Doplněno dH_2O do 400 ml
- Autoklávováno a rozlito na Petriho misky fixou zespod narýsovanými kříži a kruhy uprostřed misky

Alkalický pufr na chitinasový test

- NaOH (40 g)
- Glycin (75 g)
- Doplněno dH_2O do 1 l
- Srovnáno pH na 10,6

Citrátový pufr:

- $\text{C}_6\text{H}_5\text{K}_3\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (268,8 g)
- $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (26,3 g)

- Doplněno dH₂O do 0,9 l
- Hodnota pH upravena na 6 díky 5 mol·l⁻¹ KOH
- Doplněno dH₂O do 1 l
- Autoklávováno

Fosfátový pufr (PPB):

- KH₂PO₄ (136 g)
- Doplněno dH₂O do 0,9 l
- Hodnota pH upravena na 6.0 přidáním 5 mol·l⁻¹ KOH
- Doplněno dH₂O do 1 l
- Autoklávováno

Kultivační médium - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

- Základní médium DMEM (450 ml)
- Fetální sérum (50 ml)
- L-glutamin (2 mmol·l⁻¹; 5 ml)
- 5 ml směs antibiotik penicillin (100 IU·ml⁻¹) a streptomycin (100 µg·ml⁻¹)

Kukuřičný agar („cornmeal“ agar, CMA)

- 10 g směsi Himedia M146 (10 g)
- Doplněno dH₂O do 200 ml
- Přidán glycerol (10 ml)
- Autoklávováno a rozlito na Petriho misky

LB médium

- Trypton (10 g)
- Kvasnicový extrakt (5 g)
- NaCl (10 g)
- Doplněno dH₂O do 1 l
- Autoklávováno

Médium M9:

- Na₂HPO₄ · 12 H₂O (15 g)
- KH₂PO₄ (3 g)

- NaCl (5 g)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,25 g)
- Doplněno dH_2O do 1 l
- Autoklávováno

Médium pro růst hlístic (NGM, nematode growth medium)

- NaCl (1,2 g)
- Pepton (1 g)
- Agar (7,8 g)
- dH_2O (400 ml)
- Cholesterol v EtOH ($5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$; 400 μl)
- Autoklávováno
- Po autoklávování zchlazeno
 - Sterilní CaCl_2 ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; 200 μl 1M)
 - Sterilní MgSO_4 ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; 400 μl)
 - Sterilní fosfátový pufr (10 ml; pH 6)

Mrazící roztok

- NaCl (5,85 g)
- KH_2PO_4 (6,8 g)
- Glycerol (300 g)
- NaOH ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; 5,6 ml)
- Doplněno dH_2O do 1 l
- Autoklávováno

Stopové prvky:

- Na_2EDTA (1,86 g)
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,69 g)
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (0,2 g)
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,29 g)
- CuSO_4 (0,016 g)
- Doplněno dH_2O do 1 l
- Autoklávováno

S bazální reagent:

- NaCl (5,9 g)
- Nesterilní fosfátový pufr (50 ml)
- Cholesterol (1 ml; 5 mg·ml⁻¹ v EtOH)
- Doplněno dH₂O do 1 l
- Autoklávováno

S- kompletní médium

- Do 1 l S bazálního reagentu bylo přidáno:
 - Sterilní citrátový pufr (10 ml)
 - Sterilní stopové prvky (10 ml)
 - Sterilní CaCl₂ (1 mol·l⁻¹; 3 ml)
 - Sterilní MgSO₄ (1 mol·l⁻¹; 3 ml)

Roztok na vývojovou synchronizaci

- dH₂O (8 ml)
- NaClO 14% (1,5 ml)
- NaOH (10 mol·l⁻¹; 0,5 ml)

Roztok MgSO₄ · H₂O (ρ = 1,18 kg·m⁻³)

- MgSO₄ · H₂O (500 g)
- dH₂O (1 l)

Roztok resazurinu

- Resazurin (12,5 mg·100 ml⁻¹; 2 ml)
- Médium DMEM (16 ml)

Roztok trypsinu

- Sterilní voda (230 ml)
- Trypsin (25 g·l⁻¹; 20 ml)
- EDTA (0,5 mmol·l⁻¹; 25 ml)

Firma Merck (Německo) – ivermektin a substrát pro chitinasu (4-methylumbelliferyl β-D-N, N', N''- triacetylchitotriosid)

Firma VWR (International s.r.o., ČR) – kvasnicová extrakt, trypton, pepton i agar

Firma Sigma-Aldrich (USA) – látky použité k vyhodnocení cytotoxických testů

Firma Lach-ner (ČR) – ostatní sloučeniny

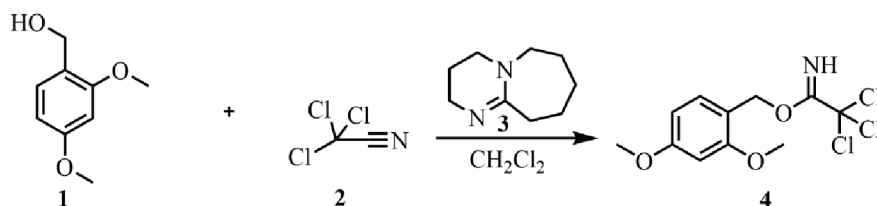
3.6 Metodika

3.6.1 Chemická syntéza

3.6.1.1 Klasické metody organické syntézy

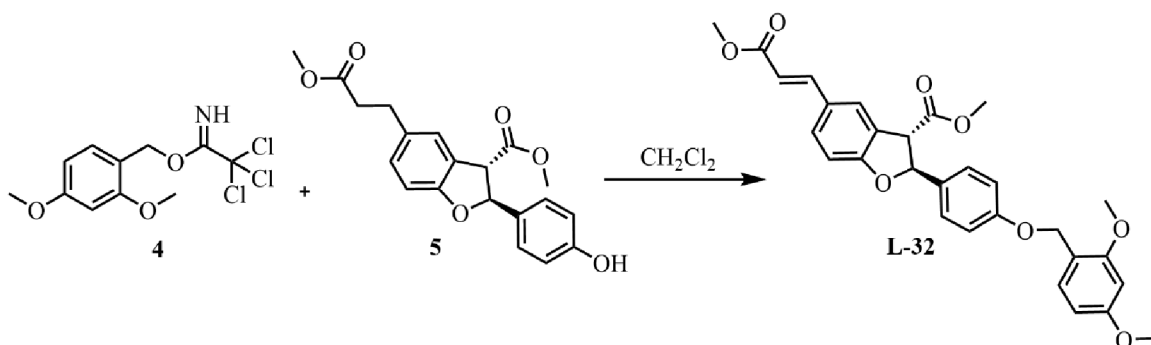
Pomocí analytických vah Radwag AS 220.R2 byly všechny sloučeniny zváženy. Syntetické reakce byly míchány v plamenem žíhané aparatuře Meidolph MR 3001 K za využití standartních laboratorních technik. Ke sledování průběhu reakcí byla použita TLC na hliníkových deskách na jejichž povrchu byl silikagel 60 SIL G/UV254 s fluorescentním indikátorem od společnosti Machery-Nagel či Sigma-Aldrich. Pro detekci látek aplikovaných na TLC bylo k vizualizaci použito UV záření při vlnové délce 250 nm a roztoky z kapitoly 3.4.1. Purifikaci výsledného produktu umožnila kolonová chromatografie (silikagel 34; částice: 230-400 mech; póry: 60 Å) od firmy Sigma Aldrich. Pro odpaření roztoku byla využita rotační vakuová odparka (RVO) Interface I-300, Büchi. U jednotlivých sloučenin byla změřena nukleární magnetickou resonancí (NMR) JEOL 500 JNM-ECA ^1H NMR a ^{13}C NMR spektra při frekvenci 500 MHz pro ^1H a 125 MHz pro ^{13}C (rozpuštědlo - deuterovaný chloroform) při laboratorní teplotě (RT). Chemické posuny (δ , ppm) byly uvedeny ve vztahu k deuterovanému chloroformu pro ^1H spektra $\delta\text{H} - 7,27$ ppm a pro ^{13}C spektra $\delta\text{C} - 77,23$ ppm. Interakce protonů jsou označeny jako singlet (s), dublet (d), dublet dublet (dd), a multiplet (m). Připravená látka **L-32** byla analyzována metodou HPLC-PDA-MS. Byla využita kapalinová chromatografie Agilent 1290 Infinity II s UV-VIS detektorem a hmotnostním detektorem Agilent InfinityLab. Vzorek (10 μl) byl rozpuštěn v 1% 1 ml methanolu a nanesen na kolonu s reverzní fází Agilent 5Prep-C₁₈ (10x21,2 mm) při 40 °C a analyzován pomocí gradientu rozpuštědla - 10% methanol, 0 minut; 90% methanol, 10-12 minut; 10% methanol 12,5-13 minut. Průtok byl nastaven na 20 ml/min. Dalším použitým rozpuštědlem byl 15 mmol·l⁻¹ mravenčnan amonný (pH 0,4). Eluční roztok byl poté podroben hmotnostní spektrometrii za použití systému ESI, a to přístrojem QDa Waters MS Technologies. Měření probíhalo v pozitivním (ESI+) a negativním režimu (ESI-), přičemž iontový zdroj byl zahřát na 120 °C a napětí bylo nastaveno na 15 V. Skenování bylo nastaveno na 100-1700 m/z. Softwarem MassHunter bylo vyhodnoceno hmotnostní spektrum.

3.6.1.2 Příprava látky 2,4-dimethoxybenzyl 2,2,2-trichloroacetimidát



Do roztoku 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en **3** (0,18 ml; 1,19 mmol; 0,1 equiv) byla přidána sloučenina 2,4-dimethoxyfenyl)methanol **1** (2 g; 11,9 mmol; 1 equiv) rozpuštěná v CH_2Cl_2 (40 ml; $0,3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; 1 equiv) za RT, pod inertní atmosférou argonu. Po patnácti minutách byla reakce ochlazena na 0°C (voda/led). Po pěti minutách míchání reakce při 0°C byl přidán trichloroacetonitril **2** (529 mg; 1,69 mmol; 1,2 equiv). Výsledná směs byla míchána přes po dobu 18 hodin při RT a byla poté odpařena do sucha na RVO. Ze směsi byl izolován surový produkt **4** (1,4 g). Spektroskopická data látky **4** odpovídají v literatuře.¹¹⁵ Výsledný imidát byl použit v dalším kroku bez purifikace. Sloučenina **1** byla předem připravena výzkumnou skupinou doc. RNDr. Pospíšila, Ph. D. a celý tento experimentální protokol byl vytvořen Mgr. Danielem Chrenkem podle odpovídající literatury.^{115,116}

3.6.1.3 Příprava látky methyl (2*S*,3*S*)-2-(4-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)fenyl)-5-((*E*)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát



Sloučenina methyl (2*S*,3*S*)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-(3-methoxy-3-oxopropyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát **5** (1,33 g; 3,75 mmol; 1 equiv) byla rozpuštěna v CH_2Cl_2 (15 ml; $0,25 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; 1 equiv) a k směsi byl následně přidán imidát **4** (1,4 g; 4,5 mmol; 1,2 equiv) z předchozí syntézy při RT, pod inertní atmosférou dusíku. Výsledná reakční směs byla míchána po dobu 48 hodin při RT. Reakční směs byla odpařena na RVO. Crud byl poté přečištěn pomocí gradientové sloupcové chromatografie (SiO_2 ; petrolether/ ethyl-acetát = 4:1–2:1) za získání produktu **L-32** jakožto bílé pevné látky (1,8 g, výtěžek 95,1 %).

Sloučenina **5** byla předem připravena výzkumnou skupinou doc. RNDr. Pospíšila, Ph. D. a celý tento experimentální protokol byl vytvořen Mgr. Danielem Chrenkem.

¹H NMR (500 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): δ 7.66 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.57 – 7.55 (m, 1H), 7.42 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 7.33 – 7.28 (m, 3H), 7.00 – 6.96 (m, 2H), 6.89 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.50 – 6.47 (m, 2H), 6.32 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.10 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 4.29 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.80 (s, 3H)

¹³C{¹H} NMR (126 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): δ 171.0, 167.9, 161.3, 161.1, 159.5, 158.4, 144.7, 132.0, 131.0, 130.3, 127.9, 127.4, 125.3, 125.1, 117.5, 115.3, 110.5, 104.3, 98.6, 86.6, 65.1, 55.6, 55.5, 55.2, 53.0, 51.8

MS (ESI) *m/z* (%): 505 [M+H]⁺ (100)

HRMS (ESI) *m/z*: [M+H]⁺ calculated for C₂₉H₂₈O₈K: 543.1416; nalezeno: 543.1417

3.6.2 *C. elegans* – údržba, kultivace a hodnocení anthelmické aktivity

3.6.2.1 Příprava *E. coli* OP50 suspenze v LB médiu

Příprava bakterií *E. coli* OP50 v tekutém LB médiu spočívala v přelití čerstvě připraveného LB média do sterilní Erlenmayerovy baňky a přidáním bakterií pomocí sterilní kličky. Dané bakterie byly získány z „maintenance“ LB Petriho misky osázené bakteriemi *E. coli* OP50. Tyto „maintenance“ misky bývaly pravidelně obměňovány pomocí nanesení kolonií křížovým roztěrem ze starší LB misky na novou LB misku. Erlenmayerova baňka s inokulovaným médiem byla kultivována 24 hodin v 37 °C za stálého míchání na třepače (150 rpm).

3.6.2.2 Příprava NGM Petriho misek a transfer háďátek

Na 100 mm Petriho misky bylo pipetorem přeneseno čerstvě připravené NGM médium v tekuté formě. Po ztuhnutí média bylo možné na misky nasázet a sterilní hokejkou rozetřít bakterie *E. coli* OP50 v LB médiu (100 µl suspenze na misku). Po vstřebání inokulovaného LB média byly misky kultivovány (37 °C, 24 h), poté byly misky umístěny do chladničky.

Z „maintenance“ Petriho misky obsahující populaci červů na agaru, jež byla uložena v inkubátoru (15 °C), byl vyjmut sterilizovaným skalpem čtverec 1 cm², který byl přenesen na Petriho misku s čerstvým NGM médiem. Misky byly zajištěny parafilmem a byly tyto inkubovány (48 hodin, 20 °C).

3.6.2.3 Příprava bakterií v S-kompletní médiu

Z bakteriální suspenze v LB médiu bylo odlito 50 ml do předem zvážených zkumavek, jež byly poté vloženy do centrifugy (4100 rpm, 15 minut). Kapalný obsah byl vylit a v případě potřeby většího počtu bakterií byl předchozí krok zopakován. Následně byly stěny zkumavky a víčko dvakrát omyty sterilní dH₂O. Poté bylo nutné nadbytečnou kapalinu odstranit, a to vyklepáváním do buničiny, na kterou bylo pro zachování sterility předem nanesen 70% EtOH. Víčka a zkumavky se nechaly v laminárním boxu samovolně oschnout tak, aby nedošlo úplnému vyschnutí peletu. Zkumavky byly znovu zváženy a váha peletu byla spočítána odečtením váhy prázdné zkumavky. K peletu bylo poté přidáno S-kompletní médium v takovém objemu, aby výsledná koncentrace bakterií byla 60 mg·ml⁻¹.

3.6.2.4 Synchronizace vývoje *C. elegans*

Po dvou denní kultivaci háďátek v NGM miskách byla populace s velkým množstvím těhotných hermafroditů smyta z misek za pomoci média M9. Obsah byl přenesen do mikrozkušavek, tento byl ještě dvakrát promyt M9 médiem pro přečištění od bakterií. Mezi jednotlivými promývacími kroky byly mikrozkušavky stočeny mikrocentrifugou (10 sekund). Po třetím odebrání supernatantu byl k peletu přidán roztok na vývojovou synchronizaci (1 ml) a mikrozkušavky byly třepány na thermoshakeru (1500 rpm, 10-15 minut, 25 °C). Při tomto procesu dojde k usmrcení a rozpuštění larev a dospělců a v roztoku zůstanou jen viabilní vajíčka, která jsou díky chitinovému obalu odolnější. Po následném stočení mikrozkušavek na centrifuze a odstranění supernatantu byly vajíčka promyty třikrát M9 médiem (1 ml) a jednou S-kompletním médiem (1 ml). Pelet vajíček byl na závěr přenesen do 5 ml S-kompletního média v 15 ml zkumavce. Zkušavka s vajíčky byla třepána v inkubátoru (150 rpm, 24 hodin, 20 °C).

3.6.2.5 Příprava *C. elegans* pro hodnocení anthelmintické aktivity – screeningy testovacích sloučenin

Vývojově synchronizovaná první larvální stádia červů byla naředěna S-kompletním médiem tak, aby jedna jamka na 96-jamkové mikrotitrační destičce obsahovala 20 háďátek na jamku. Zjištění počtu červů v roztoku bylo uskutečněno pomocí manuálního počítání červů v 5 kapkách o 10 ul v invertovaném mikroskopu. Červi byli přepipetováni do sterilního rezervoáru a byla k nim přidána výše zmíněná bakteriální suspenze v S-kompletním médiu s výslednou koncentrací 3 mg·ml⁻¹. Multikanálovou pipetou byla suspenze (15-30

červů/jamku) nanese do 96-jamkové mikrotitrační desky. Červi byli otráveni testovanými sloučeninami ve dvou koncentracích: $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jako pozitivní kontrola sloužil ivermektin ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a jako negativní kontrola dimethylsulfoxid DMSO (0,1% a 0,01%). Obě kontroly byly testovány v ekvivalentních objemech s testovanými látkami. Screening veškerých sloučenin byl proveden v triplicátu, přičemž každá jamka obsahovala 100 μl suspenze. Desky byly zajištěny folií a inkubovány na třepačce v inkubátoru (150 rpm, 3 dny, 20 °C) po dobu 4 dnů.

