

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program Biologie

Studijní obor Biologie



Miroslav Homola

Peritrofická matrix dvoukřídlého krevsajícího hmyzu
Peritrophic matrix of bloodsucking Dipteran insects

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Jovana Sádlová, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne: 30. 04. 2014

.....

Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat svým rodičům za umožnění vysokoškolského studia, které se stalo mým koníčkem. Celé své rodině děkuji za podporu a pochopení v těžkých situacích, které se během něj vyskytly. Chtěl bych také poděkovat mojí školitelce Jovaně Sádlové, která mi byla během mého studia s obrovskou dávkou trpělivosti nápomocná nejen při sepisování této práce.

Abstrakt

Peritrofická matrix je nebuněčný extracelulární obal, který odděluje střevní epitel od trávené potravy. V trávicím traktu živočichů plní nejrůznější funkce: chrání střevní epitel před mechanickým poškozením a toxickými látkami, zlepšuje funkci trávení a především pomáhá chránit epitel střeva před patogeny. Posledně zmiňovaná funkce je dle některých hypotéz hlavním důvodem výskytu této struktury napříč živočišnou říší.

Peritrofická matrix se vždy skládá z chitinového základu, který může být organizován třemi základními způsoby (náhodné, čtverečné a hexagonální). Chitinová vlákna dodávají peritrofické matrix pevnost a pružnost. Na tuto chitinovou mřížku jsou navázány nejrůznější proteoglykany a proteiny s velmi variabilní glykosilací. Tyto proteiny – peritrofiny – určují velikost pórů v peritrofické matrix a udávají tak její prostupnost pro nejrůznější molekuly, především pro trávicí enzymy.

Tato bakalářská práce se blíže zabývá peritrofickou matrix u hmyzu sensu stricto – šestinozů (Hexapoda) se zvláštním zaměřením na krevsající dvoukřídle (Diptera). V jednotlivých kapitolách budou blíže popsány názory na její nomenklaturu, výskyt v rámci živočišné říše, typy tvorby, složení, indukce tvorby, proces vzniku a zániku a především funkce, které peritrofická matrix plní v zažívacím traktu hmyzu, především na funkci obrany před patogenními organismy.

Klíčová slova: peritrofická matrix, krevsající dvoukřídle, Diptera, peritrofiny, chitin

Abstract

The peritrophic matrix is an acellular envelope which surrounds the food bolus in the midgut of many animal species (especially in insects). It fulfils many functions in the midgut e. g.: protects the gut against an abrasion and against toxic substances, improves the digestion of food and protects the gut epithelium against pathogens. The last function might be the main reason of the occurrence of the peritrophic matrix in large amount of insect species.

The peritrophic matrix is composed of chitin fibres and proteins. Chitin provides the peritrophic matrix strength and flexibility. Chitin fibres can be organised into three elementary structures: random, hexagonal and squared. The size of pores in peritrophic matrix depends on incorporated proteins – especially peritrophins. These pores determine the permeability of the peritrophic matrix for various penetrating molecules including digestive enzymes.

This bachelor thesis is focused on Insecta sensu stricto (Hexapoda) and mainly on the order Diptera, especially bloodsucking species. Following chapters review recent information about the peritrophic matrix and its nomenclature, occurrence, assembling, composition and functions.

Key words: peritrophic matrix, bloodsucking Diptera, peritrophins, chitin

Obsah:

1. Úvod práce	1
2. Úvod do studia peritrofické matrix	3
2.1 Objev peritrofické matrix a její nomenklatura	3
2.2 Definice peritrofické matrix	4
2.3 Výskyt peritrofické matrix	5
2.4 Evoluce peritrofické matrix	6
3. Analogické a homologické struktury	7
3.1 Perimikrovilární membrána	7
3.2 Peritrofický gel	8
4. Morfologie střevního epitelu	8
5. Struktura a složení peritrofické matrix	10
5.1 Chitinová kostra peritrofické matrix	10
5.2 Syntéza chitinu	12
5.3 Proteiny peritrofické matrix	13
6. Indukce a typy tvorby peritrofické matrix	15
6.1 Typy tvorby peritrofické matrix	15
6.1.1 Peritrofická matrix typu 1	15
6.1.2 Peritrofická matrix typu 2	16
6.2 Indukce tvorby peritrofické matrix	18
6.3 Kinetika tvorby peritrofické matrix	19
7. Morfologie peritrofické matrix	20
7.1 Anteriorní plug	20
7.2 Morfologické struktury na posteriorním konci	20
7.3 Změny během trávení krve	21
8. Speciální využití peritrofické matrix	21
8.1 Mekoniální peritrofická matrix	21
8.2 Peritrofická matrix jako materiál pro kuklení	23

9. Funkce peritrofické matrix	24
9.1 Ochrana před mechanickým poškozením	24
9.2 Ochrana před patogeny	24
9.2.1 Obrana střevního epitelu	24
9.2.2 Únik z peritrofické matrix	25
9.2.3 Důležitost funkce obrany proti patogenům	26
9.3 Ochrana před toxickými látkami	27
9.3.1 Detoxikace DDT a DDE	27
9.3.2 Detoxikace Hemu	27
9.4 Vylepšení funkce trávení	28
9.4.1 Anatomie trávicího traktu	28
9.4.2 Proces trávení	29
9.4.3 Trávicí proudy	30
9.4.4 Úlohy v trávicím procesu	31
9.4.5 Propustnost peritrofické matrix	32
10. Závěr	33
11. Seznam použité literatury	34
11.1 Primární citace	34
11.2 Sekundární citace	40

Seznam zkratk:

PM – peritrofická matrix

MPM – mekoniální peritrofická matrix

PM I – jakýkoliv typ/druh peritrofické matrix, který vzniká před tvorbou PM II

PM II – jakýkoliv typ/druh peritrofické matrix, který vzniká po vytvoření PM I

AMe – anteriorní mesenteron

PoMe – posteriorní mesenteron

hod. – hodin

min. – minut

1. Úvod práce

První zmínka o peritrofické matrix (dále jen PM) pochází z roku 1762, kdy ji Pierre Lyonnet objevil v housence drvopleně obecného (*Cossus cossus*) (Peters 1992) (Terra 2001). Od té doby byla nalezena v mnoha druzích živočichů, avšak nejvíce studována je právě u hmyzu. Jedná se o nebuněčnou extracelulární strukturu oddělující trávenou potravu od střevního epitelu.

Zažívací trakt hmyzu je rozdělen do tří částí. Přední a zadní střevo jsou ektodermálního původu, a proto jsou kryty kutikulou obsahující chitin. Tato ochranná vrstva však ve středním střevě chybí a její funkci zde do určité míry přebírá PM, jejíž esenciální složkou je také chitin (Terra 1988). Jednotlivé chitinové mikrofibrily se tvoří u báze mikrovilů buněk střevního epitelu a mohou být uspořádány třemi základními způsoby (náhodně, čtverečně, hexagonálně) a nebo kombinacemi těchto základních uspořádání (Peters 1992). Na chitinovou mřížku jsou navázány nejrůznější proteiny – peritrofiny – a proteoglykany, obojí s velmi rozmanitou glykosilací. Ta je velice důležitá pro ochranu PM před trávicími enzymy, selektivitu pórů a zadržování vody v PM (Dostálová and Volf 2012). Peritrofiny určují velikost pórů v PM a tím i její propustnost pro trávicí enzymy, která se uplatňuje v procesu trávení (Terra 1990).

Existují dva základní typy tvorby PM, které se liší v počtu buněk mesenteronu, které jsou zapojeny do procesu její syntézy. PM typu 1 je tvořena většinou najednou všemi buňkami mesenteronu, zatímco PM typu 2 tvoří jen specializovaná skupina buněk kontinuálně po celou dobu života živočicha. Tyto specializované buňky se nacházejí v přední části mesenteronu ve speciálním útvaru, zvaném kardié. Indukce tvorby tohoto typu PM není závislá na příjmu potravy. Naproti tomu první typ PM se nejčastěji tvoří jen jako odpověď na její příjem (Peters 1992). Hlavním spouštěčem její tvorby je roztažení střevního epitelu a je tedy tvořena i v případě, že není přijata běžná potrava, ale např. jen pouze fyziologický roztok (Freyvogel and Jaquet 1965). Rozpad tohoto typu peritrofické matrix je často řízen chitinázami samotného živočicha a poté její zbytky vyloučeny s nestrávenou potravou. PM typu 2 je naproti tomu defekována spolu s nestrávenou potravou po jejím předchozím mechanickém poškození stěnou střeva, či bez její předchozí degradace (Peters 1992).