3.6.2.6 Chitinasové testy pro háďátka *C. elegans*

Jednotlivé jamky byly pod invertovaným mikroskopem oskórovány – (a) usmrcení červi, (b) zástava vývoje háďátek (pouze první larvální stádia), (c) zpoždění vývoje červů (i jiná larvální stádia než první), (d) menší zpomalení vývoje či menším počet potomstva červů, (e) živá nezpomalená háďátka s počtem potomstva v normě. Pro odstranění zkondenzované kapaliny na folii byly desky stočeny v centrifuze (1500 rpm, 2 minuty). Do každé jamky byl přidán fluorogenní substrát 4-methylumbelliferyl β -D-N, N', N''- triacetylchitotriosid ($0,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 2,5 μl) pro měření aktivity enzymu chitinasy, který je produkován líhnoucími se larvami. Enzym rozkládá obal vajíček obsahující chitin a při kultivaci v tekutém médiu se do něj uvolňuje. Substrát je jím štěpen za vzniku fluorescenčního 4-methylumbelliferylu. Tento test umožňuje detekovat účinnost testované látky, přičemž nižší detekovaný signál značí absenci reprodukce a toxické vlastnosti sloučenin a naopak. Deska byla následně vložena do inkubátoru (1 hodina, 37 °C). Po inkubaci bylo přidáno 50 μl alkalického pufru do jednotlivých jamek a fluorescenční aktivita byla změřena přístrojem multifunkčního modulárního readeru při excitační vlnové délce 360 nm a emisní vlnové délce 460 nm.

3.6.3 Údržba a pěstování háďátka *B. mucornatus*

3.6.3.1 Příprava kultur *Botrytis cinerea*

Z CMA misek s narostlou plísní *Botrytis cinerea* byl sterilním skalpelem vyříznut čtverec 5 mm². Vzápětí byl tento přenesen na čerstvě připravenou CMA na Petriho miskách. Misky byly poté zajištěny parafilmem a vloženy do inkubátoru (2 týdny, 25 °C).

3.6.3.2 Kultivace a izolace *B. mucornatus* pro experimenty

Vyříznutím (sterilním skalpelem) čtverce o ploše 3 mm² z „maintenance“ CMA misek obsahující *B. mucornatus* byl umožněn transfer na čerstvě připravenou CMA misku

(podobně jako u *C. elegans*; Kapitola 3.6.2.2). Misky byly zajištěny parafilmem a vloženy do inkubátoru (3 týdny, 25 °C). Izolaci bylo možné provést dvěma způsoby, a to smytím háďátek z víček pomocí M9 média a přenesením do mikroskopavek (čistší populace; delší kultivace) či několikanásobným promytím (v zásadě dvakrát až třikrát) plísňových disků pomocí média M9 pro zajištění čistšího média a napipetováním do mikroskopavek (kratší kultivace; nutné promývání). Mezi jednotlivými promývacími kroky byli červi ponecháni samovolně klesnout ke dnu gravitací a po zhruba 15 minutách byla odebrána tekutina a přidáno M9 médium.

3.6.4 *D. destructor* – Údržba, kultivace, hodnocení anthelmické aktivity a chemotaktické testování

3.6.4.1 Příprava mrkvových disků

Olistěná a kohoutkovou vodou omytá mrkev po osušení byla vložena do 1 l 0,5% NaClO pro sterilizaci povrchu (30 minut). Ošetřené mrkve byly opláchnuty dH₂O a po tomto kroku veškerá práce probíhala v laminárním boxu. Sterilní kovovou škrabkou byla mrkev oškrábána a sterilním nožem nakrájena na 1,5 - 2 cm široké disky. Disky byly přeneseny na Petriho misky, na které byl nanesen parafilm a vloženy do inkubátoru (3 týdny, 25 °C).

3.6.4.2 Infekce mrkvových disků

K inokulaci háďátek *D. destructor* dochází teprve tehdy, kdy se na mrkvových discích začne objevovat kalus. K naočkování se používají sterilní háďátka, avšak pokud nejsou k dispozici lze použít i nesterilní kulturu ošetřenou antibiotikem steptomycinem (10 mg·ml⁻¹) a antimykotikem amfotericinem B (1 mg·ml⁻¹). Na mrkvové disky bylo rovnoměrně nanášeno 50–60 zdravých pohyblivých červů. Misky byly zajištěny parafilmem a inkubovány (přibližně 2–3 týdny, 25 °C).

3.6.4.3 Izolace háďátek z mrkvových disků

3.6.4.3.1 Izolace z čerstvých nedotčených mrkvových disků

Pokud bylo možné na mrkvových discích sledovat známky aktivity ve formě tmavých skvrn na discích či červů, jež disk opustili a zkoumají okolní prostředí, mohly být háďátka smyta pomocí 2 ml M9 média a vzápětí přepipetovat do mikroskopavky. Byl proveden několikanásobný oplach misek pro získání co největšího počtu nematod. Médium ve zkumavce

bylo dvakrát vyměněno pro odstranění nečistot, jež byly nechtěně smyty z misek během izolace.

3.6.4.3.2 *Izolace ze starších mrkvových disků*

Staršími mrkvovými disky se rozumí hnědé, kompletně změkklé disky, jež ztrácí integritu. V tomto případě je izolace provedena centrifugací. Mrkvové disky z Petriho misek byly lžičkou rozmačkány na kaši a byly přeneseny do adekvátně velké nesterilní Erlenmeyerovy baňky. Byla přidána dH₂O (40 ml na 3-4 disky, což naplní jednu 50 ml falkonu). Baňka byla umístěna na míchačku (20 minut, 15000 rpm). Dobře promíchaná směs byla přelita do zvážených falkonek, do kterých byl nanesen kaolín (5 g na jednu 50 ml falkonu) a falkony byly vloženy do centrifugy (4000 rpm, 4 min). Tekutina byla vylita do odpadu a k peletu byl doplněn roztok MgSO₄ · 7H₂O (40 ml). Pelet byl manuálně rozrušen plastovou tyčinkou, promíchán a protřepán. Byla provedena centrifugace falkonek (4000 rpm, 4 min). Jelikož hustota roztoku je podobná hustotě těla červů a vajíček, tak se háďátka v tomto koku vyskytují v supernatantu. Kvůli tomu byl roztok slit přes síťovinu (průměr pórů 23 μm) a červi byli zachyceni na síťovině, byli promyti dH₂O pro očištění od zbytků síranu tak, aby byli koncentrováni uprostřed. Červi byli ze síťoviny smyti médiem M9 (10 ml) do Petriho misky a přeneseni do zkumavky.

3.6.4.4 *Chitinasové testy pro háďátka *D. destructor**

Prvně byly ve třech 1 μl objemech spočítány a zprůměrovány vajíčka získané izolací ze starších mrkvových disků (předešlá kapitola). Vajíčka naředěná M9 médiem byla napipetována na 96-jamkovou desku (40 μl na jamku). Následně byla do nesterilního rezervoáru nachystána koncentrační řada buď NaN₃ s nejvyšší koncentrací 20 mmol·l⁻¹ anebo testovací látky L-32 s nejvyšší koncentrací 100 μmol·l⁻¹. Další koncentrace byly vždy dvakrát menší než koncentrace předešlá. Negativní kontrolou bylo DMSO. Jako pozitivní kontrola u testujícího vzorku L-32 byl použit NaN₃. Všechny naředěné roztoky byly napipetovány do destičky k vajíčkům po 40 μl na jamku. Destička byla poté vložena na třepačku (3 dny, 25 °C).

Do každé jamky na desce bylo napipetováno 2 μl substrátu pro chitinasu (stejně jako v kapitole 3.6.2.6). Následně byla deska inkubována (1 hodina, 37 °C). Po inkubaci bylo do jednotlivých jamek přidáno 40 μl alkalického pufru pro zastavení reakce mezi chitinasou a

substrátem. Hned poté byla změřena fluorescenční aktivita multifunkčním modulárním readerem (excitace: 360 nm a emise: 460 nm).

3.6.4.4.1 *Statistické zpracování dat chitinasových testů*

Pro sestavení jednotlivých grafů a pro statistickou analýzu dat byl použit biostatistický program GraphPad Prism 8.0.1. Pro zhodnocení normality distribuce dat byl použit Shapiro-Wilk test. Pro srovnání dvou datasetů byl použit nepárový Studentův t-test, případně Mann-Whitney test jestliže data neměla normální distribuci. Pro hodnocení větších datasetů byla využita jednofaktorová (one-way) ANOVA a Dunnettův post-hoc test, případně neparametrický Kruskal-Wallis test a Dunnův post-hoc test, jestliže data neměla normální distribuci. Jako statisticky významný výsledek je považován ten výsledek, jehož p-hodnota byla statistickou analýzou spočtena jako nižší než 0,05. V grafech byla p-hodnota označena jako: ns (p-hodnota > 0,05; nesignifikantní výsledek), * (p-hodnota ≤ 0,05; signifikantní výsledek); ** (p-hodnota ≤ 0,01; signifikantní výsledek); *** (p-hodnota ≤ 0,001; signifikantní výsledek); **** (p-hodnota ≤ 0,0001; signifikantní výsledek).

3.6.4.5 Hodnocení anthelmintické/nematicidní aktivity na wMT

Vyizolovaná sterilní směsná populace háďátek (*C. elegans* pouze smyti médiem M9 z „maintenance“ misek; *B. mucronatus* viz kapitola 3.6.3.2; *D. destructor* viz kapitola 3.6.4.3.1) byla spočítána a naředěna tak, aby koncentrace činila 600–700 kusů na 1 ml M9 média. Takto připravená suspenze červů byla přenesena do rezervoáru a následně multikanálovou pipetou za stálého míchání byla suspenze přenesena na mikrotitrační destičky (45 µl na jamku). Desky byly vloženy na třepačku (150 rpm, 30 minut, 25 °C). Následně byly desky vloženy do wMT a změřila se počáteční pohyblivost červů.

Mezitím byla do nesterilního rezervoáru nachystána koncentrační řada testované látky L-32 v M9 médiu o šesti koncentracích, kdy nejvyšší činila 200 µmol·l⁻¹. Ostatní koncentrace byly vždy dvakrát nižší než předešlá koncentrace. Po změření pohyblivosti háďátek byly jednotlivé jamky otráveny výše zmíněnou zředěnou koncentrační řadou látky L-32. Do otrávených jamek bylo přidáno DMSO tak, aby v každé podmínce byla stejná koncentrace DMSO (0,4%). Pro každou podmínku byl vymezen celý řádek na mikrotitrační destičce. Do dalších řádků byla přidána negativní kontrola 0,4% DMSO zředěná v M9 médiu a negativní kontrola 10 mmol·l⁻¹ NaN₃ zředěná taktéž v M9 médiu. Veškeré látky byly napipetovány do mikrotitrační desky po 45 µl na jamku. Deska byla zajištěna folií a hned

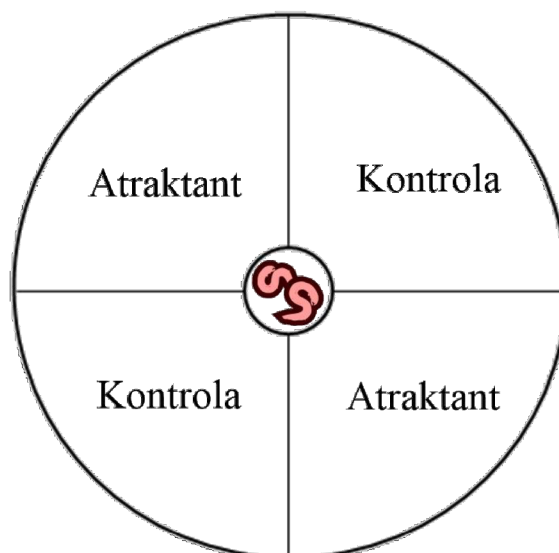
poté třepána na třepačce (150 rpm, 3 dny, 25 °C). Po uplynutí stanovené doby otravy háďátek byla deska vložena do wMT a byla změřena aktivita hlístů.

3.6.4.5.1 Statistické zpracování dat z wMT testování

Pro sestavení jednotlivých grafů a pro statistickou analýzu dat byl použit biostatistický program GraphPad Prism 8.0.1. Pro analýzu byla využita dvoufaktorová korelovaná ANOVA (two-way repeated measures ANOVA) a následnou Holm-Šídákovou post-hoc analýzou. Jako statisticky významný výsledek je považován ten výsledek, jehož p-hodnota byla statistickou analýzou spočtena jako nižší než 0,05. V grafu byla p-hodnota označena jako: ns (p-hodnota > 0,05; nesignifikantní výsledek), * (p-hodnota ≤ 0,05; signifikantní výsledek); ** (p-hodnota ≤ 0,01; signifikantní výsledek); *** (p-hodnota ≤ 0,001; signifikantní výsledek); **** (p-hodnota ≤ 0,0001; signifikantní výsledek).

3.6.4.6 Testy založené na chemotaxi

Předpokladem tohoto testu je umístit háďátka na vyznačenou „startovní dráhu“ a pozorovat jejich pohyblivost ve směru chemického atraktantu. Izolovaní dospělci *D. destructor* z čerstvých mrkvových disků (Kapitola 3.6.4.3.1) byli naředit tak, aby koncentrace suspenze háďátek činila 50 červů/Petriho misku. Doprostřed předem zvýrazněného kruhu na Petriho misce sloužící jako „startovní dráha“ bylo přidáno 10 μl suspenze červů (Obrázek 13). Na jednu agarovou plotnu byla nanesena (do dvou sektorů ze čtyř) nesterilním nožem nakrájená část kořene zeleniny (cibule, mrkev, brambor) o velikosti cca 3 mm², čtvereček agaru s plísní *B. cinerea* o stejné velikosti anebo 1 mmol·l⁻¹ škrobu v dH₂O (5 μl). Do dalších dvou sektorů vždy naproti sobě byla napipetována kontrola – 5 μl dH₂O (Obrázek 13). Misky byly ponechány ve tmě při pokojové teplotě na 1–1,5 hodiny, avšak každých 10 minut byla kontrolována migrace háďátek. Následně skenerem byl pořízen obraz misek s vysokým rozlišením a manuálním spočítáním byla vyhodnocena pohyblivost červů v podobě chemotaktického indexu od škály hodnot – 1 až + 1, podle chemotaktického přitahování háďátek k atraktantu či kontrole. Ze získaných dat byly softwarem GraphPad Prism 8.0.1 sestaveny jednotlivé grafy.



Obrázek 13: Petriho miska (60 mm) byla rozdělena do čtyř kvadrantů – atraktant či kontrola. Prostřední kruh určuje oblast, kde byli naneseni červi (u této oblasti nebyl bodován pohyb). Střídavé kvadranty zabraňují zkreslování výsledků.

3.6.5 Cytotoxické testování

Buněčná linie HaCaT a BJ byly pěstovány v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) s 10% fetálním sérem, 1% penicilinem-streptomycinem a 1% L-glutaminem za podmínek 37 °C a 5 % CO₂, kdežto linie ARPE-19 byla kultivována v médiu DMEM F12. Veškeré chemikálie byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich s.r.o. Pasážování buněk, které se provádělo co 2 – 3 dny, probíhalo následovně: staré kultivační médium bylo odsáto a hned potom bylo k buňkám napipetováno 2 ml fyziologického roztoku (PBS – solný roztok pufrovaný fosfátem), který byl vzápětí také odsán. Buňky byly tímto promyty od zbytků fetálního séra, jež by mohlo bránit tvorbě vazby mezi proteolytickým trypsinem a buňkami. Byl přidán roztok trypsinu (2 ml), který umožnil uvolnění buněk ze dna a poté misky byly vloženy do inkubátoru (5 minut, 37 °C). Enzymatická reakce byla zastavena nanesením kultivačního média DMEM/DMEM F12 (5 ml) a pipetou byl objem na Petriho misce promíchán. Zhruba dvě třetiny buněk byly přeneseny do zkumavky a jedna třetina byla ponechána na Petriho misce (1,5 ml suspenze). Posléze k buňkám na Petriho misce bylo dodáno dalších 5 ml kultivačního média a ty byly inkubovány (5 % CO₂, 37 °C) do dalšího pasážování.

Odpipetovaný zbytek ve zkumavce byl stočen v centrifuze (5 minut, 1000 rpm, 25 °C), supernatant byl odsán a k buňkám v peletu bylo přidáno kultivační médium (10 ml). Stočením se zbavilo zbytků trypsinu. Následně byly buňky spočítány pomocí Bürkerovy komůrky, čímž byl zjištěn přibližný počet buněk ve zkumavce. Následovalo předpřípravení

suspenze pro nanesení na 96-jamkové destičky. Buňky byly zředěny, tak aby jejich výsledný objem činil 5000 buněk na jamku (80 μ l) pro linie HaCat a BJ, avšak pro linie ARPE-19 byl objem vyšší, a to 7000 buněk na jamku (80 μ l). Mikrotitrační desky byly následně inkubovány (24 hodin, 37 °C).

Testovaná látka L-32 byla rozpuštěna v DMEM médiu (5x vyšší koncentrace, než byla finální požadovaná) a 20 μ l suspenze bylo v triplikátu napipetováno do jednotlivých jamek v destičkách s buňkami. Látka byla testována v šesti koncentracích, přičemž nejvyšší koncentrace byla 50 μ mol \cdot l⁻¹ a další byly vždy dvakrát menší. Pro negativní kontrolu byl použit ekvivalentní objem DMSO a pro odečtení pozadí umožňující vyhodnocování cytotoxické aktivity látky byl napipetován slepý vzorek – čisté DMEM bez buněk. Desky byly vloženy do inkubátoru (3 dny, 5 % CO₂, 37 °C).

Do jednotlivých jamek bylo napipetováno 100 μ mol \cdot l⁻¹ resazurinu v DMEM a následně desky byly vloženy do inkubátoru (3 hodiny, 37 °C). Resazurin je slabě fluorescenční barvivo, které se po vniknutí do buněk přes cytoplazmatickou membránu nevratně redukuje na silně fluorescenční resofurin. Detektorem multifunkčního modulárního readeru byl tak změřen fluorescenční signál resofurinu (excitace: 544 nm; emise: 590 nm).

4 Výsledky a diskuse

4.1 Organická syntéza

Sloučenina **4** byla vytvořena podle známého protokolu jejichž autory byli K. Ikeuchi, K. Murasawa a H. Yamada z Univerzity Hokaido.¹¹⁵ Avšak postup, který byl použit v této diplomové práci se lišil v použitém rozpouštědle, čímž bylo CH₂Cl₂. Tato změna byla navržena Mgr. Danielem Chrenkem. Byla pozorována reakce 3,4-dimethoxybenzylalkohol **1** (připravený výzkumnou skupinou doc. RNDr. Jiřího Pospíšila, Ph.D.) s trichloracetonitrem **2** v přítomnosti katalytického množství 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en **3** za vzniku látky **4** (Kapitola 3.6.1.2).

Poskytnutý imidát **4** v dalším syntetickém kroku reagoval s alkoholem **5** již předem připraveným výzkumnou skupinou doc. RNDr. Jiřího Pospíšila, Ph.D. rozpuštěným v CH₂Cl₂ (Kapitola 3.6.1.3). Z reakční směsi vznikla sloučenina **L-32** s celkovým výtěžkem 95,1% (Schéma 1). Tento syntetický krok byl navržen Mgr. Danielem Chrenkem, jenž vytvořil celý syntetický postup přípravy **L-32**. Pilotní syntéza **L-32** byla provedena výzkumnou skupinou doc. RNDr. Jiřího Pospíšila, Ph.D., avšak z důvodu omezeného množství sloučeniny **L-32**, bylo nutné ji připravit ve větším množství pro další biologické testování.

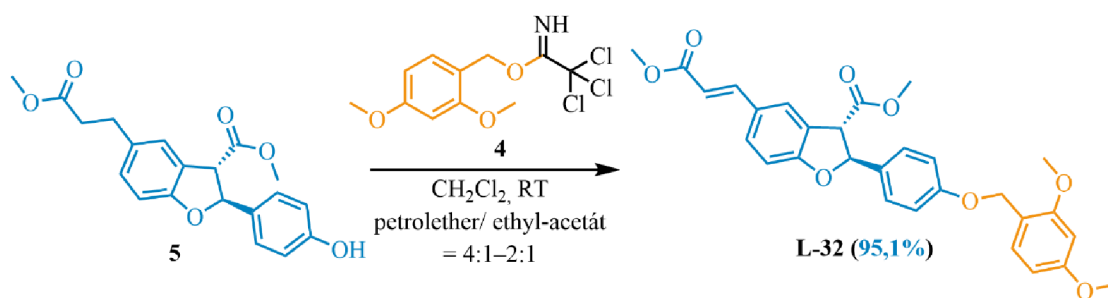


Schéma 1: Příprava karboxylátu (sloučeniny **L-32**) s 95,1% výtěžkem.

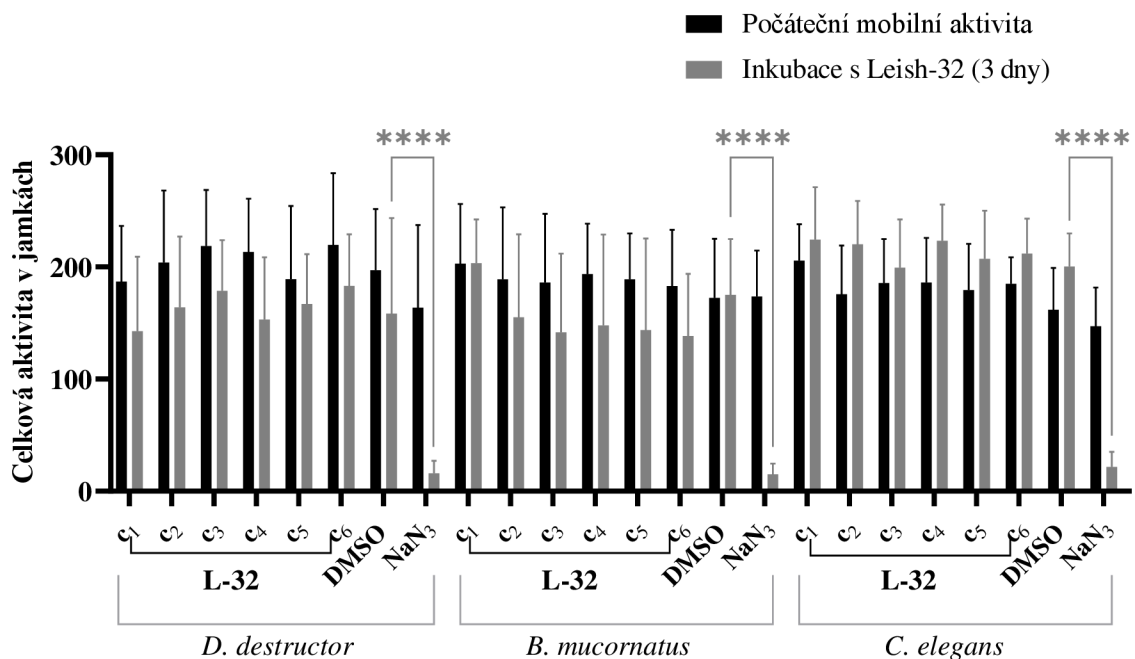
4.2 Anthelmintická a nematicidní aktivita

4.2.1 Hodnocení mobility háďátek pomocí wMT

Využitím wMT je možné sledovat pohybovou aktivitu populace červů v mikrotitračních deskách na základě počtu zlomů infračerveného paprsku, jímž přístroj jamky prozařuje. Pohybující se červi paprsek narušují a počet jeho zlomů je následně detekován.^{110,113}

Jedním z cílů této diplomové práce bylo optimalizovat již rozpracovaný postup testování na wMT zejména pro fytopatogenní červy *D. destructor*. Nejprve byl přístroj

využit pro experiment se třemi různými, vývojově nesynchronizovanými červy – fytopatogenní *D. destructor* a pro srovnání i mykofágní *B. mucornatus* a volně žijící *C. elegans* (Graf 1). Připravená hád'átka pro wMT testování (Kapitola 3.6.4.5) byla inkubována po dobu 3 dnů s látkou **L-32** (Tabulka 2) v šesti různých koncentracích $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $6,25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Veškeré koncentrace pro jednotlivé červy byly aplikovány v technickém tetraplikátu a experiment byl třikrát zopakován. Ještě před zahájením daného experimentu byla zjištěna nejvyšší možná koncentrace, při které byla sloučenina **L-32** rozpustná v DMSO. Jednalo se o koncentraci $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Látka **L-32** byla připravena výzkumnou skupinou doc., RNDr. Jiřího Pospíšila, Ph.D. V testu bylo negativní kontrolou rozpouštědlo DMSO v ekvivalentním objemu jako látky ($0,4\%$) a jako pozitivní kontrola byl použit $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaN}_3$.



Graf 1: Vyjádření počtu detekovaných zlomů paprsku u populací červů *D. destructor*, *B. mucornatus* i *C. elegans* před a po třídní inkubaci hád'átek s látkou **L-32** v šesti různých koncentracích c_{1-6} (c_1 - $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, c_2 - $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, c_3 - $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, c_4 - $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, c_5 - $12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a c_6 - $6,25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Veškeré koncentrace pro jednotlivé červy byly aplikovány v technickém tetraplikátu a experiment byl třikrát zopakován. Jako pozitivní kontrola byl použit $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaN}_3$. Negativní kontrolou bylo $0,4\%$ DMSO. Hvězdičky značí statistickou signifikanci (two-way RM ANOVA a Sidak post-hoc test; vysvětlivky: **** $p > 0,0001$). Chybové úsečky odrážejí standardní chybu.

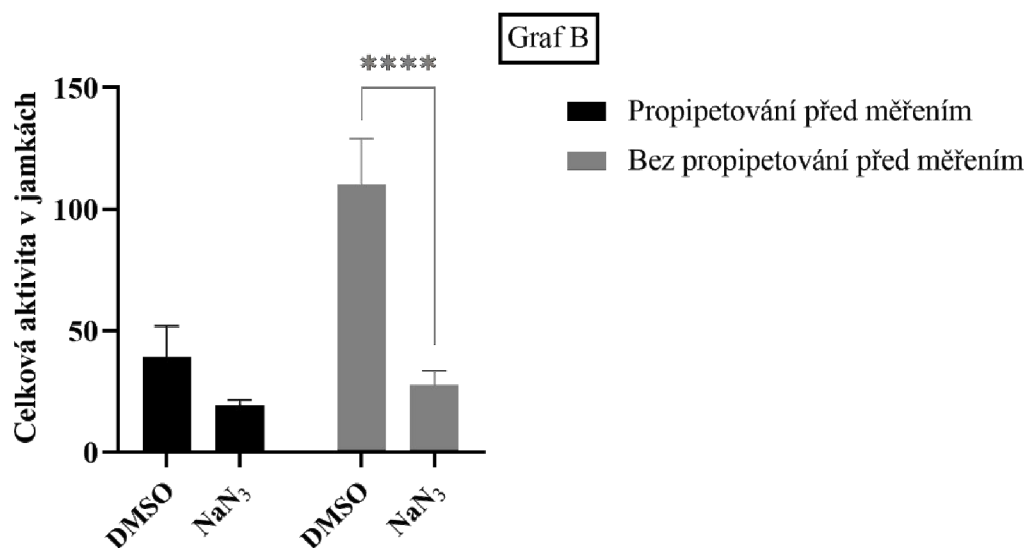
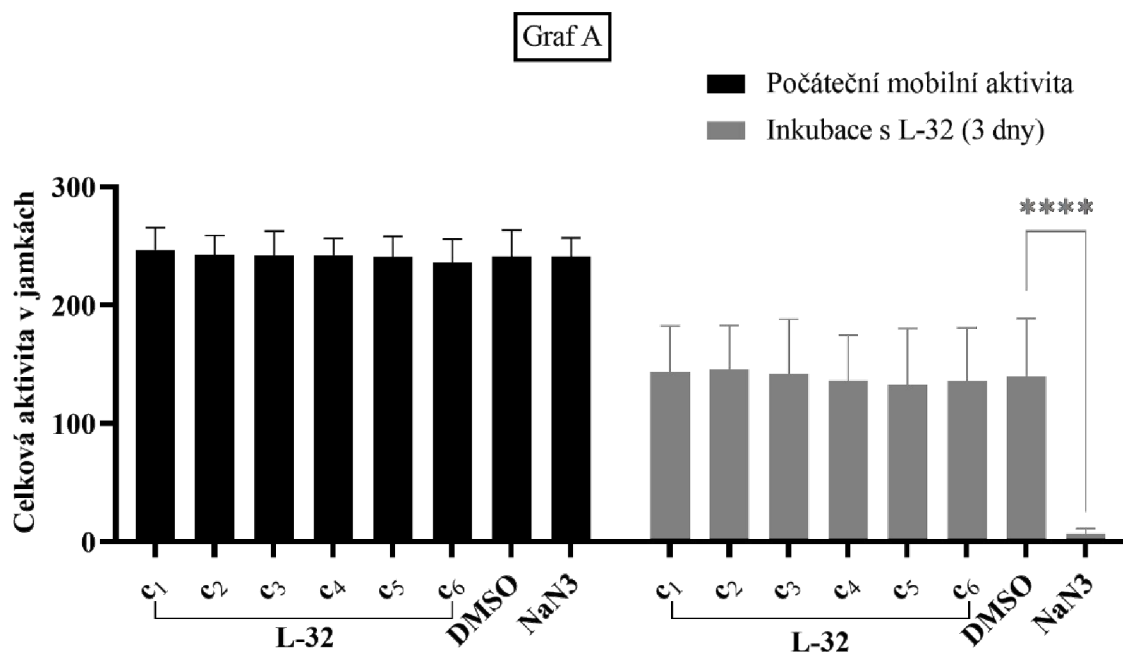
Naměřená data u jednotlivých červů byla značně variabilní a nebylo proto možno přesně vyhodnotit, zda **L-32** má v těchto testech aktivitu. Variabilita byla způsobena dle našeho názoru tím, že červi po inkubaci na třepačce byli roztroušeni v celém roztoku. Z toho

důvodu nepřisedali ke dnu mikrotitrační destičky, čímž nejspíše spousta z nich v prvních minutách měření unikla detekci. V porovnání s ostatními červy (*D. destructor* a *B. mucronatus*) byli *C. elegans*, vyjma populace vystavené pozitivní kontrole, zdánlivě více mobilní na konci experimentu než na začátku. Bylo to zapříčiněno zřejmě tím, že červi byli kultivováni bez potravy. Vyhladovělé populace *C. elegans* se stávají aktivnějšími (Internetový zdroj 5). Jelikož u zbylých dvou parazitů nebyl přídavek potravy do experimentu možný, nebyli krmeni ani *C. elegans*. Přítomnost potravy pouze u jednoho druhu by vedla k rozdílu v efektivitě vstřebávání látky a případnému ovlivnění výsledků. Vyšší turbidita roztoku kvůli přítomnosti bakterií by taktéž mohla ovlivnit výsledky měření na wMT. Zdá se však, že pro získání přesnějších výsledků bude pro tento druh třeba potravu do budoucích experimentů přidat.

Dalším experimentem (Graf 2 B) byla ověřena naše hypotéza, že pokud by před měřením byli jednotliví červi propipetováni/třepáni, míra naměřeného signálu by se snížila z důvodu neklesnutí červů ke dnu mikrotitrační destičky. Spousta červů by tak unikla detekci. V dalších experimentech proto byly mikrotitrační destičky ponechány na stabilní podložce po dobu 30 minut při 25 °C.

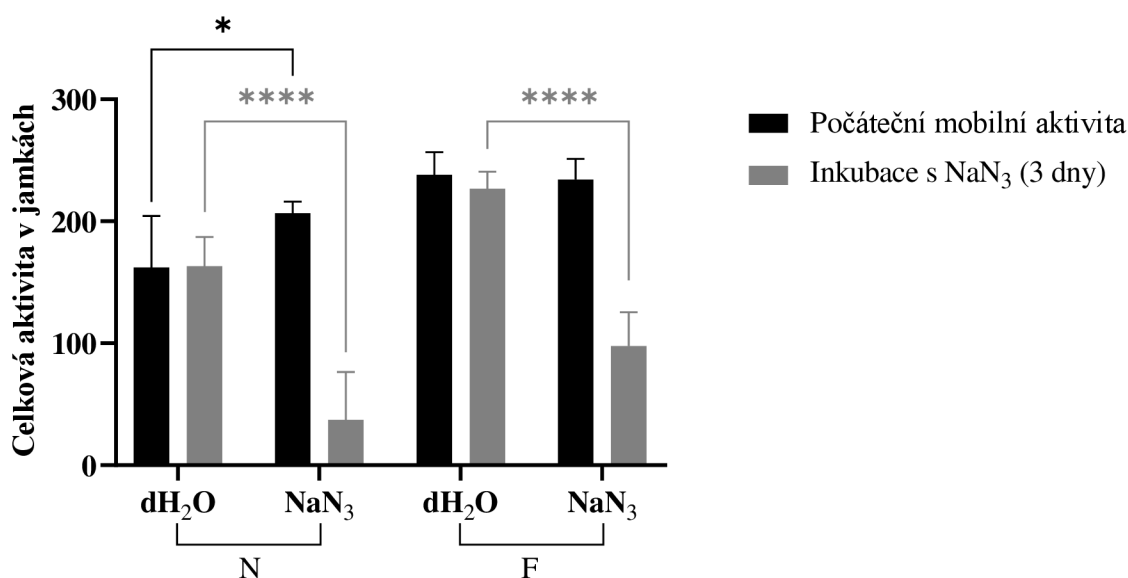
Experiment s **L-32** byl poté zopakován tentokrát pouze s fytopatogenními červy *D. destructor*, jež byli z hlediska této práce nejzajímavější (Graf 2 A). Kromě ustálení červů, veškeré podmínky zůstali stejné jako u prvotního wMT testu (Grafu 1). Díky této změně se variabilita výrazně snížila v porovnání s předchozím experimentem (Graf 1), avšak další komplikací, která nastala, byl nezvykle nižší signál celkové mobilní aktivity v jamkách po třídní inkubaci červů oproti počáteční mobilní aktivitě i v negativní kontrole (DMSO). To nebylo konzistentní s trendem, jež ve svých dřívějších experimentech pozorovala vedoucí práce. Bližší prozkoumání kultury *D. destructor* odhalilo výskyt kontaminace jiným druhem háďátka. Druh nebyl přesně určen, dle názoru expertů z ÚKZÚZ a nematologů z Bonnu, kteří byli dotázáni, se však jednalo o volně žijící druh z řádu *Rhabditida*. Původní populace *D. destructor* byla získána z bramborových hlíz pěstovaných na polích a při jejich sběru bylo zřejmě z půdy izolováno i několik háďátek jiného druhu, která se časem v kultuře přemnožila. Tento neznámý druh háďátka zřejmě snášel kultivaci na deskách hůře, než dřívější populace tvořená z drtivé většiny *D. destructor*, což způsobilo pozorovaný pokles v kontrolních jamkách. Po tomto zjištění naši spolupracovníci z ÚKZÚZ laskavě svolili kontaminovanou populaci červů přechistit. Kvůli zmíněným důvodům naměřená data (Graf 2

A) patrně není možné použít pro spolehlivé posouzení efektu testované látky v *D. destructor*.