V zažívacím traktu hmyzu (a jiných živočichů) plní PM několik velmi důležitých funkcí. Oproti dřívějšímu názoru, že PM chrání střevní epitel pouze před mechanickým poškozením od trávené potravy, dnes již známe těchto funkcí mnohem více. Tato struktura je totiž zapojena do trávicího procesu a vytvářejí se kolem ní trávicí proudy, které zlepšují

proces trávení (Terra 1990). Dále se podílí na detoxikaci toxických sloučenin v potravě (od DDT až po detoxikaci hemu u krevsajících druhů) (Abedi and Brown 1961, Pascoa et al. 2002). Klíčovou rolí PM je však ochrana před patogeny. Právě tato funkce je nejspíše důvodem, proč se PM zachovala i u druhů, které přijímají pouze tekutou potravu jako někteří motýli (Lepidoptera) (Lehane 1997).

Tato bakalářská práce shrnuje současné vědomosti o PM, které platí napříč třídou hmyzu. **Většina příkladů a jednotlivých funkcí popsaných v ní je však zcela záměrně zaměřena na PM u krevsajících dvoukřídlých (Diptera), především komárů (Culicidae) a flebotomů (Phlebotominae).** Na těchto dvou posledně jmenovaných skupinách totiž v minulosti i v recentní době probíhá nejvíce výzkumů z důvodu jejich zapojení do přenosu lidských patogenů (malárie, leishmanioza atd.).

2. Úvod do studia peritrofické matrix

2.1 Objev peritrofické matrix a její nomenklatura

Peritrofickou matrix první pozoroval a zaznamenal v roce 1762 Pierre Lyonnet (Terra 2001). Tato práce pojednávala o drvopleni obecném (*Cossus cossus*) (Peters 1992). V průběhu 19. století byla tato struktura nalezena nejen v rámci hmyzu, ale i v jiných členovcích, a v roce 1890 jí Balbiani přiřkl název **peritrofická membrána (peritrophic membrane)**. Jeho původní práce je psaná ve francouzštině, proto přikládám anglický překlad z knihy *Peritrophic membranes*: „This is the name I propose to give to a sort of membranous sac which directly surrounds the food in the lumen of the intestine“ (Balbiani 1890, cit. Peters 1992).

V průběhu let se však někteří autoři domnívali, že tento název není příliš vyhovující a to z nejrůznějších důvodů. Werner Peters (1992) namítá, že struktura PM nemá nic společného s buněčnou membránou, tak jak je většinou chápána v biologii – jako lipidová dvojrůstava – a její složení a sekrece je naprosto odlišná. Dalším důvodem bylo, že název „peritrophic membrane“ je zavádějící už jen z toho pohledu, že by musela být přítomna jen jedna membrána. Tak tomu je např. u některých druhů larev dvoukřídlých (Diptera), u všech ostatních však navrhuje přejmenovat dosavadní „peritrophic membrane“ na „**peritrophic envelope**“, tedy **peritrofický obal**, který se může skládat z několika vrstev (Peters 1992). Nicméně, anatomická terminologie dovoluje použít termín membrána i pro vícevrstevné struktury, jako např. tympanální membrána, a proto se tento pokus o přejmenování stal neúspěšným (Terra 2001). Peters tak alespoň v názvu své knihy uvádí název *Peritrophic membranes*, na důkaz, že se jedná většinou o vícevrstevnou strukturu.

Úspěšný pokus o přejmenování peritrofické membrány provedl Alfredo Ramos (1994). Termín membrána navrhuje zachovat pro lipidickou dvojrůstvu a pro tuto strukturu zavedl název **peritrofická matrix (peritrophic matrix)** (dále jen PM), který ji lépe vystihuje (Ramos et al. 1994). Tento termín je drtivou většinou autorů dodnes používán.

Někteří autoři ojedinele i dnes však používají záměrně jiných termínů. Jedním z nich je Walter Terra (2001). Ten nesouhlasí s termínem peritrofická matrix, protože termín matrix označuje podle něj neuspořádanou hmotu vyplňující určitý prostor a jako příklad uvádí mitochondriální matrix. Tento termín se proto dle jeho názoru nehodí pro označení struktury obalující trávenou potravu. Navrhuje vrátit se k tradičnímu označení **peritrofická membrána (peritrophic membrane)**, pokud lze strukturu obalující trávenou potravu po vypitvání uchopit do pinzety a novým názvem **peritrofický gel (peritrophic gel)**, pokud tuto strukturu nejsme schopni uchopit do pinzety (Terra 2001).

2.2 Definice peritrofické matrix

Až v roce 1977 vytvořili Glenn Richards a Patricia Richards (Richards and Richards 1977) jednoznačná pravidla, podle kterých lze rozhodnout, zda je PM v trávicím traktu přítomna či nikoliv:

1. Pozitivní test na obsah **chitinu**, nebo spíše jeho deacetylovaného derivátu chitosanu. Sami však upozorňují na možnost, že chitin může obsahovat i potrava daného živočicha a může proto dojít k omylům při jeho detekci. Je proto důležité dbát na důkladné očištění vypreparované PM od trávené potravy.

Dále by měla PM splňovat alespoň jednu, nebo více následujících definic:

2. Musí se jednat o strukturu složenou z jednotlivých vrstev, obalující natrávenou potravu, která kolem ní tvoří „obal“ či tzv. „rukáv.“ Je jí možné izolovat z trusu živočicha, nebo přímo z obsahu jeho trávicího ústrojí.
3. Při histologickém vyšetření musí být dobře odlišitelná linie, která odděluje natrávenou potravu od zbytku střeva. Zde se však může stát, že některé z těchto linií mohou být pouze artefakty (tj. v nativním stavu se zde nevyskytovaly). Někdy se zase naopak mohou rozpustit fixací a při histologickém vyšetření nemusí být patrné. Proto **přítomnost či nepřítomnost PM nemůže být podložena jen histologickým či elektron-mikroskopickým zkoumáním**, vždy musí být doplněna pozorováním na čerstvém materiálu pro případ, kdyby během fixace došlo k jejímu rozpuštění (Freyvogel and Staubli 1965).
4. Jakákoliv rozpoznatelná vrstva produkovaná buňkami mesenteronu. V některých případech je těžké rozlišit, zda se jedná o PM, mukus či vrstvu glykokalyxu.
5. Jakákoliv membrána, či vláknitý sekret buněk mesenteronu, která může, ale také nemusí být zapojena do trávicího procesu. Toto se týká především brouků rodu *Murmidius*, kteří používají PM jak při procesu trávení, tak i pro tvorbu kokonu během kuklení (Richards and Richards 1971).

Této definice se drží i Peters ve své knize Peritrophic membranes (1992). Upozorňuje však, že první ze všech bodů, tj. pozitivní test na chitin, byl již Balbianim použit a v tomto článku se vyskytuje bez jeho ocitování. Také zdůrazňuje, že schopnost syntézy chitinu byla v říši živočichů v minulosti během vývoje několikrát ztracena, a proto **nemůže být jediným možným** vodítkem k rozpoznání PM (Peters 1992).