Graf 2: Vyjádření počtu detekovaných zlomů paprsku u populací u červů *D. destructor* před a po třídenní inkubaci hádátek s látkou L-32 v šesti různých koncentracích c_{1-6} (c_1 -200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, c_2 -100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, c_3 - 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, c_4 -25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, c_5 - 12,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a c_6 -6,25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) pro graf A. Veškeré koncentrace byly aplikovány v technickém dodekaplikátu a experiment byl třikrát zopakován. Pozitivní kontrola pro graf A i B byl použit 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaN₃. Negativní kontrolou bylo 0,4% DMSO (graf A i B). Hvězdičky značí statistickou signifikanci (two-way RM ANOVA a Sidak post-hoc test; vysvětlivky: **** $p > 0,0001$). Chybové úsečky odrážejí standardní chybu. Graf B znázorňuje celkové aktivity červů *D. destructor* v jamkách při změně podmínek aplikace červů do jamek – propipetování před měření a bez propipetování před měřením.

Po obdržení již purifikované populace *D. destructor* bylo ověřeno chování nových červů při hodnocení pohyblivosti na wMT, jež bylo zároveň spojeno ještě s dalším optimalizačním krokem. Tím bylo zvýšení populace červů na koncentraci 50 háďátek/jamka, což dle některých studií může vést ke snížení experimentální chyby.¹¹³ Zároveň byla část populace červů zfiltrována pomocí síťoviny s větší velikostí pórů (115 μm) pro odstranění vajíček a také prvních larválních stádií (J_1), což mělo za cíl populaci částečně věkově synchronizovat, a tím výsledky potenciálně dále zpřesnit (Graf 3). Celková aktivita červů *D. destructor* v testovaných jamkách byla měřena před a po třídní inkubaci s pozitivní kontrolou $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{NaN}_3$. Negativní kontrolou byla dH_2O . Byly testovány dvě různé podmínky – aplikace 50 nefiltrovaných (N) červů na jamku a aplikace 50 filtrovaných (F) červů na jamku.



Graf 3: Vyjádření počtu detekovaných zlomů paprsku u populací u červů *D. destructor* před a po třídní inkubaci háďátek s pozitivní kontrolou $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{NaN}_3$ a negativní kontrolou dH_2O . Veškeré koncentrace byly aplikovány v technickém hexaaplikátu. V grafu jsou vyjádřeny dvě různé podmínky – aplikace 50 nefiltrovaných (N) červů/jamku a aplikace 50 filtrovaných (F) červů/jamku. Hvězdičky značí statistickou signifikanci (two-way RM ANOVA a Sidak post-hoc test; vysvětlivky: * $p = 0,0491$), **** $p > 0,0001$). Chybové úsečky odrážejí standardní chybu.

Nová populace červů se chovala dle očekávání a ke snížení mobility v kontrolách po třídní inkubaci už nedocházelo. Částečná věková synchronizace pravděpodobně k zpřesnění výsledků napomohla. U zfiltrovaných červů byla zaznamenána nižší variabilita mezi technickými replikáty. Avšak experiment by se ještě musel zopakovat pro další posouzení, jestli není zdánlivé zlepšení dáno jen drobnými nepřesnostmi v přípravě

experimentu. Zatím nemůžeme zcela jistě posoudit, zda-li přidání dalšího kroku a z něj vyplývající zvýšení pracnosti experimentu by vedlo ke kýženým výsledkům. Mikroskopické pozorování navíc odhalilo, že filtrace je nedokonalá, z důvodu objevení značného množství vajíček a J_1 červů i ve zfiltrované suspenzi. Pokud by byla objevena metoda, která by umožňovala červy lépe vývojově synchronizovat (více diskutováno v následující kapitole), zlepšila by se nejspíše kvalita testování, protože odlišná velikost a z ní vyplývající schopnost červů vytvořit zlom infračerveného paprsku mezi jednotlivými vývojovými stádii screeningu patrně neprospívá. Zároveň bylo zajímavé, že motilita v pozitivní kontrole u zfiltrované populace byla vyšší než u nezfiltrovaných červů. Pravděpodobně byla dána tím, že i nedokonalou synchronizací bylo v populaci docíleno větší proporce dospělců, jež jsou k NaN_3 možná odolnější než vývojově nižší stádia červů. Tato hypotéza by také potřebovala další ověření, na základě kterého by možná bylo třeba upravit koncentraci pozitivní kontroly.

Jelikož přečistění populace vedlo ke značnému zpoždění experimentů, z časových důvodů už nebylo možno dotestovat látku **L-32**, u které by se však tento v rámci možností optimalizovaný test mohl použít do budoucna. Avšak bylo by nutné ještě několikrát dané testování zopakovat, aby byla optimalizace zcela potvrzena.

Navzdory technickým komplikacím ani v jednom z experimentů nebyl v žádném druhu hlístice pozorován po expozici látky **L-32** výrazný pokles mobility blížící se pozitivní kontrole. Je pravděpodobné, že látka přímý toxický efekt v tomto druhu testu zřejmě na červy nemá. To není úplně překvapivým zjištěním, jelikož v původních chitinasových testech na *C. elegans*, kde byla aktivita látky odhalena, **L-32** způsobovala spíše zastavení/zpomalení vývoje a sníženou reprodukční schopnost červů. Její mechanismus účinku není znám, avšak pravděpodobně nebude přímo usmrcovat či paralyzovat červy.

4.2.2 Chitinasové screeniny

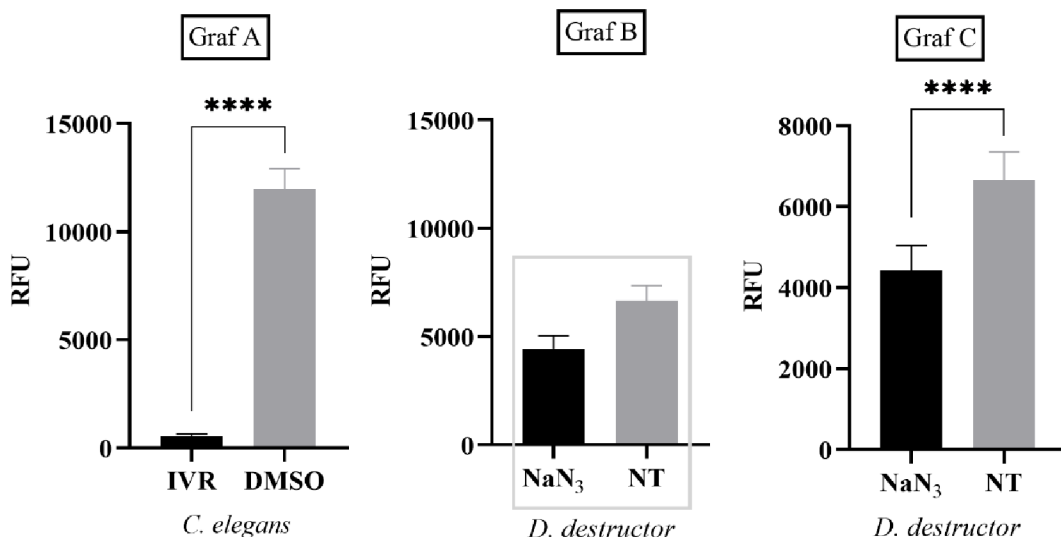
4.2.2.1 Testování nematocidní aktivity látky L-32 na háďátcích *D. destructor*

Metoda chitinasových screeningů se v laboratoři Mgr. Aleny Kadlecové, Ph.D. běžně používá pro testování chemických sloučenin na *C. elegans* pro zkoumání vlivu látek na těchto červech. Jak již bylo řečeno v kapitole 3.6.2.6, tyto screeniny využívají enzym chitinasy, jenž štěpí fluorogenní substrát 4-methylumbelliferyl β -D-N, N', N''-triacetylchitotriosid na fluorescenční 4-methylumbelliferyl. Naměřená fluorescence poté umožní posouzení reprodukční aktivity červů po inkubaci s testovanými látkami. Vyšší intenzita detekovaného signálu značí nižší toxicitu testované sloučeniny pro reprodukci, vývoj a úmrtnost háďátek. Látka **L-32** (Tabulka 2), jež byla v této diplomové práci hojně

využívaná, byla připravena výzkumnou skupinou doc. Jiřího Pospíšila a v chitinasovém testu na *C. elegans* vykazovala aktivitu (Tabulka 1). Jedním z cílů této závěrečné práce bylo optimalizovat chitinasový test i na fytopatogenních červech *D. destructor* zejména pro ověření, zda-li látka **L-32** vykazuje obdobný efekt ve zmíněném háďátku jako v *C. elegans*. Optimalizací tohoto testu určeného přímo na *D. destructor* by se snížilo spektrum látek, jež by bylo účinné proti *C. elegans*, avšak nebylo by aktivní proti PPN.

V laboratoři Mgr. Aleny Kadlecové, Ph.D. se jako pozitivní kontrola hojně používá ivermektin, který brání vývoji červů a tím zastaví další množení, avšak nedisponuje přímými ovicidními účinky. Kvůli rozdílům v životním stylu není možné tento test provádět v *D. destructor* stejně, jako v *C. elegans*, tzn. nechat červy vystavené látce projít celým životním cyklem a zkoumat produkci potomstva. Červi *D. destructor* byli v suspenzi bez potravy. Pro testy s parazitem jsme využívali přímo vajíčka izolovaná ze starších mrkvových disků pomocí centrifugace, a bylo proto nutné použít jako kontrolu přímo ovicidní látku.^{117,118} Z tohoto důvodu byl vybrán jako pozitivní kontrola NaN_3 , u kterého byl v naší laboratoři přímý ovicidní efekt již dříve potvrzen mikroskopickým pozorováním s použitím vajíček *C. elegans*.

V grafu 4 jsou ukázány pro porovnání reprezentativní data, jež ukazují intenzitu fluorescence (relativní jednotka fluorescence – RFU) naměřenou u *C. elegans* inkubovaných po dobu 4 dnů s a bez pozitivní kontroly ivermektinu (Graf 4 A) a RFU data z prvotního zkušebního experimentu pro červa *D. destructor* (1000 vajíček/jamku) inkubovaného po dobu 7 dnů s a bez $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{NaN}_3$ (Graf 4 B a C). Ačkoliv je možno pozorovat rozdíl mezi kontrolami u grafu 4 B a C, dle našich standardů nebyl zcela přesvědčivý v porovnání s kontrolami u grafu 4 A. V negativních kontrolách byl u *C. elegans* (Graf 4 A) naměřen výrazně vyšší signál než u *D. destructor* (Graf 4 B a C). Rozdíl byl i přesto nepárovým Studentovým t-testem vyhodnocen jako signifikantní (p-hodnota 0,0001).



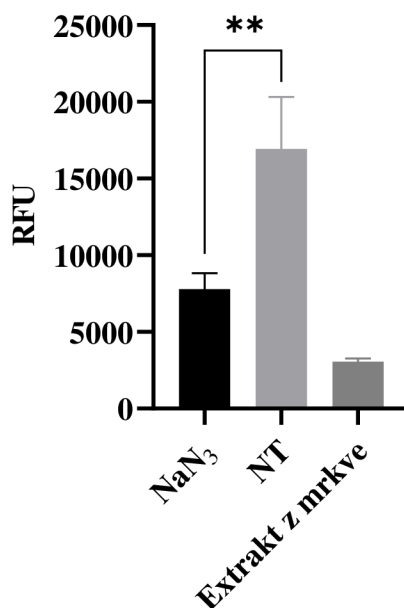
Graf 4: A) Hodnoty RFU (technický tetraplikát) po čtyřdenní inkubaci populací *C. elegans* s běžně používanou pozitivní ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ivermektin) a negativní (0,1% DMSO). B) Hodnoty RFU (technický dodekaplikát) po sedmi denní inkubaci populací *D. destructor* s pozitivní ($10 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaN₃) a negativní (pufr M9) kontrolou. Pro lepší vizuální srovnání výsledků mezi oběma druhy je na ose Y použito stejné měřítko jako v grafu A. C) Jiná prezentace (menší měřítko osy Y) dat ukázaných v grafu B pro lepší vizuální zhodnocení rozdílů mezi kontrolami. V experimentu znázorněném v grafu A bylo aplikováno 30 červů/jamku. V experimentu znázorněném v grafech B a C bylo aplikováno 1000 vajíček/jamku. Hvězdičky značí statistickou signifikanci (nepárový Studentův t-test; vysvětlivky: **** p -hodnota > 0,0001). Chybové úsečky značí standardní chybu.

Dalšími prvotními chitinasovými testy na háďátkách *D. destructor* byly z výše popsaných důvodů zjišťovány podmínky, které by data vylepšily – různé koncentrace pozitivní kontroly NaN₃, různé počty aplikovaných vajíček na jamku a různá délka inkubace sloučenin s červy. Bylo testováno celkem sedm koncentrací NaN₃, a to $20 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $5 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $2,5 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1,25 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,625 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $3,125 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Do jamek bylo aplikováno 1700 vajíček/jamku, 1000 vajíček/jamku a 600 vajíček/jamku. Tímto způsobem připravené desky byly změřeny při intervalu inkubace 3 dnů, 10 dnů, 14 dnů a 28 dnů. Veškerá naměřená data však byla vysoce variabilní a nebyla v této diplomové práci zahrnuta. Z daných dat žádné nové kloudné informace nebyly zjištěny.

Pro snížení variability a také pro snížení signálu pozadí, jež je v grafech 4B a 4C patrný, bylo rozhodnuto vyzkoušet přečištění kultury vajíček. Dle našeho názoru bylo pozadí dáno přítomností velkého počtu starých a odumřelých červů, jež pravděpodobně vykazovali vysokou míru autofluorescence.¹¹⁹ Metodou centrifugace jsou totiž vyjma vajíček z kultury izolovány i všechny ostatní larvální stádia, dospělci ale i odumřelí červi. Možnou výtka může být, že u experimentu s *D. destructorem* byl použit jiný pufr (Kapitola 3.6.4.4) než u *C. elegans* (Kapitola 3.6.2.5), jež by za pozadí mohl být zodpovědný. Avšak dle našich

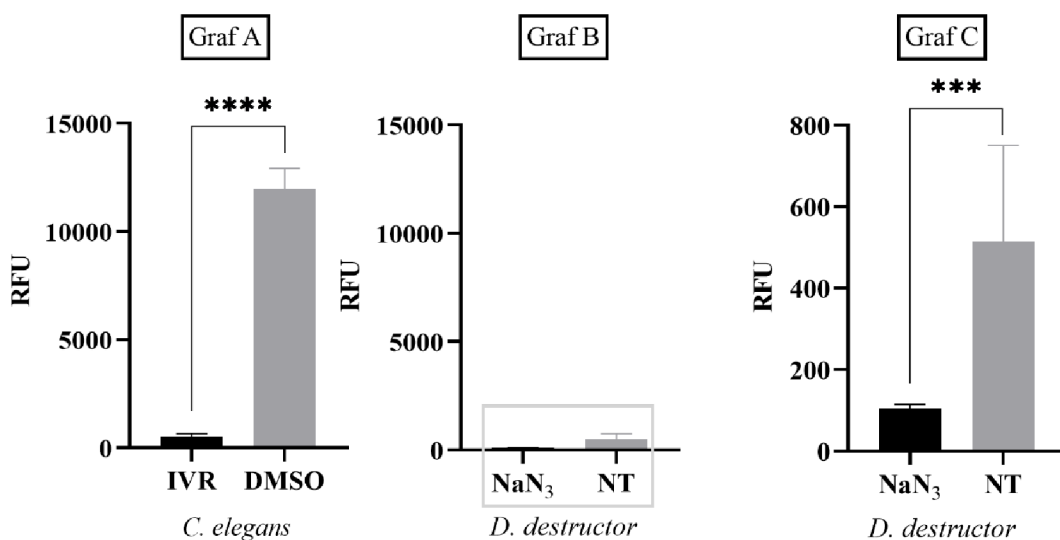
dlouhodobých zkušeností čistý pufr M9 produkuje jen velmi malý signál (př. Graf 7A níže) a ani v původním článku Ellerbrock a spol., kde byl používán, s výsledky neinterferoval.¹¹¹ Pravděpodobně se tedy na zvýšeném pozadí nepodílí. Kultura červů izolovaná ze starších mrkvových disků (Kapitola 3.6.4.3.2) měla být přečištěna postupem podobným vývojové synchronizaci háďátek *C. elegans* (Kapitola 3.6.2.4) za použití různých koncentrací roztoku NaClO (10%, 7% a 3%) a různé délky inkubace na třepačce. Avšak tento pokus nebyl úspěšný, protože i když roztok dospělce a larvy usmrtil, nedošlo k jejich rozpuštění. *D. destructor* má tedy podle všeho chemicky odolnější kutikulu, než *C. elegans*. Po několikadenní inkubaci takto připravených suspenzí navíc nebyly pozorovány nové pohyblivé larvy, žádná nová vajíčka se tedy zřejmě nevylíhla. Dále byl proto přidán další krok filtrace prvotní suspenze přes síťovinu s většími póry (115 μm , za použití 10 ml M9 pufru). Metoda nebyla dokonalá, avšak mikroskopickým pozorováním bylo zjištěno, že k částečnému oddělení populace vajíček a nižších larválních stádií (J_1 , částečně i J_2) od dospělců a větších larev (většina J_3 a J_4) došlo. Tento krok byl proto nadále používán i v níže zmíněných experimentech (Graf 5, 6, 7).

Z malého rozdílu v aktivitě enzymu mezi kontrolami jsme dále usoudili, že líhnutí vajíček *D. destructor* nejspíše nebylo dostatečné. Důvodem by možná mohla být absence potřebného stimulantu. Mechanismy na základě, kterých dochází u tohoto druhu ke stimulaci líhnutí, zatím nebyly dle našeho vědomí popsány. U jiných druhů PPN je však líhnutí ovlivňováno například teplotou, vlhkostí, přítomností kyslíku či chemickými stimuly od hostitele.¹²⁰ V literatuře je také popsáno, že u cystotvorných háďátek je možné líhnutí stimulovat přidáním ZnCl_2 .¹²¹ Jelikož byl *D. destructor* v průběhu našich experimentů inkubován v ideální teplotě, v tekutině a na třepačce, jež by měla zajistit dobrou aeraci suspenze, tyto parametry lze zřejmě vyloučit. V dalších experimentech tedy byla snaha o stimulování líhnutí vajíček *D. destructor* pomocí přidáním signálu od hostitele. Jelikož existence, natož pak přesná chemická povaha stimulantu není známa, bylo vyzkoušeno připravit jednoduchý mrkvový extrakt (Graf 5). Mrkvový extrakt byl připraven sterilizací mrkve (Kapitola 3.6.4.1) s následným rozmixováním a přefiltrováním přes síťovinu. Jeho aplikace však k výraznému zlepšení výsledků nevedla, proto bylo z důvodu pracnosti přípravy, značné variability a náchylnosti suspenze ke kontaminaci od dalšího použití upuštěno.



Graf 5: Hodnoty RFU (technický dodekaplikát) pro pozitivní kontrolu ($10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaN}_3$) a živé populace červů NT pomocí chitinasového testu na háďátkách *D. destructor*. Místo čistého M9 média byl použit extrakt z mrkve v M9 médiu. Chybové úsečky odrážejí standardní chybu. Hvězdičky značí statistickou signifikanci (Mann-Whitney test; vysvětlivky: ** $P = 0,0011$).

Dále byl také použit ZnCl_2 , který zvyšuje míru líhnutí vajíček u některých druhů PPN.¹²¹ Pufř M9, ve kterém byla vajíčka suspendována, byl nahrazen $3 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztokem ZnCl_2 (Graf 6 B a C). Tato koncentrace stimulantu je rutinně používána pro experimenty s háďátky *Heterodera*. V grafu 6 jsou ukázány pro porovnání reprezentativní data naměřena pro *C. elegans*, jež byla inkubována po dobu 4 dnů s a bez pozitivní kontroly ivermektinu (Graf 6 A) a data naměřená pro červa *D. destructor* (1000 vajíček/jamku), inkubovaného po dobu 7 dnů s a bez $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaN}_3$ (Graf 6 B a C). I zde byl zaznamenán výrazně nižší signál v negativní kontrole pro *D. destructor* (Graf 6 B a C) oproti negativní kontrole pro *C. elegans* (Graf 6 A). Z toho by se dalo usoudit, že roztok ZnCl_2 celkově nebyl na líhnutí červů patrně účinný. Rozdíl mezi kontrolami (pro lepší vizuální zhodnocení viz graf 6 C) byl přítomen (p-hodnota = 0,0007, Studentův nepárový t-test) stejně jako předchozím experimentu (grafu 4 C), ale stále nebyl zdaleka tolik přesvědčivý v porovnání s kontrolami u grafu 4 A či 6 A.

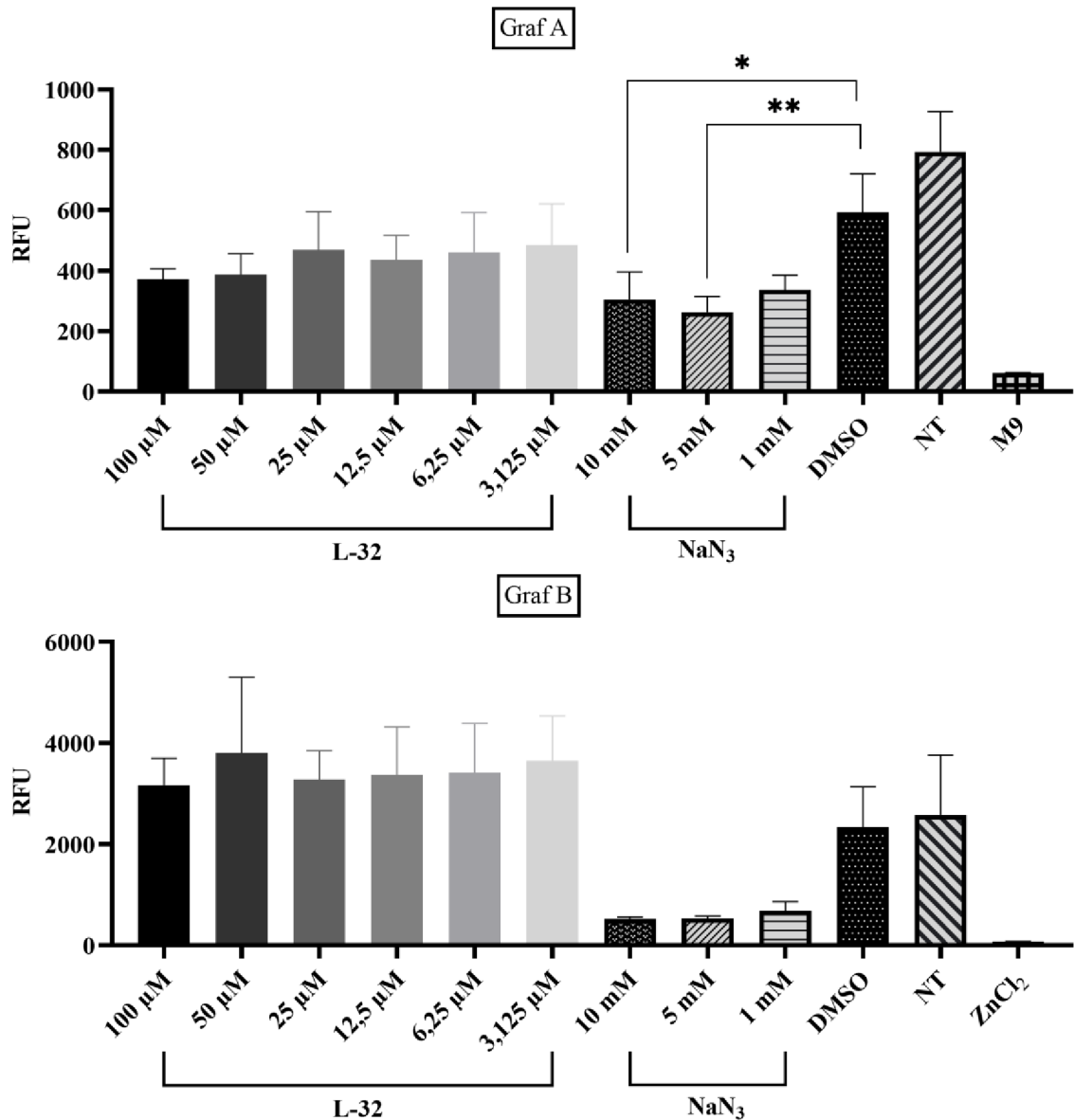


Graf 6: Hodnoty RFU (technický tetraplikát) po čtyřdenní inkubaci populací *C. elegans* s běžně používanou pozitivní ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ivermektin) a negativní ($0,1\%$ DMSO). B) Hodnoty RFU (technický dodekaplikát) po sedmi denní inkubaci populací *D. destructor* s pozitivní ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaN₃) a negativní ($3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok ZnCl₂) kontrolou. Pro lepší vizuální srovnání výsledků mezi oběma druhy je na ose Y použito stejné měřítko jako v grafu A. C) Jiná prezentace (menší měřítko osy Y) dat ukázaných v grafu B pro lepší vizuální zhodnocení rozdílů mezi kontrolami. V experimentu znázorněném v grafu A bylo aplikováno 30 červů/jamku. V experimentu znázorněném v grafech B a C bylo aplikováno 1000 vajíček/jamku. Hvězdičky značí statistickou signifikanci (nepárový Studentův t-test; vysvětlivky: *** P = 0,0007, **** p-hodnota > 0,0001). Chybové úsečky značí standardní chybu.

Jelikož ani jeden z návrhů nebyl úspěšný, bylo usouzeno, že problémem nejspíše může být i přítomnost řady neoplozených či neviabilních vajíček použitých pro testování. Rozmnožování *D. destructor* je sexuální,¹²² z toho důvodu je možné, že v suspenzi byly přítomny i vajíčka od samic, jimž se nepovedlo se spářit. Tento předpoklad bylo obtížné přesněji ověřit mikroskopickým pozorováním díky výše zmíněné nedokonalosti našich postupů pro přečistění populace. Ani filtrací, jež poskytla o něco lepší výsledky než chemická metoda, nebylo docíleno dokonalého oddělení červů. Ze suspenze byly vcelku efektivně odstraněny větší jedinci, avšak mladší larvální stádia síťovinou procházela ve větší míře, a ve výsledné populaci nebylo možné tyto larvy rozpoznat od nově vylíhlých larev.

Navzdory neúspěchu řady našich snah protokol vylepšit došlo k otestování sloučeniny **L-32** na háďátkách *D. destructor*. Koneckonců byl zaznamenán alespoň v rámci mezi dostačující a reprodukovatelný rozdíl mezi pozitivní a negativní kontrolou u chitinasových testů pro *D. destructor* (Graf 4 B a C; Graf 6 B a C). Pro inkubaci vajíček bylo použito oboje, M9 médium (Graf 7 A) a $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok ZnCl₂ (Graf 7 B). V daném

testování L-32 na vajíčkách nebylo zahrnuté mrkvové M9 médium obzvláště kvůli obavám z kontaminací.



Graf 7: Hodnoty RFU (technický dodekaplikát) po sedmi denní inkubaci populací *D. destructor* s látkou L-32 v šesti koncentracích ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $6,25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $3,125 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pozitivní kontrolu NaN₃ ve třech koncentracích ($10 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $5 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $1 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), negativní kontrolu 0,1% DMSO, živou populaci červů NT a čisté médium M9 (graf A) či čistý roztok $3 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ZnCl₂ (graf B). Do jednotlivých jamek byla nanášena suspenze háďátek v M9 médiu (graf A) anebo v roztoku $3 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ZnCl₂ (graf B). V experimentech znázorněných v grafech A a B bylo aplikováno 1000 vajíček/jamku. Hvězdičky značí statistickou signifikanci (Kruskal-Wallis test; vysvětlivky: * $P = 0,0191$, ** $P = 0,0027$). Chybové úsečky odrážejí standardní chybu.

Naměřená data byla dle očekávání poměrně variabilní díky nedokonalosti protokolu (Graf 7 A a B). Pro precizní a spolehlivé posouzení efektu látky nebyla data patrně v dostatečné kvalitě. Lze z nich však usoudit, že **L-32** na líhnutí vajíček *D. destructor* zřejmě nemá vliv. Vajíčka použita v tomto experimentu s M9 médiem a roztokem ZnCl₂ (Graf 7 A a B) pocházela ze stejné populace červů. Jelikož jsou naměřená RFU data u červů suspendovaných v roztoku ZnCl₂ (Graf 7 B) značně vyšší než u červů suspendovaných v M9 médiu (Graf 7 A), dalo by se předpokládat, že ZnCl₂ mohlo nejspíše mít v tomto pokusu na líhnutí červů *D. destructor* drobný vliv. Avšak s úplnou určitostí nebylo možné vydedukovat závěr ohledně vlivu ZnCl₂ na líhnutí, protože u předchozího experimentu naměřené RFU signály kontrol u *D. destructor*, v ZnCl₂ (Graf 6 B a C) byly rapidně nižší. Test v současné podobě není spolehlivý a k dalšímu testování bez dalších úprav není vhodný.

Metoda by mohla být vylepšena dokonalejší izolací vajíček, tedy nalezením účinného věkově synchronizačního roztoku, který by spolehlivě odstranil již vylíhnuté červy a zároveň nelimitoval líhnutí vajíček. Dále by také mohlo potenciálně pomoci i dále prozkoumat možnost nalezení vhodného aktivátoru líhnutí vajíček specifického pro *D. destructor*. Alternativou by také mohlo být využití faktu, že *D. destructor* se může živit i některými houbami.⁶⁰ Ty by byly potenciálně snazší na převod do tekutého prostředí, než rostlinný materiál. Jedinci by se pak v průběhu experimentu teoreticky mohli množit a krmit. Test by mohl být proveden v podobném uspořádání jako v *C. elegans*, kde metoda funguje spolehlivě. Závažnou komplikací by ale mohl být fakt, že řada hub produkuje chitin a enzym chitinasu,¹²³ což by s výsledky interferovalo. Jedním z dalších potenciálních řešení by také mohla být výměna substrátu. Chitinasu produkovaná *C. elegans* se od enzymu, jež produkuje *D. destructor*, pravděpodobně částečně strukturně odlišuje a jiný substrát by mohl s enzymem lépe interagovat.

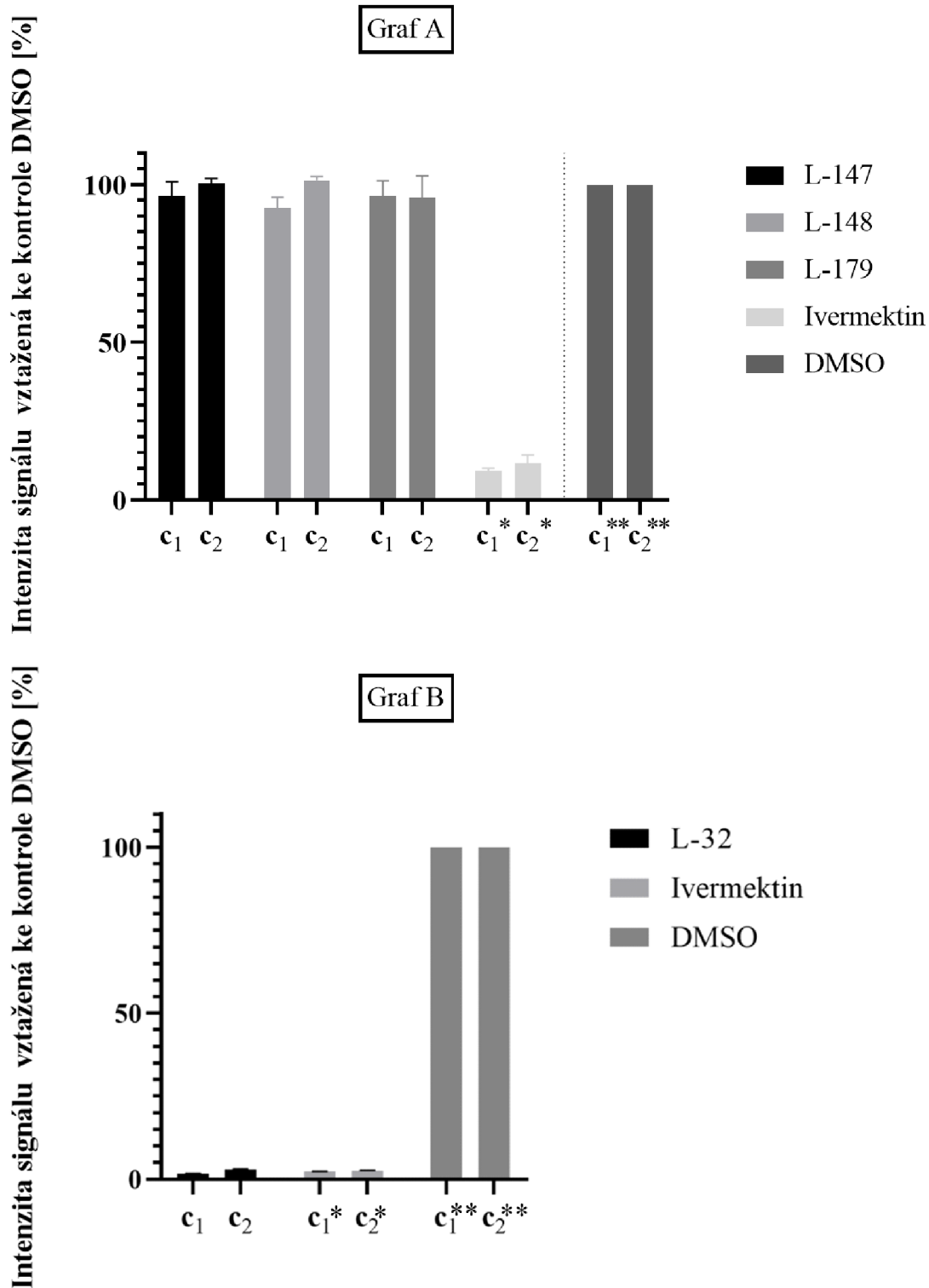
Optimalizovat metodu na vajíčka *D. destructor* se ukázalo jako značně obtížné. Metoda je v současné době bohužel stále příliš nespolehlivá. Práce však vedla k zisku řady užitečných poznatků, jež budou v dalších fázích vývoje metody užitečné.