2.3 Výskyt peritrofické matrix

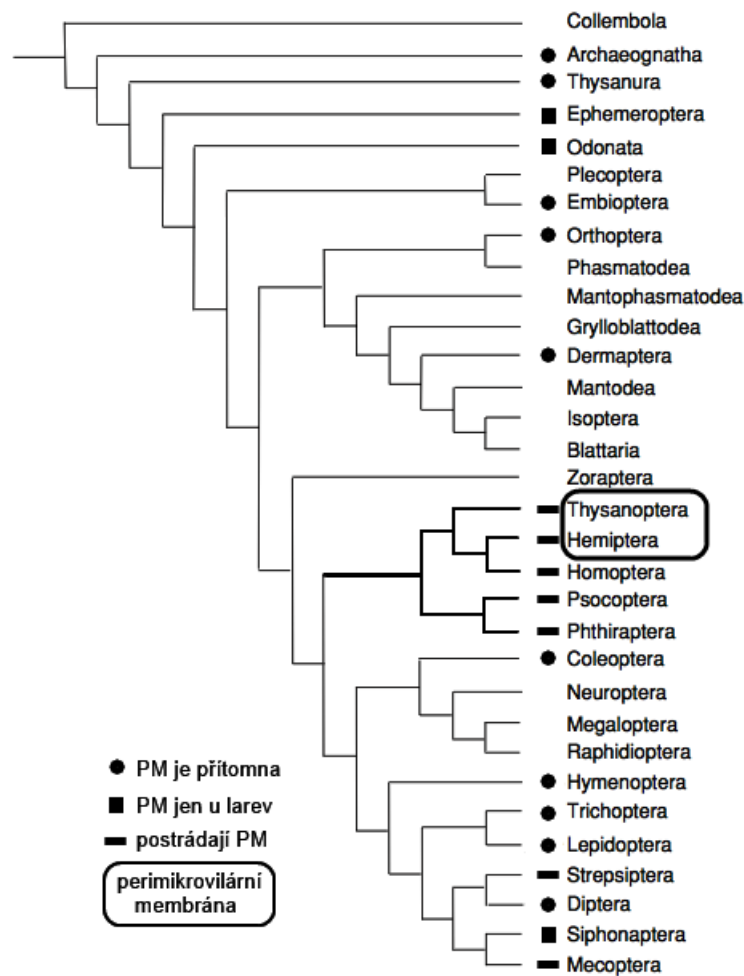
Peritrofická matrix je fenoménem nejen ve světě hmyzu. Její definici (viz výše) splňují i střevní výstelky spousty druhů živočichů z jiných kmenů. Prvním kmenem na vývojovém stromu, majícím peritrofickou matrix, jsou hlavatci (Priapulida) a dále se prolíná říší živočichů (ovšem s řadou výjimek) přes měkkýše (Mollusca), kroužkovce (Annelida), členovce (Arthropoda) a strunatce (Chordata) (Peters 1992).

Zaměříme-li se na parazitické živočichy, PM zřejmě postrádají ploštěnci (Platyhelminthes), kde zkoumanými organismy byly: motolice jaterní (*Fasciola hepatica*), motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum*) a *Haematoloechus variegatus* (Peters 1968, cit. Peters 1992). Dalším kmenem postrádajícím PM jsou hlístice (Nematoda), kde zkoumaným organismem byla škrkavka dětská (*Ascaris lubricoides*) (Peters 1992). V kmenu kroužkovců (Annelida) některé druhy pijavek (Hirudinea) mají PM, jsou to: pijavka koňská (*Haemopsis sanguisuga*) a hltanovka bahenní (*Erpobdella octoculata*), avšak pro veřejnost nejznámější pijavka lékařská (*Hirudo medicinalis*) PM postrádá, snad proto, že se na rozdíl od předešlých dvou dravých pijavek živí krví (Vierhaus 1971, cit. Peters 1992). PM klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) se tvoří, podobně jako u komárů, v přímé návaznosti na příjem krve do trávicího traktu (Samson 1909 cit. Peters 1992).

Většina zástupců ze skupiny **hmyzu tvoří PM**, avšak i zde najdeme spoustu **výjimek**. Celými řády **netvořícími PM** jsou polokřídli (Hemiptera) a třásnokřídli (Thysanoptera), kteří mají **perimikrovilární membránu** (viz kapitola 3.1). Dalšími řády, které ji netvoří, jsou pisivky (Psocoptera) a vši a všenky (Phthiraptera). V rámci ostatních řádů je absence PM spíše výjimkou. Jedná se například o několik druhů dospělců mravenců (Formicidae), mnoho dospělců motýlů (Lepidoptera), řasníků (Strepsiptera) a dospělce blech (Siphonaptera), vážek (Odonata) a jepic (Ephemeroptera). Poslední skupina v dospělosti nepřijímá potravu (Peters 1992). PM též postrádají zrnokazovití (Bruchidae), ti však místo PM mají peritrofický gel (viz kap. 3.2) (Terra 2001).

U chrostíků (Trichoptera), kteří jsou sesterskou skupinou motýlů, se PM prokazatelně vyskytuje v jejich larvách i dospělci. Zajímavostí ale je, že různé druhy larev tvoří rozdílné typy PM (PM typu 1 a PM typu 2) (Corallini 2011). U dospělců chrostíků se tvoří PM typu 1 (Mortimer 1965).

V rámci řádu Diptera se můžeme setkat s několika výjimkami, **netvořícími PM**. Je jím např. kloš ovčí (*Melophagus ovinus*), který se živí krví a je jedinou výjimkou v čeledi klošovitých (Hippoboscidae). Dalším druhem je střček ovčí (*Oestrus ovis*), jelikož má v dospělosti zakrnělé ústní ústrojí a nepřijímá tedy žádnou potravu (Waterhouse 1953).



Obr. 1: Vývojový strom hmyzu (Sinclair et al. 2003) – upraveno, s vyznačenými řády, u kterých byla zkoumána tvorba PM. U řádů označených jako tvořící PM se častou vyskytují výjimky (zvláště mezi motýly, řád Lepidoptera), které jsou však pro účel tohoto přehledu zanedbány. Zajímavostí je celá tučně vyznačená vývojová větev, kde byla ztracena schopnost tvorby PM. U druhů, které však potřebovaly strukturu s analogickou funkcí, se vyvinula perimikrovilární membrána.

Dle nejnovějších výzkumů se řád řasnokřídílí (Strepsiptera) řadí jako blízký broukům (Coleoptera). Řád stejnokřídílí (Homoptera) je dnes nově sloučen s polokřídílími (Hemiptera).

2.4 Evoluce peritrofické matrix

Podobně jako gastrointestinální mukus chrání střevní epitel u savců, tak stejně funguje i PM u hmyzu (a jiných organismů). PM se nejspíše v evoluci vyvinula právě z gastrointestinálního mukusu a peritrofiny (proteiny navázané na PM) vznikly z mucinů získáním chitin-vázající domény (Lehane 1997). Ačkoliv mezi peritrofiny a muciny nejsou žádné podobnosti v uspořádání aminokyselin, přesto v obou dvou skupinách proteinů můžeme najít podobné domény bohaté na prolin a threonin (Tellam et al. 1999).

Pokud je tento předpoklad o evoluci PM správný, původním znakem je tedy tvorba mukusu (PM) celým povrchem epitelu střeva. PM typu 1 (tvořena celým epitelem

mesenteronu) je tedy původní u všech organismů a omezení její tvorby do určitých oblastí, její náhrada peritrofickým gelem, či její absence jsou znaky odvozenými (Tellam et al. 1999).

3. Analogické a homologické struktury

3.1 Perimikrovilární membrána

Živočichové, přijímající potravu s jednoduchými cukry a aminokyselinami, které není potřeba složitě trávit, většinou postrádají PM. Je tomu tak např. u řádu polokřídých (Hemiptera), sajících mízu rostlin. Krevsající Hemiptera, kteří vznikli z těchto mízu-sajících zástupců, potřebovali, na rozdíl od nich, svou potravu před vstřebáním natrávit a museli si vyvinout náhradu PM. Tou se stala perimikrovilární membrána. PM a perimikrovilární membrána jsou tedy **strukturami analogními**, které v mesenteronu oddělují proces trávení od stěny epitelu (Terra 1988).

Jedná se, na rozdíl od PM, skutečně o membránu (**fosfolipidovou dvojvrstvu**), která vzniká sekrecí váčků s dvojitou membránou z Golgiho aparátu. Vnější membrána splývá s plazmatickou membránou mikrovilů a vnitřní membrána je vyloučena ven z buňky a splývá s perimikrovilární membránou (Silva et al. 1995). Tvorba perimikrovilární membrány není závislá na příjmu potravy a u zákeřnice *Rhodnius prolixus* je přítomna u všech jejích vývojových stádií (Lane and Harrison 1979).

Buňky střevního epitelu mají stejnou morfologii, jako např. ve střevě komára (viz kap. 4) a na jejich apikální straně jsou také pospojovány kontinuálním spojením „zonula continua“. Perimikrovilární membrána tvoří několik vrstev, z nichž nejspodnější obaluje mikrovily po celém jejich povrchu od špičky až po jejich bázi (Lane and Harrison 1979). **Pod touto membránou**, či mezi jejími vrstvami, jsou u různých dravých a krevsajících ploštic časté **symbiotické bakterie** (např. u *Rhodnius prolixus* či *Dysdercus peruvianus*). Ty jsou pod ní umístěny proto, aby nedošlo k jejich případnému vyloučení z trávicího traktu spolu s trávenou potravou (Silva et al. 1995).

3.2 Peritrofický gel

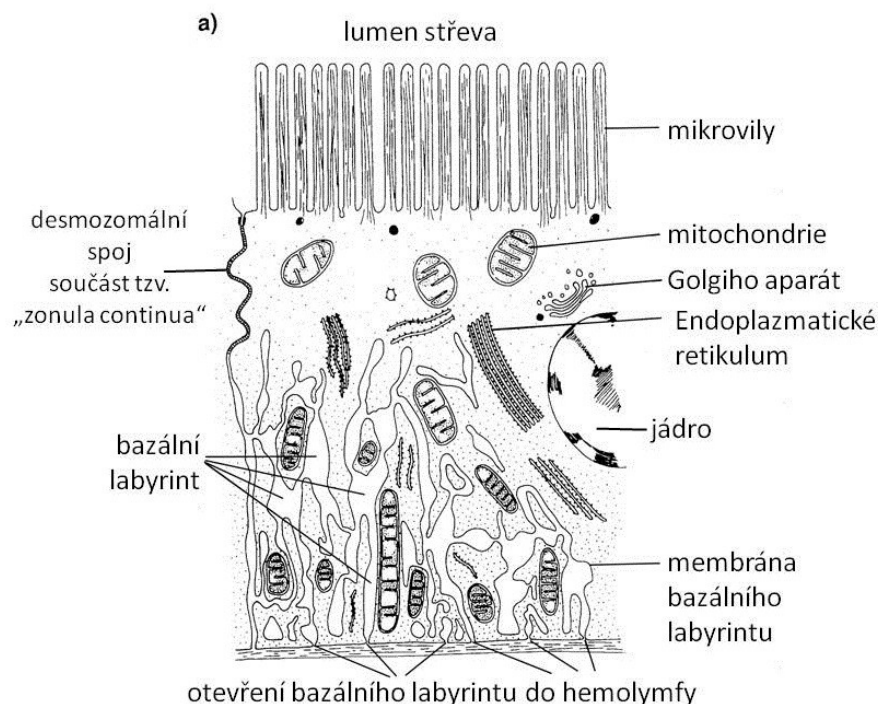
Peritrofický gel plní stejnou funkci jako PM, tedy oddělení buněk epitelu od trávené potravy. **Postrádá však chitin** a má větší propustnost. Jeho póry jsou větší než 8,6 nm, zatímco póry v PM nepřesahují průměr 8 nm (nejčastěji 7,5 nm). Vznikl pravděpodobně zjednodušením PM, jde tedy o **strukturu homologickou** (Terra 2001).

U některých druhů brouků se peritrofický gel vyskytuje pouze v přední části mesenteronu, kdežto v zadní části se tvoří PM. Souvisí to zřejmě s jejich potravou, která často obsahuje houby. Jejich buněčná stěna je v této části nízkým pH a tvorbou chitináz rozložena, a proto zde nemůže být přítomna PM, jejíž základní složkou je právě chitin (Terra 1990). U brouků čeledi **Bruchidae** peritrofický gel plně zastupuje PM. Hlavní složka jejich potravy (semena) je bohatá na **protein vicilin**, který se velmi dobře váže na chitin. Proto tyto brouci mají **pouze peritrofický gel** (Terra 2001). U střevlíkovitých brouků (Carabidae) je také PM v přední části mesenteronu nahrazena peritrofickým gelem (Ferreira and Terra 1989).

4. Morfologie střevního epitelu

Pro pochopení tvorby PM je velice důležité umět si představit, jak vypadá epitel mesenteronu, který je za její syntézu zodpovědný. Přední a zadní střevo hmyzu (stomodeum a proktodeum) je ektodermálního původu, a proto je **vystláno vrstvou kutikuly**, která je nepropustná pro vodu a plyny a chrání tyto epitely. Protože střední střevo (mesenteron) tuto **výstelku postrádá**, její **ochrannou funkci** zde zpravidla plní **PM** (Terra 1988) (viz obr. 3.)

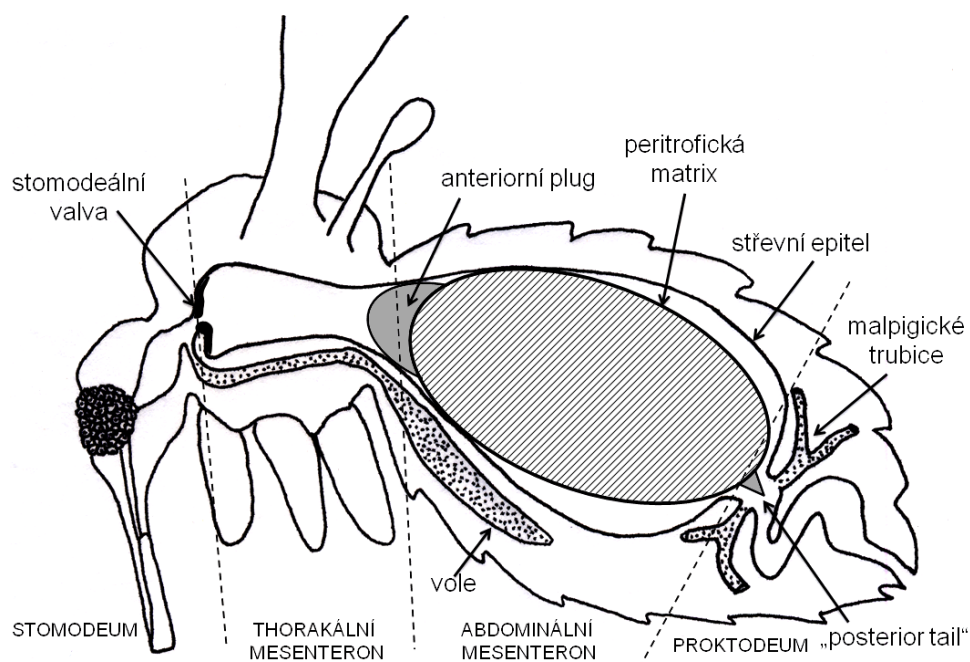
Mesenteron komárů a flebotomů je rozdělen do **tří částí**. První z nich je stomodeální valva, která je na rozhraní předního a středního střeva (stomodea a mesenteronu) a je tvořena z obou těchto epitelů. Z tohoto důvodu obsahuje i chitin. Další částí je trubicovitý anteriorní mesenteron, po kterém následuje posteriorní mesenteron, který je schopen velkého rozšíření po nasátí krve (Richardson and Romoser 1972). Epitel mesenteronu (pozorováno u *Phlebotomus duboscqi*) je složen z jedné vrstvy trávicích buněk sedících na basální lamině (viz obr. 2). Tyto buňky mají na své straně obrácené do lumen střeva mikrovily a jejich **cytoplazma obsahuje velký počet mitochondrií, ribozomů a drsného ER**. Na **apikálním konci jsou tyto buňky** (ne mikrovily) pospojovány dohromady tzv. „**zonula continua**“ (kontinuální mezibuněčný spoj) (Terra 1988). Velmi podobná morfologie trávicího epitelu byla zjištěna i u jiných druhů komárů (Freyvogel and Staubli 1965) a muchničky (Ramos et al. 1994).