4.2.2.2 Testování anhelmintické aktivity vybraných fenylpropanoidů na *C. elegans*

Dalším cílem práce bylo i otestovat několik látek strukturně podobných látce **L-32**. Byly zvoleny sloučeniny **L-147**, **L-148** a **L-179** (Tabulka 2), které byly taktéž připraveny výzkumnou skupinou doc. Jiřího Pospíšila. Tyto látky byly vybrány pro zjištění, která z částí **L-32** je zodpovědná za anthelmintickou aktivitu v *C. elegans*. Sloučenina **L-179** je monomerem, ze kterého vzniká látka **L-32**. Naopak sloučeniny **L-147** a **L-148** obsahují

benzofuranový skelet, jenž bývá zodpovědný za mnoho biologických vlastností. Tyto látky se od sebe odlišují postranními řetězci. Látka **L-148** disponuje aromatickým postranním řetězcem, kdežto skelet **L-147** neobsahuje chirální centra. Chtinasovým testem (Kapitola 3.6.2.6) byl hodnocen účinek na reprodukční kapacitu linie divokého typu („wild-type“) hád'átek *C. elegans* N2. Naměřená intenzita, značící tuto anhelmintickou účinnost, byla vztažena k negativní kontrole – DMSO.

Vybrané látky byly aplikovány ve dvou koncentracích c_1 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a c_2 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Pozitivní kontrolou byl ivermektin při koncentracích c_1^* ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a c_2^* ($0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a negativní kontrolou DMSO o koncentracích c_1^{**} (0,1%) a c_2^{**} (0,01%). Veškeré sloučeniny byly aplikovány v technickém triplikátu a experiment byl třikrát zopakován. V některých podmínkách bylo možné zaregistrovat velmi malý pokles intenzity signálu (nejvíce u **L-147** při koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Je však nutno podotknout, že žádný z uvedených úbytků intenzit signálu nepřesáhl 10%. U žádné připravené látky nebyla prokázána athelmintická aktivita ani při nejvyšší testované koncentraci (Graf 8 A). Pro srovnání jsou ukázány i výsledky **L-32** testované za stejných podmínek, jež byly před započítím tohoto projektu získány vedoucí práce (Graf 8 B).



Graf 8: Vyhodnocení chitinasového testování na „wild-type“ linii *C. elegans* N2 po čtyřdenní inkubaci s testovacími látkami L-147, L-148, L-179 (Graf A) a L-32 (Graf B) při koncentraci c_1 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a c_2 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Screening pro jednotlivé látky byl proveden v technickém triplicátu a experiment byl třikrát zopakován. Chybové úsečky odrážejí standardní chybu. Jako pozitivní kontrola byl použit ivermektin - c_1^* ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a c_2^* ($0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Negativní kontrolou bylo DMSO - c_1^{**} ($0,1\%$) a c_2^{**} ($0,01\%$). Změřené hodnoty intenzity signálu byly vztažené k negativní kontrole 100 % DMSO.

Vizuálním pozorováním pomocí mikroskopu taktéž nebyla prokázána toxická účinnost na populaci *C. elegans* N2 u žádné z testovaných látek (Tabulka 3). K jednotlivým látkám bylo přiřazeno skóre, které vypovídalo o konkrétní situaci v jednotlivých jamkách. Po expozici sloučenin **L-147**, **L-148** a **L-179** s červy byly populace živé a nezpomalené s počtem potomstva v normě u obou testovaných koncentrací.

Tabulka 3: Vyhodnocení anthelmintického testování na „wild-type“ linii *C. elegans* N2 po třídenní inkubaci s testovacími látkami L-147, L-148, L-179 při koncentraci 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ za využití vizuálního hodnocení pomocí mikroskopu. Pro každou testovanou sloučeninu bylo přiřazeno skóre podle kapitoly 3.6.2.6.

Název látky	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
L-147	(e)	(e)
L-148	(e)	(e)
L-179	(e)	(e)
Ivermektin	(a)	(a)
DMSO	(e)	(e)

Jelikož ani u jedné z látek nebyla prokázána anthelmintická účinnost standardizovaným chitinasovým screeningem, jejich využití pro další testování na háďátkách nemá do budoucna pravděpodobně smysl. Výsledky napovídají o tom, že za aktivitu **L-32** zřejmě není zodpovědná jedna konkrétní část molekuly, a interakci s jejím doposud nepopsaným molekulárním cílem zřejmě umožňuje kombinace jejích součástí.

4.2.3 Chemotaktické testování za využití červů *D. destructor*

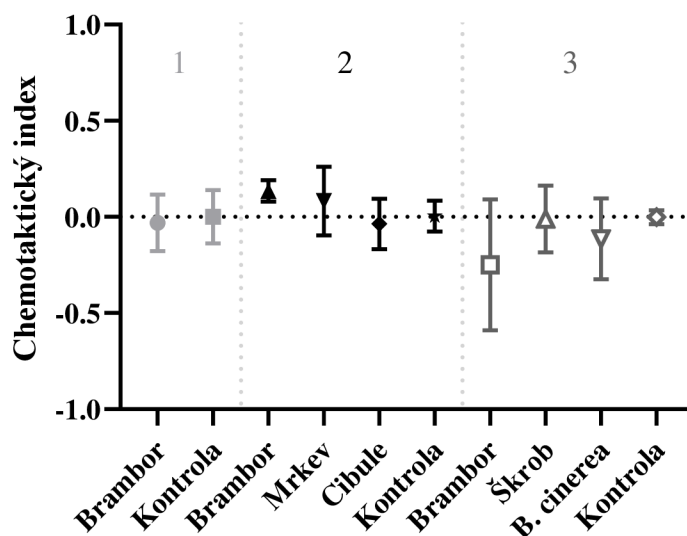
Dominantním smyslem háďátek je jejich čich. Častým behaviorálním testem, jež se u nich používá, je tedy hodnocení chemotaxe, tedy jejich schopnosti směřovat k chemickému gradientu dané látky či se od něj oddalovat.¹²⁴ Tento aspekt lze využít pro testování atraktantů či repelentů.¹²⁵ V rámci mé diplomové práce byla snaha o modifikaci tohoto testu na červech *D. destructor* (Kapitola 3.6.4.6). Jako inspirace byl využit protokol, který byl popsán Palmer a spol. pro *C. elegans*.¹²⁵

Preference červů v těchto testech bývá vyjádřena chemotaktickým indexem CI (Schéma 2), jehož výsledné hodnoty se pohybují v rozmezí od +1 do -1. Hodnoty blízké +1 odrážejí zvýšenou chemickou atraktivitu podnětu a naopak.¹²⁵

$$CI = \frac{\text{Kontrolní segmenty} - \text{Testovací segmenty}}{\text{Všechny čtyři segmenty na misce}}$$

Schéma 2: Výpočet chemotaktického indexu CI vztahovaný pro jednu Petriho misku.

Ideou bylo ze začátku nalézt optimální kontrolu, která by červy *D. destructor* spolehlivě přitahovala, a následně metodu pro tyto háďátka využít i na testování dalších chemických sloučenin. Prvotně byly experimenty koncipovány na měření mobility směsné populace červů k části kořene bramboru, mrkve a cibule (Graf 9, segment 2). Jelikož *D. destructor* je významným škůdcem těchto plodin,¹⁻³ bylo předpokladem, že CI se bude pohybovat v kladných hodnotách. Naměřené CI získané z misek v tetraplikátu však byl relativně blízký nule, tedy neutrální reakci. CI bramboru vyšel v porovnání se zbylými plodinami nejlépe, pohyboval se v kladných hodnotách (0,13), i když nižších, než by bylo optimální. Nevykazoval ani velkou variabilitu, jak tomu bylo například u mrkve. Další testování, opět v tetraplikátu, bylo tedy zopakováno pouze s bramborem, avšak v tomto testu CI činil -0,03 (Graf 9, segment 1). V třetím testu hodnota CI u kořene brambory činila dokonce -0,25. Brambor tedy podle všeho spolehlivým atraktantem není. V posledním opakování bylo navíc otestováno i 1 mmol·l⁻¹ škrobu z toho důvodu, že infikované bramborové či batátové hlízy hlísticemi produkují značné množství tohoto polysacharidu. Škrob je amylasou rozložen na jednodušší sacharidy, jež jsou pravděpodobně z počátku infestace využívány pro růst háďátek.⁶³ U toho taktéž nebyla zaznamenána zvýšená chemoatrakce (Graf 9, segment 3). Dále bylo vyzkoušeno použít jako atraktant i plíseň *B. cinerea*, jelikož je *D. destructor* částečně i mykofágní.⁶⁰ Ani k ní však červi nebyli přitahováni.



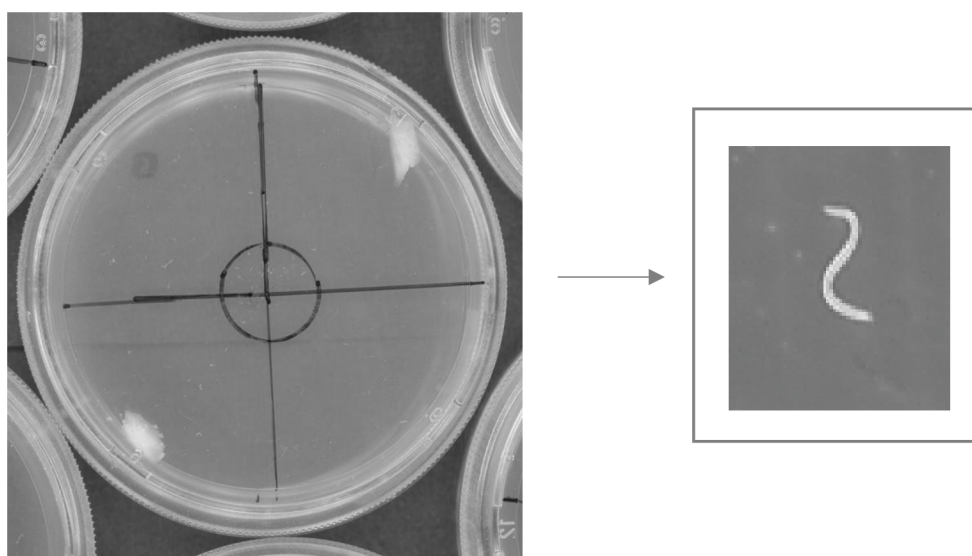
Graf 9: Chemotaktické indexy od intervalu +1 až -1 byly získány provedením experimentů na směsné populaci červů *D. destructor* s použitím atraktantu, a to části kořene (3 mm²) bramboru, cibule a mrkve; 3 mm² čtverce *B. cinerea* a škrobu (1 mmol·l⁻¹). Jako kontrola byla použita dH₂O. Uvedené hodnoty představují průměr čtyř samostatných testů zahrnující přibližně 50 červů pro každou podmínku. Byly provedeny tři nezávislé testy rozdělené do segmenty 1, 2 a 3. Chybové úsečky odrážejí standardní chybu.

Z časových důvodů nebylo možné v testech pokračovat s dalšími substancemi s cílem nalézt kýžený atraktant. Další optimalizace metody pro testování chemických látek by bez spolehlivých kontrol v této chvíli byla předčasná. Je ale zajímavým zjištěním, že známí hostitelé *D. destructor* podle všeho neprodukují chemické podněty, jež by červy lákaly. V literatuře byl popsán případ, kdy jsou *D. destructor* přitahováni k symbiotickým houbám žijícím na česneku, načež poté napadají i tuto plodinu.⁶⁰ Tento fakt, společně s námi získanými výsledky, nám napovídá, že u *D. destructor* je zřejmě více vyvinuté vnímání signálu produkovaných houbami než rostlinami. Ač je toto téma zatím neprobádané, můžeme spekulovat, že houby jsou možná pro *D. destructor* preferovaným zdrojem potravy. Toto zajímavé zjištění by mohlo být podkladem pro další studii, v rámci které by byly získány a otestovány další druhy mikroskopických hub s cílem najít ty nepřitažlivější a identifikovat specifické molekuly zodpovědné za chemoatrakci. Taková studie by v konečném důsledku mohla vést k praktickým aplikacím pro zemědělství – například by mohly být vytvořeny různé pasti na parazity či produkty, jež by je omámily. Potenciální užitečnost takovýchto přístupů byla již dříve v literatuře diskutována.¹²⁶

Dalším kamenem úrazu i u této metody by mohlo být použití směsné populace červů *D. destructor*. Z toho důvodu by bylo nejspíše potřeba objevit metodu, která by umožnila

populace červů synchronizovat. Vyřešením tohoto aspektu by chemotaktické testy na háďátkách *D. destructor* snad mohly fungovat.

Veškeré chemotaktické testy byly snímány skenerem. Tím byla usnadněna detekce jednotlivých háďátek pohybujících se v nastavených segmentech s testovaným materiálem či kontrolami na Petriho misce (Obrázek 14). Červi *D. destructor* byli na obrázcích velmi dobře viditelní, což naznačuje, že tento způsob detekce umožňuje automatizaci metodou jako je WormScan nebo Lifespan machine, i když jsou tyto zavedeny zatím pouze pro *C. elegans*. Náš způsob hodnocení je také podstatně pohodlnější v porovnání s běžně používanými metodami, které jsou založeny na mikroskopii.¹²⁵ Jejich nevýhodou je nutnost rychlého počítání po uplynutí doby inkubace, která může vést k chybám. Alternativně jsou využívány anestetika (levamisol, NaN_3) pro pozastavení pohybu červů, která jsou však potenciálně toxická pro hodnotitele a zvyšují pracnost experimentu.¹¹⁰



Obrázek 14: Snímek ze skeneru Epson Perfection V800 Photo zachycující Petriho misku s chemotakticky migrujícími háďátkami *D. destructor* (vlevo) a přibližný detail háďátka viditelného na misce (vpravo).

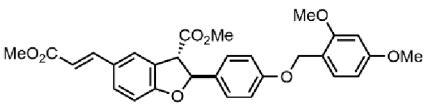
4.3 Cytotoxická aktivita

4.3.1 Stanovení hodnoty IC_{50} u látky L-32 na buněčných liniích resazurivoným testováním

Pro iniciální prověření toxicity **L-32** pro lidi byla hodnocena jeho cytotoxicita na několika nekarzinogenních lidských buněčných liniích, a to na kožních fibroblastech BJ,

buňkách retinálního pigmentového epitelu ARPE-19 a aneuploidních nesmrtelných dermálních keratinocytech HaCaT. Oči a kůže jsou nejpravděpodobnější místa náhodné expozice, která by mohla nastat u pracovníků, jenž by se sloučeninou manipulovali, pokud by například našla aplikaci v zemědělství. Cytotoxické testování bylo provedeno resazurinovým testem (Kapitola 3.6.5). Sloučenina **L-32** byla inkubována s výše zmíněnými buněčnými liniemi po dobu 3 dnů. Principem tohoto testování pro měření cytotoxicity je přidání barviva resazurinu, jež je mitochondriálními enzymy redukováno na fluorescenční resorufin. Tato aktivita je ve větší míře přítomna u vitálních buněk než u usmrcených/umírajících buněk.¹²⁷ Ani v nejvyšší námi zvolené koncentraci ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebyl zaznamenán jakýkoliv snížený signál informující o poklesu životaschopnosti buněk. To znemožnilo přesný výpočet hodnoty IC_{50} . Daná hodnota bude vyšší než námi použitá maximální koncentrace (Tabulka 4).

Tabulka 4: Stanovení cytotoxické aktivity L-32 v buněčných liniích BJ, ARPE-19 a HaCaT po třídní expozici buněčných linií s danou látkou.

Název látky	Strukturní vzorec	Koncentrace ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)		
		IC_{50}	IC_{50}	IC_{50}
		ARPE-19	BJ	HaCaT
L-32		> 50	> 50	> 50

Resazurinový test byl v tomto případě proveden pouze jednou. Pro přesné stanovení hodnoty IC_{50} na buněčných liniích by bylo potřeba experiment zopakovat a použít koncentrace vyšší než $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Problém by mohl nastat při rozpouštění testovací sloučeniny v rozpouštědle DMSO. Bylo zjištěno, že při koncentracích vyšší než $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ rozpustnost sloučeniny je v zásadě značně obtížná. Data nicméně ukazují, že sloučenina nejspíše disponuje pouze relativně nízkou cytotoxicitou pro lidské buněčné linie.