Obr. 2: Složení buňky střevního epitelu. Upraveno podle (Chapman 1998).

Naproti tomu ve střevě flebotoma *Lutzomyia longipalpis* byly v mesenteronu střeva pozorovány **dva typy** buněk. První z nich tzv. „**principal cells**“ či „columnar cells“ mají sloupcovitý tvar nahoře s mikrovilární vrstvou, kulaté jádro a jejich cytoplazma je plná ER a mitochondrií. Neliší se nijak od epiteliálních buněk jiných druhů komárů či flebotomů (viz výše). Avšak **po nasátí krve** dojde ke stlačení těchto hlavních buněk a objeví se malá populace jiného druhu buněk. Tyto buňky tzv. „**dark cells**“ mají hustou cytoplazmu a mnoho mitochondrií v apikální části pod vrstvou mikrovilů. Oba dva druhy buněk jsou nejspíše zapojeny do tvorby komponent PM. U různých druhů Nematocer byly pozorovány tzv. „**endocrine cells**.“ Vždy byly viditelné pouze po stlačení buněk epitelu způsobeném nasátím krve. Neměly však nic společného s tzv. „dark cells“ viz výše (Secundino et al. 2005).

Buňky mesenteronu se po nasátí krve zploští a získají dlaždicový vzhled (Sádlová and Volf 2009, Freyvogel and Staubli 1965). Totéž bylo pozorováno u muchničky (Ramos et al. 1994) (viz kap. 6.2).



Obr. 3: Rozdělení trávicí soustavy flebotoma do jednotlivých oddílů. Dle Sádlová (nepublikováno).

5. Struktura a složení peritrofické matrix

5.1 Chitinová kostra peritrofické matrix

Uspořádání chitinových svazků mikrofibril v PM může mít:

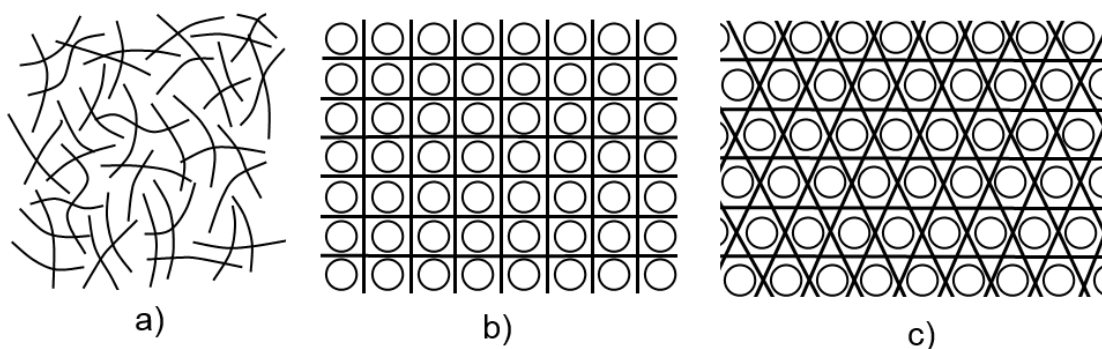
- náhodné uspořádání, bez zjevně převládajícího směru
- čtvercové uspořádání, odpovídající např. čtverečkovanému sešitu
- hexagonální uspořádání, připomínající včelí plástev

Poslední dvě jmenované možnosti uspořádání (b + c) se vyskytují **pouze v PM** a nikdy nebyly pozorovány v kutikule členovců či buněčných stěnách hub a rostlin (Peters 1992).

Mezi jednotlivými uspořádáními **nemůžeme hledat evoluční trend**. Nelze tedy říct, že na začátku vývoje stojí náhodné uspořádání a na konci hexagonální. Hexagonální struktura se často vyskytuje spolu s náhodným uspořádáním a pravděpodobně zvyšuje její pevnost (Peters 1992).

Jednotlivé svazky v PM vznikají v **mezerách mezi mikrovily** epiteliálních buněk. Napovídá tomu korelace vzdáleností mezi jednotlivými mikrovily a vzdáleností jednotlivých chitinových svazků v PM (Peters 1992). Tomuto přesvědčení odpovídají i nejrůznější nepravidelnosti ve struktuře PM, které kopírují nepravidelnosti v uspořádání mikrovilů.

Domněnku, že mikrovily buněk střevního epitelu jsou hlavním důvodem určitého formování PM do jednotlivých struktur (a + b + c), podporuje již Lehane (1977). Svazky mikrofibril mohou díky jejich uspořádání tzv. „uskočit“ o jednu řadu doprava či doleva, změnit směr o 90°, či se mohou dva svazky spojit v jeden (Peters et al. 1979).



Obr. 4: Základní tři typy uspořádání chitinových mikrofibril v PM: a) náhodné; b) čtverečné; c) hexagonální. Kruhy znázorňují průřez mikrovilem. Dle Peters (1992).

Formace chitinových svazků PM probíhá z materiálu tvořeného v buňkách **střevního epitelu a sekretovaného do lumen střeva u bází mikrovilů**. Na příčném řezu můžeme vidět i několik řad formujících se PM nad sebou. Tyto jednotlivé PM se poté mohou hromadit na koncích mikrovilů, dokud nejsou definitivně odloučeny. Takto naakumulovaných PM může být až dvacet (Peters et al. 1979).

Tvorba jednotlivých vrstev PM byla zkoumána na vnitřní PM škvora obecného (*Forficula auricularia*). Ten tvoří PM typu II (viz níže) a obsahuje dvě vrstvy. Spodní vrstva jeho PM (blíže k trávené potravě) má čtvercové uspořádání, zatímco vnější vrstva postrádá jakékoliv uspořádání chitinových mikrofibril (náhodné uspořádání). Jednotlivé vrstvy ve čtvercové vrstvě PM se formují tak, že řady chitinových svazků se skládají **jedna nad druhou** (lépe řečeno jedna pod druhou, protože k jejich formaci dochází směrem odspoda), kolmo na směr vrstvy předchozí. Několik těchto na sebe kolmých vrstev chitinových svazků tvoří jednu samostatnou vrstvu PM (Peters et al. 1979).

V místě křížení chitinových svazků **nevzniká** žádné zploštění či vyčnívající struktury, které by naznačovaly, že se v tomto místě jednotlivé svazky spojují. Díky tomu navrhl Peters tento dodnes uznávaný koncept tvorby jednotlivých vrstev PM pomocí **nad sebou ležících, navzájem kolmých chitinových svazků** (Peters et al. 1979). Tím bylo vyvráceno původní přesvědčení, že PM se vylučuje jako gel a později se z ní (v rámci minut až hodin) stává pevná membrána (Richards and Richards 1977).

Plně vytvořená PM flebotoma (*P. duboscqi*) se podobně jako PM škvora obecného (*F. auricularia*) skládá ze silné vnitřní části s amorfni strukturou chitinových mikrofibril a z tenké vnější vrstvy (Sádlová and Volf 2009). I u flebotoma *Lutzomyia longipalpis* nacházíme slabou vnější vrstvu, která sousedí s epitelem mesenteronu a silnou vnitřní, **granulózní** vrstvu (Secundino et al. 2005).

5.2 Syntéza chitinu

Chitin je syntetizován **chitin syntázou (CHS)** spojováním **GlcNAc** (N-Acetyl-D-glucosamine) podjednotek do dlouhého řetězce. Chitin se může vyskytovat ve třech formách a to α , β a γ . Chitin typu α a β se liší pouze v paralelním či antiparalelním uspořádání glukózových podjednotek. U α chitinu jsou uspořádány antiparalelně a u β chitinu je tomu naopak. Typ γ je pak směsicí obou těchto typů v různém poměru a vyskytuje se například v kokonu brouků čeledi vrtavcovitých (Ptinidae) (Jang et al. 2004). Hmyz má k dispozici **dvě chitin syntázy**. Jedna z nich (CHS1) je zodpovědná za tvorbu kutikulárního chitinu a druhá (CHS 2) je zapojena pouze do tvorby PM (Arakane et al. 2004).

V komárovi *Aedes aegypti* byl přepis genu chitin syntázy – a tím zvýšení výskytu její mRNA – přímo spojen s příjmem potravy (Kato et al. 2006). To odpovídá skutečnosti, že PM typu 1 se tvoří většinou v přímé návaznosti na příjem potravy do zažívacího ústrojí.

U komárů a flebotomů (PM 1) je po strávení krve PM degradována jejich **vlastními chitinázami**, které rozštěpají chitinové mikrofibrily a dojde k jejímu rozpadu (Araújo 2012). Chitinázy se však neúčastní jen degradace, **ale i tvorby PM**. Při ní plní dva zásadní úkoly. Kontrolu tloušťky PM (balance mezi její tvorbou a degradací) a určují její porozitu (Shen 1998). Vliv chitináz komára na tvorbě PM byla pozorována díky přidání **allosamidinu**, který ji blokuje. Takto vytvořená PM je oproti normálně vytvořené tlustější a mnohem méně organizovaná (Shahabuddin et al. 1993). Allosamidin také ovlivňuje vyloučení PM. Ta v případě jeho podání zůstává ve střevě komára až 8 dní (u 90 % jedinců), oproti 4 dnům u kontrolní skupiny (Shahabuddin et al. 1993)

5.3 Proteiny peritrofické matrix

Nejlépe bychom si mohli PM představit jako **chitinová vlákna, která jsou vnořena do obalu z proteinů. Ty určují velikost pórů PM a spojují jednotlivá chitinová vlákna k sobě** (Peters 1992). Veškeré proteiny PM mohou tvořit 22-55 % její váhy (Lehane 1997).

Proteiny PM rozdělil Tellam (1996) **do čtyř tříd podle síly jejich vazby k PM**. Provedl tuto studii na larvě bzučivky (*Lucilia cuprina*), rozdělení je však platné pro všechny ostatní živočichy:

1. třída: jde z PM odmýt pouze fyziologickým roztokem. Tvoří méně než 1 % veškerých proteinů asociovaných s PM.
2. třída: je odloučena za použití slabého detergentu, který je nutný jak k rozbití vazeb mezi jednotlivými proteiny, tak vazeb mezi nimi a chitinovou kostrou PM. Tato třída tvoří přibližně 2 % z celkového počtu proteinů PM.
3. třída: lze odloučit od PM za pomoci např. 6M močoviny. Proteiny do této třídy (a následující) spadající jsou pevně vázány na PM a nazývají se **peritrofiny**. Tvoří přibližně 11 % proteinů PM.
4. třída: je tak pevně vázána na PM, že tyto peritrofiny nelze odmýt ani koncentrovanou močovinou. Tyto proteiny jsou k sobě navzájem a k chitinové kostře připojeny silnými kovalentními vazbami. Tvoří nejpočetnější složku proteinů PM, celých 87 % (Tellam 1996).

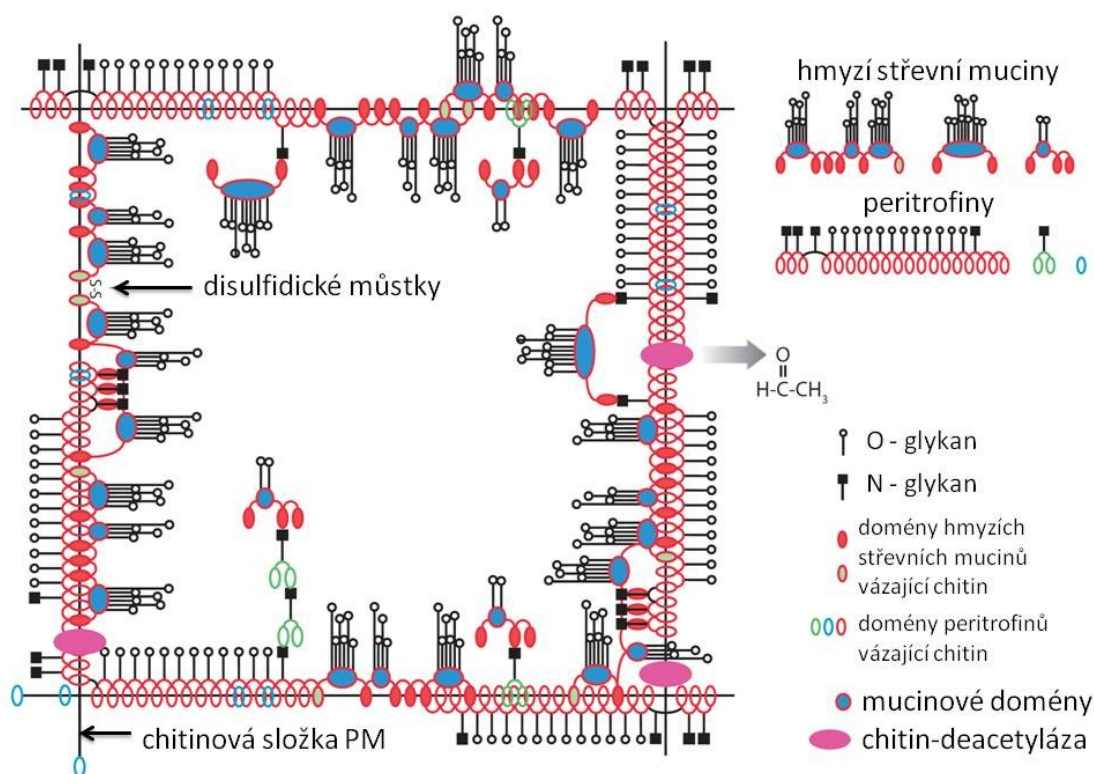
Majoritním proteinem PM komára *Aedes aegypti* (PM 1) je **Ag-Aper1**. Ten má dvě homologní chitin-vázající domény, a proto spojuje dohromady jednotlivá chitinová vlákna do 3D sítě. Jeho chitin-vázající doména je velice podobná s chitin-vázající doménou AgChi-1, což je chitináza. Díky této podobnosti je velice pravděpodobné, že se vyvinuly ze společného předka. Tato chitináza se taktéž váže (má však jen jednu doménu) na chitinová vlákna, ale na rozdíl od Ag-Aper1 je přestříhává (Shen and Jacobs-Lorena 1998).

U druhů komárů *Aedes aegypti* a *Anopheles gambiae* bylo u každého z nich izolováno více než **40 druhů proteinů PM**. Proteinové složení PM se velice liší v případě nasátí krve, či jen např. fyziologického roztoku. Podobně se výrazně liší glykosilace jednotlivých proteinů v závislosti na přijaté potravě a tento proces je velice dynamický (Moskalyk et al. 1996).

Naproti tomu pouze dva proteiny jsou přítomny v PM muchničky (*Simulium vittatum*) (PM 1). Oba dva proteiny si jsou velikostně velice podobné (66 a 61 kDa). Lze je detekovat již 15 min. po nasátí a maximum jejich tvorby je 6 hod. po nasátí (Ramos et al. 1994).

U bzučivky (*Lucilia cuprina*) více než 70 % hmoty jejích peritrofinů tvoří **peritrofin-44** a **peritrofin-48**. První z nich se vykytuje pouze u larválního stádia bzučivky. V dospělci byly zjištěny pouze stopy po jeho syntéze. Jeho domény bohaté na cystein jsou odpovědné za jeho schopnost vázat se na chitin a tím pospojovat jednotlivá chitinová vlákna mezi sebou. Je také zodpovědný za velikost pórů v PM a tudíž určuje její prostupnost (Elvin et al. 1996).

Ve flebotomech *P. paptasi*, *P. perniciosus* a *L. longipalpis* byly objeveny transkriptomy dvou molekul peritrofinů. Ty z nich, které mají více chitin-vázajících domén, se nejspíše podílejí na zesíťování chitinových mikrofibril. Ty, které mají jen jednu chitin-vázající doménu, se nejspíše podílejí na obalování volných konců chitinových mikrofibril (Dostálová and Volf 2012). Glykosilace peritrofinů určuje selektivitu pórů PM a také její propustnost pro vodu. Peritrofiny, které jsou málo glykosilované, podléhají snáze proteolytickému štěpění (Lehane 1997). V recentní době byl u flebotomů objeven v PM protein, který postrádá chitin-vázající doménu (Dostálová et al. 2011).