5 Závěr

Předložená diplomová práce se v literární rešerši stručně zabývá problematikou spjatou s fytopatogenními hlísticemi a strategiemi účinnými proti těmto parazitům. Pojednává také o fenylypropanoidních sloučeninách a jejich nematicidních účincích. Zároveň se také věnuje metodám umožňující vysokokapacitní screening chemikálií na hlísticích.

V experimentální části tato práce zkoumá nematicidní aktivitu látek fenylypropanoidního typu, a to zejména u sloučeniny L-32, kterou výzkumná skupina doc. RNDr. Jiřího Pospíšila, Ph.D. prvotně připravila. Odhalení její aktivity proti *Caenorhabditis elegans* pomocí standardizovaných chitinasových testů odstartovalo tento projekt, který se ve větší míře zabýval prozkoumáním její nematicidní aktivity na fytopatogenním hád'átku *Ditylenchus destructor*. Ze získaných předběžných výsledků se zdá, že sloučenina L-32 pravděpodobně nebyla pro hád'átku *Ditylenchus destructor* toxická v žádném z prováděných testů. Ani další zkoumané látky strukturně podobné L-32 nevykazovaly aktivitu v *Caenorhabditis elegans*.

V dané práci je také zahrnut vývoj nových experimentálních postupů vhodných pro testování látek (přírodního) původu na fytopatogenních hlísticích *Ditylenchus destructor*. Zabývá se zejména optimalizací metod – chitinasových screeningů, chemotaktického testování a testů zajišťujících se o hodnocení mobilní aktivity hád'átek pomocí metody wMicroTracker. Z těchto metod byla téměř plně optimalizována, metoda hodnotící mobilitu hád'átek *Ditylenchus destructor*, avšak z časových důvodů již nebylo možné dotestovat s její pomocí vybrané látky fenylypropanoidního typu. Další zmíněné metody v tuto chvíli zatím neposkytují dostatečně spolehlivá data. V rámci této diplomové práce byla však částečně či plně vyřešena řada technických komplikací a práce taktéž demonstrovala některé slepé uličky. Tím poskytla řadu užitečných poznatků, o kterou se budou opírat další optimalizace.

V neposlední řadě byla testována předběžná cytotoxická aktivita sloučeniny L-32 na vícero nerakovinových buněčných liniích BJ, ARPE-19 a HaCaT. Bylo zjištěno, že látka má poměrně nižší cytotoxickou účinnost na těchto buněčných liniích ($IC_{50} > 50 \mu M$).

6 Literatura

- (1) Mwaura P, Niere B, Vidal S. Resistance and tolerance of potato varieties to potato rot nematode (*Ditylenchus destructor*) and stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*). *Annals of Applied Biology*, **2015**, 166 (2), 257–270. doi: 10.1111/aab.12180.
- (2) Zheng J, Peng D, Chen L, Liu H, Chen F, Xu M, Ju S, Ruan L. The *Ditylenchus destructor* genome provides new insights into the evolution of plant parasitic nematodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **2016**, 283 (1835). doi: 10.1098/rspb.2016.0942.
- (3) Pan F, Li F, Mao Y, Liu D, Chen A, Zhao D, Hu Y. First Detection of *Ditylenchus destructor* Parasitizing Maize in Northeast China. *Life*, **2021**, 11 (12), 1303. doi: 10.3390/life11121303.
- (4) Chen J, Li QX, Song B. Chemical Nematicides: Recent Research Progress and Outlook. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2020**, 68 (44), 12175–12188. doi: 10.1021/acs.jafc.0c02871.
- (5) Biała W, Jasiński M. The Phenylpropanoid Case – It Is Transport That Matters. *Frontiers in Plant Science*, **2018**, 9, 1610. doi: 10.3389/fpls.2018.01610.
- (6) Vogt T. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, **2010**, 3 (1), 2–20. doi: 10.1093/mp/ssp106.
- (7) De Ley P. A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. *WormBook*, **2006**, 1–8. doi: 10.1895/wormbook.1.41.1.
- (8) Koppenhöfer AM. Nematodes. V: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. *Springer Netherlands*, **2000**, 283–301. doi:10.1007/978-94-017-1547-8_11.
- (9) Bird AF, Bird J. General Introduction. V: *The Structure of Nematodes*. Elsevier, **1991**, 1–6. doi: 10.1016/B978-0-12-099651-3.50007-1.
- (10) Kiontke K, Fitch DHA. Nematodes. *Current Biology*, **2013**, 23 (19), R862–R864. doi: 10.1016/j.cub.2013.08.009.
- (11) Bird AF, Bird J. The Exoskeleton. V: *The Structure of Nematodes*. Elsevier, **1991**, 44–74. doi: 10.1016/B978-0-12-099651-3.50007-1.
- (12) Bird AF, Bird J. The Epidermis. V: *The Structure of Nematodes*. Elsevier, **1991**, 96–105. doi: 10.1016/B978-0-12-099651-3.50011-3.
- (13) Bird AF, Bird J. Musculature. V: *The Structure of Nematodes*. Elsevier, **1991**, 106–128. doi: 10.1016/B978-0-12-099651-3.50012-5.

- (14) Bird AF, Bird J. Digestive System. V: *The Structure of Nematodes*. Elsevier, **1991**, 183–229. doi: 10.1016/B978-0-12-099651-3.50016-2.
- (15) Bird AF, Bird J. Reproductive System. V: *The Structure of Nematodes*. Elsevier, **1991**, 230–273. doi: 10.1016/B978-0-12-099651-3.50017-4.
- (16) Athar F, Templeman NM. *C. elegans* as a model organism to study female reproductive health. *Comparative Biochemistry Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **2022**, 266, 111152. doi: 10.1016/j.cbpa.2022.111152.
- (17) Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, **2015**, 1–31. doi: 10.1895/wormbook.1.177.1.
- (18) Meyer BJ. The X chromosome in *C. elegans* sex determination and dosage compensation. *Current Opinion Genetics & Development*, **2022**, 74, 101912. doi: 10.1016/j.gde.2022.101912.
- (19) Jasmer DP, Goverse A, Smant G. Parasitic nematode interactions with mammals and plants. *Annual Review of Phytopathology*®, **2003**, 41 (1), 245-270. doi: 10.1146/annurev.phyto.41.052102.104023.
- (20) Cole R, Viney M. The population genetics of parasitic nematodes of wild animals. *Parasites & Vectors*, **2018**, 11 (1), 1–20. doi: 10.1186/s13071-018-3137-5.
- (21) Jourdan PM, Lambertson PHL, Fenwick A, Addiss DG. Soil-transmitted helminth infections. *Lancet*, **2018**, 391(10117), 252–265. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31930-X.
- (22) Drews SJ, Spencer BR, Wendel S, Bloch EM. Filariasis and transfusion-associated risk: a literature review. *Vox Sang*, **2021**, 116 (7), 741–754. doi:10.1111/vox.13073.
- (23) Holden-Dye L, Walker RJ. Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, **2014**, 1–29. doi:10.1895/wormbook.1.143.2.
- (24) Nixon SA, Welz C, Woods, DJ, Costa-junior L, Zamanian M, Martin RJ. Where are all the anthelmintics? Challenges and opportunities on the path to new anthelmintics. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, **2020**, 14, 8–16. doi:10.1016/j.ijpddr.2020.07.001.
- (25) Ahmad G, Khan A, Khan AA, Ali A, Mohhammad HI. Biological control: a novel strategy for the control of the plant parasitic nematodes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **2021**, 114 (7), 885-912. doi: 10.1007/s10482-021-01577-9.
- (26) Montarry J, Mimee B, Danchin EGJ, Koutsovoulos GD, Ste-Croix DT, Grenier E. Recent advances in population genomics of plant-parasitic nematodes. *Phytopathology*, **2021**, 111 (1), 40–48. doi: 10.1094/PHYTO-09-20-0418-RVW.

- (27) Nicol JM, Turner SJ, Coyne DL, Nijs L Den, Hockland S. Current nematode threats to world agriculture. V: *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*, Springer Netherlands, **2011**, 21-43. doi: 10.1007/978-94-007-0434-3_2.
- (28) Coyne DL, Cortada L, Dalzell JJ, Claudius-Cole AO, Haukeland S, Luambano N, Talwana H. Plant-Parasitic Nematodes and Food Security in Sub-Saharan Africa. *Annual Review of Phytopathology*, **2018**, 56 (1), 381–403. doi: 10.1146/annurev-phyto-080417-045833.
- (29) Jones JT, Haegeman A, Danchin EGJ, Gaur HS, Helder J, Jones MGK, Kikuchi T, Manzanilla-Lopéz R, Palomares-Rius JE, Wesemael WML, Perry RN. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, **2013**, 14 (9), 946–961. doi: 10.1111/mpp.12057.
- (30) Vieira P, Gleason C. Plant-parasitic nematode effectors — insights into their diversity and new tools for their identification. *Current Opinion in Plant Biology*. **2019**, 50, 37–43. doi:10.1016/j.pbi.2019.02.007.
- (31) Gillet F-X, Bournaud C, de Souza Júnior JDA, Fatima Grossi-de-Sa M. Plant-parasitic nematodes: towards understanding molecular players in stress responses. *Annals of Botany*, **2017**, 119 (5), 775-789. doi: 10.1093/aob/mcw260.
- (32) Pulavarty A, Egan A, Karpinska A, Horgan K, Kakouli-Duarte T. Plant Parasitic Nematodes: A Review on Their Behaviour, Host Interaction, Management Approaches and Their Occurrence in Two Sites in the Republic of Ireland. *Plants*, **2021**, 10 (11), 2352. doi: 10.3390/plants10112352.
- (33) Saucet SB, Van Ghelder C, Abad P, Duval H, Esmenjaud D. Resistance to root-knot nematodes *Meloidogyne spp.* in woody plants. *New Phytologist*, **2016**, 211 (1), 41–56. doi: 10.1111/nph.13933.
- (34) Elling AA. Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. *Phytopathology*®, **2013**, 103 (11), 1092–1102. doi: 10.1094/PHYTO-01-13-0019-RVW.
- (35) Moens M, Perry RN, Starr JL. *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. V: *Root-knot Nematodes*. CABI International, **2009**, 1–17. doi: 10.1079/9781845934927.0001.
- (36) Barbary A, Djian-Caporalino C, Palloix A, Castagnone-Sereno P. Host genetic resistance to root-knot nematodes, *Meloidogyne spp.*, in Solanaceae: from genes to the field. *Pest Management Science*, **2015**, 71 (12), 1591–1598. doi: 10.1002/ps.4091.
- (37) Chandran D, Wildermuth MC. Modulation of Host Endocycle During Plant–Biotroph

- Interactions. V: *Enzymes*. Elsevier Inc., **2016**, *40*, 65–103. doi:10.1016/bs.enz.2016.09.001.
- (38) Varandas R, Egas C, Conceição IL. Potato cyst nematodes: New solutions to an old problem. *Crop Protection*, **2020**, *137*. doi: 10.1016/j.cropro.2020.105303.
- (39) Agrios GN. Plant Diseases Caused by Nematodes. V: *Plant Pathology*. Elsevier, **2005**, 825–874. doi: 10.1016/B978-0-08-047378-9.50021-X.
- (40) Lilley CJ, Atkinson HJ, Urwin PE. Molecular aspects of cyst nematodes. *Molecular Plant Pathology*, **2005**, *6* (6), 577–588. doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00306.x.
- (41) Tan J-ACH, Jones MGK, Fosu-Nyarko J. Gene silencing in root lesion nematodes (*Pratylenchus spp.*) significantly reduces reproduction in a plant host. *Experimental Parasitology*, **2013**, *133* (2), 166–178. doi: 10.1016/j.exppara.2012.11.011.
- (42) Fanning J, Linsell K, McKay A, Gogel B, Munoz Santa I, Davey R, Hollaway G. Resistance to the root lesion nematodes *Pratylenchus thornei* and *P. neglectus* in cereals: Improved assessments in the field. *Applied Soil Ecology*, **2018**, *132*, 146–154. doi: 10.1016/j.apsoil.2018.08.023.
- (43) Yu Y-T, Liu H-L, Zhu A-G, Zhang G, Zeng L-B, Xue S-D. A Review of Root Lesion Nematode: Identification and Plant Resistance. *Advances in Microbiology*, **2012**, *02* (04), 411–6. doi: 10.4236/aim.2012.24052.
- (44) Vanstone VA, Hollaway GJ, Stirling GR. Managing nematode pests in the southern and western regions of the Australian cereal industry: Continuing progress in a challenging environment. *Australas Plant Pathology*, **2008**, *37* (3), 220–234. doi: 10.1071/AP08020.
- (45) Haegeman A, Elsen A, De Waele D, Gheysen G. Emerging molecular knowledge on *Radopholus similis*, an important nematode pest of banana. *Molecular Plant Pathology*, **2010**, *11* (3), 315–323. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00614.x.
- (46) Yang S, Zhao L, Ding S, Tang S, Chen C, Zhang H, Xu C, Xie H. Study on burrowing nematode, *Radopholus similis*, pathogenicity test system in tobacco as host. *Journal of Integrative Agriculture*, **2022**, *21* (9), 2652–2664. doi: 10.1016/j.jia.2022.07.021.
- (47) Jones JT, Moens M, Mota M, Li H, Kikuchi T. *Bursaphelenchus xylophilus*: Opportunities in comparative genomics and molecular host-parasite interactions. *Molecular Plant Pathology*, **2008**, *9* (3), 357–368. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00461.x.
- (48) Kikuchi T, Cotton JA, Dalzell JJ, Hasegawa K, Kanzaki N, McVeigh P, Takanashi T, Tsai IJ, Assefa SA, Cock PJA, Otto TD, Hunt M, Reid AJ, Sanchez-Flores A,

- Tsuchihara K, Yokoi T, Larsson MC, Miwa J, Maule AG, Sahashi N, Jones JT, Berriman M. Genomic insights into the origin of parasitism in the emerging plant pathogen *Bursaphelenchus xylophilus*. *PLoS Pathogens*. **2011**, *7* (9). doi: 10.1371/journal.ppat.1002219.
- (49) Arias RS, Stetina SR, Tonos JL, Scheffler JA, Scheffler BE. Microsatellites reveal genetic diversity in *Rotylenchulus reniformis* populations. *Journal of Nematology*, **2009**, *41* (2), 146–56. PMID: 22661788.
- (50) Lawrence GW, McLean KS, Batson WE, Miller D, Borbon JC. Response of *Rotylenchulus reniformis* to Nematicide Applications on Cotton. *Journal of Nematology*, **1990**, *22* (4S), 707–711. PMID: 19287784.
- (51) Aballay E, Prodan S, Mårtensson A, Persson P. Assessment of rhizobacteria from grapevine for their suppressive effect on the parasitic nematode *Xiphinema index*. *Crop Protection*, **2012**, *42*, 36–41. doi: 10.1016/j.cropro.2012.08.013.
- (52) Villate L, Esmenjaud D, Van Helden M, Stoeckel S, Plantard O. Genetic signature of amphimixis allows for the detection and fine scale localization of sexual reproduction events in a mainly parthenogenetic nematode. *Molecular Ecology*, **2010**, *19* (5), 856–873. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04511.x.
- (53) Pires D, Vicente CSL, Menéndez E, Faria JMS, Rusinque L, Camacho MJ, Inácio ML The Fight against Plant-Parasitic Nematodes: Current Status of Bacterial and Fungal Biocontrol Agents. *Pathogens*, **2022**, *11* (10), 1–22. doi: 10.3390/pathogens11101178.
- (54) Vovlas N, Nico AI, De Luca F, De Giorgi C, Castillo P. Diagnosis and molecular variability of an Argentinean population of *Nacobbus aberrans* with some observations on histopathology in tomato. *Journal of Nematology*, **2007**, *39* (1), 17–26. PMID: 19259470.
- (55) Hunt D, Karssen G. *Aphelenchoides besseyi*. *EPPO Bull*, **2004**, *34* (2), 303–308. doi: 10.1111/j.1365-2338.2004.00733.x.
- (56) Vovlas N, Troccoli A, Palomares-Rius JE, De Luca F, Liébanas G, Landa BB, Subbotin SA, Castillo P. *Ditylenchus gigas* n. sp. parasitizing broad bean: A new stem nematode singled out from the *Ditylenchus dipsaci* species complex using a polyphasic approach with molecular phylogeny. *Plant Pathology*, **2011**, *60* (4), 762–775. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02430.x.
- (57) Moens M, Perry RN. Migratory plant endoparasitic nematodes: A group rich in contrasts and divergence. *Annual Review Phytopathology*, **2009**, *47*, 313–332. doi:

10.1146/annurev-phyto-080508-081846.