Obr. 5: Představa složení PM. Na chitinové mikrofibrily, které tvoří kostru PM, jsou navázané nejrůznější proteiny a glykoproteiny. Upraveno podle (Hegedus et al. 2009).

6. Indukce a typy tvorby peritrofické matrix

6.1 Typy tvorby peritrofické matrix

Tvorba PM může probíhat dvěma základními způsoby a podle tohoto způsobu tvorby se nazývají – PM 1 a PM 2. Liší se od sebe především počtem a umístěním buněk mesenteronu, které jsou zapojené do její tvorby. Dalším hlavním rozdílem je její tvar a také zda její tvorba probíhá neustále, nebo zda se tvoří pouze v návaznosti na příjem potravy. Neméně důležité jsou i rozdílné proteiny tvořící jednotlivé typy PM a struktura chitinových mikrofibril v ní.

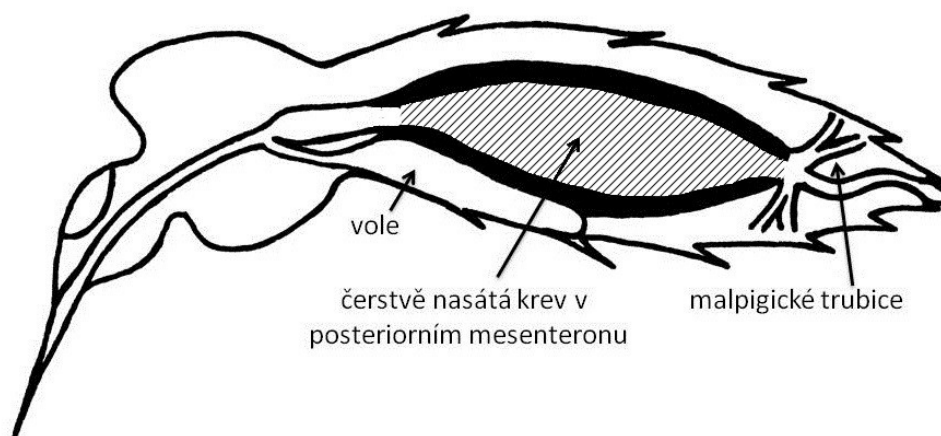
Poloha buněk mesenteronu schopných tvořit PM může být v průběhu evoluce u různých druhů posunuta směrem anteriorně, posteriorně a u některých tato schopnost může vymizet úplně (Waterhouse 1953).

Jak již bylo zmíněno, u obou typů vzniká PM v mezerách mezi mikrovily, prostoupením jejich vrstvou a následným odloučením. U PM typu II k tomu však dochází jen ve specializované části mesenteronu (Peters et al. 1979).

6.1.1 Peritrofická matrix typu 1

Je typicky tvořena **buňkami celého mesenteronu** a často se tvoří jen po příjmu potravy, např. nasátí krve (Richards and Richards 1977).

Celý mesenteron však **není při tvorbě PM synchronizován**. Pouze malé oblasti mesenteronu pracují synchronizovaně a tvoří malou celistvou část budoucí PM. Celá PM se pak skládá z těchto jednotlivých částí, které nasedají jedna na druhou a tvoří kompaktní obal (Peters 1992).



Obr. 6: Zaživací ústrojí komára s černě zvýrazněnými buňkami střevního epitelu, které se podílejí na tvorbě PM. Dle (Gusmao et al. 2007).

PM 1 se tvoří u těchto skupin hmyzu: švábi (Blattodea), všekazi (Isoptera), kudlanky (Mantodea), rovnokřídli (Orthoptera), brouci (Coleoptera), blanokřídli (Hymenoptera), motýli (Lepidoptera) a u **dospělců** komárů (Culicidae), flebotomů (Phlebotomidae), chrostíků (Trichoptera), většiny ovádů (Tabanidae) (Slu 1978), u tiplíků (Culicoides) a u muchniček (Simuliidae) (Peters 1992, Mortimer 1965, Megahed 1956, Reid and Lehane 1984).

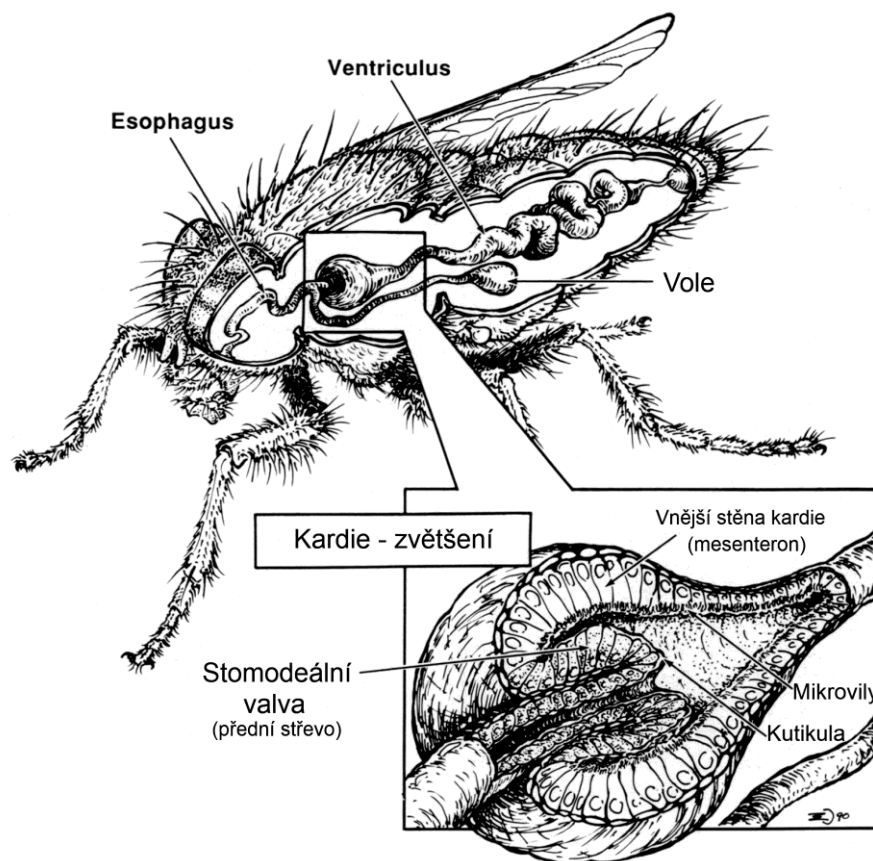
Pokud je PM tvořena jen v anteriorní části nebo jen v posteriorní části mesenteronu, **vždy se jedná o pozměněný způsob tvorby PM typu 1** (Terra 2001).

Zajímavostí v tvorbě PM typu 1 je řád rovnokřídlych (Orthoptera). Například saranče stěhovavé (*Locusta migratoria migratorioides*) tvoří PM **nezávisle na příjmu potravy**. Jeho PM se tvoří neustále. Jen v případě nedostatku potravy klesá počet vrstev PM z 10-22 na 4-6 vrstev u 72 hod. hladovějícího sarančete (Baines 1977).