- (58) Palomares-Rius JE, Escobar C, Cabrera J, Vovlas A, Castillo P. Anatomical alterations in plant tissues induced by plant-parasitic nematodes. *Frontiers in Plant Science*, **2017**, 8. doi: 10.3389/fpls.2017.01987.
- (59) Basson S, De Waele DGMA, Meyer AJ. Population Dynamics of *Ditylenchus destructor* on Peanut. *Journal of Nematology*, **1991**, 23 (4), 485–490. PMID: 19283159.
- (60) Haraguchi S, Yoshiga T. Potential of the fungal feeding nematode *Aphelenchus avenae* to control fungi and the plant parasitic nematode *Ditylenchus destructor* associated with garlic. *Biological Control*, **2020**, 143, 104203. doi: 10.1016/j.biocontrol.2020.104203.
- (61) Foot MA, Wood FH. Potato rot nematode, *Ditylenchus destructor* (Nematoda: Tylenchidae), infecting hops in New Zealand. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, **1982**, 10 (4), 443–446. doi: 10.1080/03015521.1982.10427916.
- (62) Zouhar M, Douda O. Axenizace fytoparazitických háďátek rodů *Ditylenchus* a *Meloidogyne* a jejich chov v in vitro podmínkách (Metodika pro praxi). *Česká zemědělská univerzita v Praze*, **2007**, 1–31. ISBN: 978-80-213-1767-3.
- (63) Chen L, Xu M, Wang C, Zheng J, Huang G, Chen F, Peng D, Sun M. Multi-copy alpha-amylase genes are crucial for *Ditylenchus destructor* to parasitize the plant host. *PLoS One*, **2020**, 15 (10). doi: 10.1371/journal.pone.0240805.
- (64) Chen J, Song B. Natural nematicidal active compounds: Recent research progress and outlook. *Journal of Integrative Agriculture*, **2021**, 20 (8), 2015–2031. doi: 10.1016/S2095-3119(21)63617-1.
- (65) Gonzalez JA, Estevez-Braun A. Phytonematicidal Activity of Aromatic Compounds Related to Shikimate Pathway. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **1997**, 58 (3), 193–197. doi: 10.1006/pest.1997.2294.
- (66) Desaegeer J, Wram C, Zasada I. New reduced-risk agricultural nematicides - rationale and review. *Journal of Nematology*, **2020**, 52 (1), 1–16. doi: 10.21307/jofnem-2020-091.
- (67) Hartwig J, Sommer H, Müller F. Nematicides. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, **2008**, 24. doi: 10.1002/14356007.a17_125.pub2.
- (68) Pandey R. Nematicidal activities of natural lignans and derivatives from milky thistle against *Meloidogyne incognita*. *Indian Phytopathology*, **2011**, 64 (2), 182–185.
- (69) Wuyts N, Swennen R, De Waele D. Effects of plant phenylpropanoid pathway

- products and selected terpenoids and alkaloids on the behaviour of the plant-parasitic nematodes *Radopholus similis*, *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne incognita*. *Nematology*, **2006**, 8 (1), 89–101. doi: 10.1163/156854106776179953.
- (70) González JA, Estevez-Braun A, Estevez-Reyes R, Ravelo AG. Inhibition of potato cyst nematode hatch by lignans from *Bupleurum salicifolium* (*Unbelliferae*). *Journal of Chemical Ecology*, **1994**, 20 (3), 517–524. doi: 10.1007/BF02059594.
- (71) Ebone LA, Kovalski M, Deuner CC. Nematicides: history, mode, and mechanism action. *Plant Science Today*, **2019**, 6 (2), 91–97. doi: 10.14719/pst.2019.6.2.468.
- (72) Ji X, Li J, Dong B, Zhang H, Zhang S, Qiao K. Evaluation of fluopyram for southern root-knot nematode management in tomato production in China. *Crop Protection*, **2019**, 122, 84–89. doi:10.1016/j.cropro.2019.04.028.
- (73) Jeschke P. Latest generation of halogen-containing pesticides. *Pest Management Science*, **2017**, 73 (6), 1053–1066. doi: 10.1002/ps.4540.
- (74) Věstník Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského. *Seznam povolených přípravků a pomocných prostředků na ochranu rostlin 2019*. **2019**, 1–571.
- (75) An G, Hong T, Park H, Lim W, Song G. Science of the Total Environment Oxamyl exerts developmental toxic effects in zebra fish by disrupting the mitochondrial electron transport chain and modulating PI3K / Akt and p38 Mapk signaling. *Science of The Total Environment*, **2023**, 859, 160458. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.160458.
- (76) Pallichov K. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. *Sekce zemědělských vstupů na ochranu rostlin*. **2019**, 0–3.
- (77) Gabriel A, Venâncio C, Sousa JP, Leston S, Ramos F, Soares AMVM, Lopes I. Soil pH matters in the ecotoxicity of Basamid® to freshwater microalgae and macrophytes. *Science of The Total Environment*, **2023**, 859, 160165. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.160165.
- (78) Sasanelli N, Konrat A, Migunova V, Toderas I, Iurcu-straiataru E, Rusu S, Bivol A, Andoni C, Veronico P. Review on Control Methods against Plant Parasitic Nematodes Applied in Southern Member States (C Zone) of the European Union. *Agriculture*, **2021**, 11 (7), 1–19. doi: 10.3390/agriculture11070602.
- (79) Herrmann KM, Weaver LM. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **1999**, 50 (1), 473–503. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.473.
- (80) Vanholme B, Houari IE, Boerjan W. Bioactivity : phenylpropanoids' best kept secret.

- Current Opinion in Biotechnology*, **2019**, 56, 156–162. doi: 10.1016/j.copbio.2018.11.012.
- (81) Park SY, Yang D, Ha SH, Lee SY. Metabolic Engineering of Microorganisms for the Production of Natural Compounds. *Advanced Biosystems*, **2018**, 2 (1), 1700190. doi: 10.1002/adbi.201700190.
- (82) Kusakabe A, Wang C, Xu Y, Molnár I, Stock SP. Selective Toxicity of Secondary Metabolites from the Entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus luminescens sonorensis* against Selected Plant Parasitic Nematodes of the Tylenchina Suborder. *Microbiology Spectrum*, **2022**, 10 (1), 1–17. doi: 10.1128/spectrum.02577-21.
- (83) Li H, Liu Q, Liu Z, Du S, Deng Z. Chemical Composition and Nematicidal Activity of Essential Oil of *Agastache rugosa* against *Meloidogyne incognita*. *Molecules*, **2013**, 18 (4), 4170–4180. doi: 10.3390/molecules18044170.
- (84) El-Habashy DE, Abdel Rasoul MA, Abdelgaleil SAM. Nematicidal activity of phytochemicals and their potential use for the control of *Meloidogyne javanica* infected eggplant in the greenhouse. *European Journal of Plant Pathology*, **2020**, 158 (2), 381–390. doi: 10.1007/s10658-020-02079-6.
- (85) Maheshwari DK, Anwar M. Nematicidal Activity of Some Phenolics on Root Knot, Growth and Yield of *Capsicum frutescens* cv. California Wonder. *Journal of Phytopathology*, **1990**, 129 (2), 159–164. doi: 10.1111/j.1439-0434.1990.tb04299.x.
- (86) Du N, Cao S, Yu Y. Research on the adsorption property of supported ionic liquids for ferulic acid, caffeic acid and salicylic acid. *Journal of Chromatography B*, **2011**, 879 (19), 1697–1703. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.04.013.
- (87) Zálešák F, Bon DJ-YD, Pospíšil J. Lignans and Neolignans: Plant Secondary Metabolites as a Reservoir of Biologically Active Substances. *Pharmacological Research*, **2019**, 146, 104284. doi: 10.1016/j.phrs.2019.104284.
- (88) Kubanek J, Hay ME, Brown PJ, Lindquist N, Fenical W. Lignoid chemical defenses in the freshwater macrophyte *Saururus cernuus*. *Chemoecology*, **2001**, 11 (1), 1–8. doi: 10.1007/PL00001826.
- (89) Karimi G, Vahabzadeh M, Lari P, Rashedinia M, Moshiri M. „Silymarin“, a promising pharmacological agent for treatment of diseases. *Iranian journal of basic medical sciences*, **2011**, 14 (4), 308–317. PMID: 23492971.
- (90) Zhuo HS, Ni HH, Ma QY, Mo MH, Zhu ML, Dai HF, Ji YP, Wang QH, Zhao YX. The phytochemicals with antagonistic activities toward pathogens of a disease complex caused by *Meloidogyne incognita* and *Ralstonia solanacearum*. *Journal of*

- Pure and Applied Microbiology*, **2015**, 9 (1), 209–213. doi: 10.13140/RG.2.1.2195.9849.
- (91) Chitwood DJ. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology*, **2002**, 40, 221–249. doi: 10.1146/annurev.phyto.40.032602.130045.
- (92) Midkiff D, San-Miguel A. Microfluidic Technologies for High Throughput Screening Through Sorting and On-Chip Culture of *C. elegans*. *Molecules*, **2019**, 24 (23), 4292. doi: 10.3390/molecules24234292.
- (93) Kamath R. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods*, **2003**, 30 (4), 313–321. doi: 10.1016/S1046-2023(03)00050-1.
- (94) Kutscher LM. Forward and reverse mutagenesis in *C. elegans*. *WormBook*, **2014**, 1–26. doi: 10.1895/wormbook.1.167.1.
- (95) Wong ATS, Tylka GL, Hartzler RG. Effects of Eight Herbicides on In Vitro Hatching of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, **1993**, 25 (4), 578–584. PMID: 19279812.
- (96) Lucanic M, Garrett T, Gill MS, Lithgow GJ. A Simple Method for High Throughput Chemical Screening in *Caenorhabditis Elegans*. *Journal of Visualized Experiments*, **2018**, (133), e56892. doi: 10.3791/56892.
- (97) Ward S. Chemotaxis by the Nematode *Caenorhabditis elegans*: Identification of Attractants and Analysis of the Response by Use of Mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1973**, 70 (3), 817–821. doi: 10.1073/pnas.70.3.817.
- (98) Oh W, Jeong P, Joo H, Lee J, Moon Y, Cheon H, Kim J-H, Lee Y-U, Shim Y-H, Paik Y-K. Identification and Characterization of a Dual-Acting Antinematodal Agent against the Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *PLoS One*, **2009**, 4 (11), e7593. doi: 10.1371/journal.pone.0007593
- (99) Boyd WA, McBride SJ, Rice JR, Snyder DW, Freedman JH. A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction assay. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2010**, 245 (2), 153–159. doi: 10.1016/j.taap.2010.02.014.
- (100) Inglese J, Auld DS. High Throughput Screening (HTS) Techniques: Applications in Chemical Biology. V: *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. John Wiley & Sons, **2008**. doi: 10.1002/9780470048672.webc223.
- (101) Szymański P, Markowicz M, Mikiciuk-Olasik E. Adaptation of High-Throughput Screening in Drug Discovery—Toxicological Screening Tests. *International Journal*

- of Molecular Sciences*, **2011**, *13* (1), 427–452. doi: 10.3390/ijms13010427.
- (102) O'Reilly LP, Luke CJ, Perlmutter DH, Silverman GA, Pak SC. *C. elegans* in high-throughput drug discovery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2014**, *69–70*, 247–253. doi: 10.1016/j.addr.2013.12.001.
- (103) Gunderson E, Bulman C, Luo M, Sakanari J. In vitro screening methods for parasites : the wMicroTracker & the WormAssay. *microPublication Biology*, **2020**. doi: 10.17912/micropub.biology.000279.
- (104) Cammalleri SR, Knox J, Roy PJ. Culturing and Screening the Plant Parasitic Nematode *Ditylenchus dipsaci*. *Journal of Visualized Experiments*, **2022**, (179), e63438. doi: 10.3791/63438.
- (105) Nagashima K, Yamano Y, Sugimoto S, Ishiwata K, Kanuka H, Otsuka H, Matsunami K. Nematicidal compounds of *Peperomia japonica*. *Phytochemistry Letters*, **2018**, *27*, 30–35. doi: 10.1016/j.phytol.2018.06.015.
- (106) Beebe DJ, Mensing GA, Walker GM. Physics and Applications of Microfluidics in Biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*, **2002**, *4* (1), 261–286. doi: 10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916.
- (107) Beeman AQ, Njus ZL, Pandey S, Tylka GL. Chip Technologies for Screening Chemical and Biological Agents Against Plant-Parasitic Nematodes. *Phytopathology*[®], **2016**, *106* (12), 1563–1571. doi: 10.1094/PHYTO-06-16-0224-R.
- (108) Cornaglia M, Lehnert T, Gijs MAM. Microfluidic systems for high-throughput and high-content screening using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Lab Chip*, **2017**, *17* (22), 3736–3759. doi: 10.1039/C7LC00509A.
- (109) Carr JA, Parashar A, Gibson R, Robertson AP, Martin RJ, Pandey S. A microfluidic platform for high-sensitivity, real-time drug screening on *C. elegans* and parasitic nematodes. *Lab Chip*, **2011**, *11* (14), 2385–2396. doi: 10.1039/c1lc20170k.
- (110) Risi G, Aguilera E, Ladós E, Suárez G, Carrera I, Álvarez G, Salinas G. *Caenorhabditis elegans* Infrared-Based Motility Assay Identified New Hits for Nematicide Drug Development. *Veterinary Sciences*, **2019**, *6* (1), 29. doi: 10.3390/vetsci6010029.
- (111) Ellerbrock BR, Coscarelli EM, Gurney ME, Geary TG. Screening for Presenilin Inhibitors Using the Free-Living Nematode, *Caenorhabditis elegans*. *SLAS Discovery*, **2004**, *9* (2), 147–152. doi: 10.1177/1087057103261038.
- (112) Bird AF, Bird J. The Egg. V: *The Structure of Nematodes*. Elsevier, **1991**, 7–43. doi: 10.1016/B978-0-12-099651-3.50008-3.

- (113) Taki AC, Byrne JJ, Boag PR, Jabbar A. Practical High-Throughput Method to Screen Compounds for Anthelmintic Activity against *Caenorhabditis elegans*. *Molecules*, **2021**, 26 (14), 4156. doi: 10.3390/molecules26144156.
- (114) Konrádová D. Biological Applications of Secondary Plant Metabolites of Phenyl Propanoid Origins, Palacký University Olomouc, **2019**.
- (115) Ikeuchi K, Murasawa K, Yamada H. A Simple Method for the Preparation of Stainless and Highly Pure Trichloroacetimidates - Supporting Information. *Synlett* **2019**, 30 (11), 1308–1312.
- (116) Ikeuchi K, Murasawa K, Yamada H. A Simple Method for the Preparation of Stainless and Highly Pure Trichloroacetimidates - Supporting Information. *Synlett* **2019**, 30 (11), 1308–1312.
- (117) Segers R, Butt TM, Kerry BR, Beckett A, Peberdy JF. The role of the proteinase VCP1 produced by the nematophagous *Verticillium chlamyosporium* in the infection process of nematode eggs. *Mycological Research*, **1996**, 100 (4), 421–428. doi: 10.1016/S0953-7562(96)80138-9.
- (118) Bradbury FR, Campbell A, Suckling CW, Jameson HR, Peacock FC. The nematicidal properties of azides. *Annals of Applied Biology*, **1957**, 45 (2), 241–250. doi: 10.1111/j.1744-7348.1957.tb00462.x.
- (119) Forge TA, Macguidwin AE. Nematode autofluorescence and its use as an indicator of viability. *Journal of Nematology*, **1989**, 21 (3), 399–403. PMID: 19287626.
- (120) Perry RN. Plant Signals in Nematode Hatching and Attraction. V: *Cellular and Molecular Aspects of Plant-Nematode Interactions*. Springer, **1997**, 38–50. doi: 10.1007/978-94-011-5596-0_4.
- (121) Tefft PM, Bone LW. Zinc-mediated hatching of eggs of soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. *Journal of Chemical Ecology*, **1984**, 10 (2), 361–372. doi: 10.1007/BF00987863.
- (122) Wang H, Mao J, Li R, Luo D, Zhao G, Li H. A culture technique for *Ditylenchus destructor* on sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Nematology*, **2016**, 18 (4), 501–503. doi: 10.1163/15685411-00002969.
- (123) Brzezinska MS, Jankiewicz U. Production of Antifungal Chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and Its Potential Role in the Biological Control. *Current Microbiology*, **2012**, 65 (6), 666–672. doi:10.1007/s00284-012-0208-2.
- (124) Zuckerman BM, Jansson H-B. Nematode Chemotaxis and Possible Mechanisms of Host/Prey Recognition. *Annual Review of Phytopathology*, **1984**, 22 (1), 95–113. doi:

10.1146/annurev.py.22.090184.000523.

- (125) Margie O, Palmer C, Chin-Sang I. *C. elegans* Chemotaxis Assay. *Journal of Visualized Experiments*, **2013**, (74), e50069. <https://doi.org/10.3791/50069>.
- (126) Sikder MM, Vestergård M. Impacts of Root Metabolites on Soil Nematodes. *Frontiers in Plant Science*, **2020**, *10*, 1–18. doi: 10.3389/fpls.2019.01792..
- (127) Mcmillian M K, Li L, Parker JB, Patel L, Zhong Z, Gunnett JW, Powers WJ. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biology and Toxicology*, **2002**, *18*, 157–173. doi: 10.1023/a:1015559603643.

Internetové reference:

1. Internetový zdroj 1: (7.11.2022)
<https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/IMAGES/introfig1.jpg>
2. Internetový zdroj 2: (20.4.2023)
<https://emedicine.medscape.com/article/224011-overview>
3. Internetový zdroj 3: (24.4.2023)
<https://eagri.cz/public/app/eagriapp/por/Vyhledavani.aspx?pripravek=Vydate%2010%20G&firma=DuPont%20CZ%20s.r.o.>
4. Internetový zdroj 4: (24.4.2023)
<https://eagri.cz/public/app/eagriapp/por/Vyhledavani.aspx?pripravek=Basamid&firma=Kamesho%20Soil%20Treatment%20SPRL/BVBA>
5. Internetový zdroj 5: (25.4.2023)
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK116080/#feeding_sec1