6.1.2 Peritrofická matrix typu 2

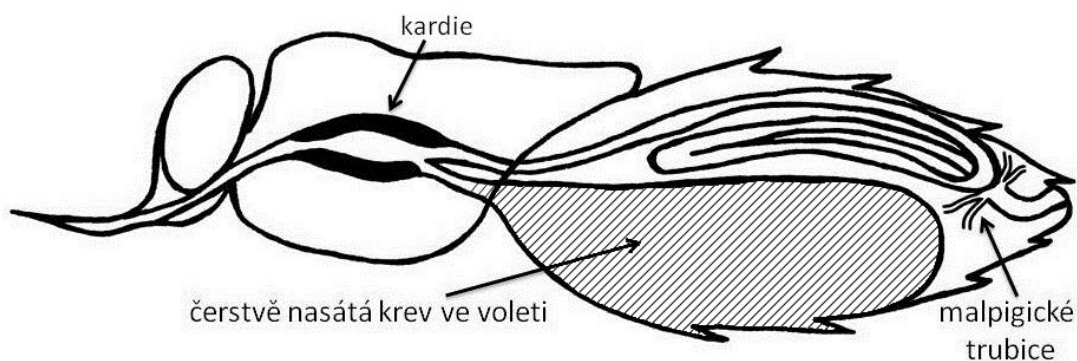
Je tvořena buňkami jen v omezeném prstenci střeva. Nejčastěji se jedná o kruhově uspořádané buňky v přední části anteriorního mesenteronu, zvaného **kardie** (proventrikulus) (Peters 1992). Ta jednak tvoří PM a jednak ovlivňuje, zda je nasátá krev uskladněna ve voleti, či v mesenteronu (Lehane 1976). Kardie leží na křížení předního střeva, středního střeva a vyústěním volete do trávicího traktu. PM typu 2 má tvar podobný rukávu (tzv. „sleeve like“ structure). **Z počátku tvorby je** na konci vedoucím dále směrem k análnímu otvoru **uzavřena**, ale to jen do chvíle, kdy je tento konec vyloučen a PM je dále **kontinuálně** syntetizována (Peters 1992). Dospělci mouchy tse-tse (*Glossina morsitans*) čerstvě po vykuklení postrádají PM. Ta se teprve začíná tvořit a celý mesenteron vyplňuje po 84 – 90 hod. (Lehane and Msangi 1991). Na konci jejího trávicího traktu mají epiteliální buňky ostré hroty, které ničí PM a její zbytky jsou spolu s nestrávenou potravou vydefekovány (Hoare 1931).

PM 2 se vyskytuje ve všech larvách i dospělých nejrůznějších dvoukřídlych (Diptera) s výjimkou dospělců krevsajících zástupců. Zde ale opět několik **výjimek**. Bodalka stájová (*Stomoxys calcitrans*) a moucha tse-tse (*Glossina morsitans*) tvoří i v dospělých PM typu 2 (viz dále) (Peters 1992).



Obr. 7: Zažívací trakt octomilky (*Drosophila melanogaster*) se zvětšenou oblastí, kde se nachází kardia. Upraveno podle (King 1991).

U komárů a flebotomů nasátá krev rovnou putuje do posteriorního mesenteronu, a teprve poté dochází k tvorbě PM. Ta se zde během trávení krve pouze zmenšuje a deformuje. Naproti tomu bodalka stájová (*Stomoxys calcitrans*) tvoří PM typu 2, ačkoliv se živí krví podobně jako komár. **Nasátou krev totiž shromažďuje v anteriorním mesenteronu a postupně ji předává** do posteriorní části. Nedochází tedy k rychlému roztažení střeva, které by zde přítomná **PM typu 2 nevydržela** a s největší pravděpodobností by praskla (Terra 2001). Moucha tse-tse (*Glossina morsitans*) také může tvořit PM 2 díky tomu, že veškerá nasátá **potrava putuje okamžitě do volete**, odkud je postupně přečerpávána do mesenteronu (Peters 1992).



Obr. 8: Zaživací ústrojí mouchy tse-tse s černě zvýrazněnými buňkami podílejícími se na tvorbě PM. Upraveno podle (Peters 1992).

6.2 Indukce tvorby peritrofické matrix

Tvorba PM 1 je podmíněna (vyjma sarančat) roztažením epitelu v mesenteronu. Např. PM u komárů se tvoří i po vstříknutí fyziologického roztoku, či vzduchu do trávicího traktu komára přes anální otvor a to jak u druhu *Aedes aegypti*, tak u *Anopheles stephensi*. Takto vzniklá PM se však **značně liší** od té, která se tvoří po nasátí krve. Na rozdíl od ní je slabá, přesto ale celistvá. Tato PM je slabá proto, že na ní **nejsou navázány žádné proteiny**, které se tvoří jen v návaznosti na **požití krve** (Freyvogel and Jaquet 1965).

Po nasátí dochází u **buněk střevního epitelu k velkým morfologickým změnám**. Roztažením epitelu se buňky zploští a získají dlaždicový tvar. Zploští se i jádro a hrubé ER tvoří spirály. Buňky epitelu se navrátí do své původní výšky po 12 hod. a do svého původního sloupcovitého tvaru po 72 hod., kdy dochází k nejintenzivnějšímu trávení (pozorováno na *Phlebotomus duboscqi*) (Sádlová and Volf 2009). Stejný tvar buněk střevního epitelu po nasátí krve byl pozorován i u *Aedes triseriatus* (Richardson and Romoser 1972) a jiných druhů komárů (Freyvogel and Staubli 1965). Ramos (1994) pozoroval, že u muchničky (*Simulium vittatum*) po nasátí krve dochází kromě zploštění buněk také ke snížení počtu mikrovilů. Pravděpodobně dojde k jejich vstřebání do epiteliálních buněk. Avšak 6 hod. po nasátí jsou mikrovily přítomny ve stejném počtu jako před nasátím a tvoří tzv. „**brush border**“ (Ramos et al. 1994). Totéž bylo pozorováno i u tiplíka (*Culicoides nubeculosus*) (Megahed 1956). Z toho tedy vyplývá, že **PM se nevytvoří, dokud nejsou buňky střevního epitelu dostatečně roztáhlé** (Freyvogel and Staubli 1965).

U dospělců komárů *Aedes aegypti* byla dále zjištěna přímá závislost mezi množstvím nasáté krve a kvalitou tvorby PM. V rozmezí nasáté krve 0 – 1,2 mg (neúplné nasátí) roste s objemem nasáté krve i výskyt PM u zkoumaných jedinců. U většiny z nich však **není celistvá** a často jí chybí zadní či přední konec. Od objemu 1,2 mg pak všichni zkoumaní

jedinci tvoří celistvou PM bez ohledu na množství nasáté krve. Jedním z důvodů nevytvoření PM v případě malého množství nasáté krve je to, že **trávení takto malého objemu trvá většinou méně než 24 hod. a za tuto dobu se PM nestihne vytvořit** (Freyvogel and Jaquet 1965). Žádná PM se netvoří v případě, že je komár krmen jen cukernou potravou, nebo není krmen vůbec (Waterhouse 1953). Totéž pozorovali na muchničky (*Simulium vittatum*) Ramos et al. (1994). U komárů je **nektar skladován ve voleti** a postupně přečerpáván do mesenteronu. Vole je vystláno kutikulou a je tudíž pro vodu neprostupné. To by však nebylo dobré u krve, kterou je třeba zbavit přebytečné vody v mesenteronu (Terra 1988). Tato přebytečná voda je u komárů (Williams et al. 1983) a flebotomů (Sádlová et al. 1998) vylučována análním otvorem v podobě kapek a to většinou již během sání na hostiteli tzv. **prediureze**. První z těchto kapek dokonce může obsahovat výjimečně i erytrocyty. **Při nasátí cukerné potravy tedy nedojde k roztažení epitelu střeva, které by indukovalo tvorbu PM**. Cukernou potravu skladují ve voleti i ovádi (Tabanidae) (Waterhouse 1953).

Na tvorbu PM nemá velký vliv druh přijaté krve (např. savčí x ptačí). Její tvorbu **neovlivňuje** ani krev s přídavkem **heparinu**, který brání koagulaci erytrocytů, ani **defibrinovaná** krev či jen příjem **krevního séra** (Freyvogel and Staubli 1965).

V případě, že samice komára nestačí vyloučit natrávenou krev z předchozího sání, při dalším nasání se **druhá PM utvoří i kolem předchozího nevyloženého zbytku**. Jeho poloha je závislá na tom, jakým způsobem jej „obteče“ nově nasátá krev a může být druhou PM (PM II) překryt celý, nebo pouze částečně, pokud se jeho část nachází již mimo mesenteron (Waterhouse 1953).

6.3 Kinetika tvorby peritrofické matrix

Na příkladu různých druhů flebotomů si můžeme ukázat, že i v rámci jedné čeledi se druhy mohou velice lišit v rychlosti, se kterou tvoří svou PM. Flebotomy můžeme tedy rozdělit do dvou skupin. Do první skupiny s **pomalou rychlostí tvorby PM** patří např. *Phlebotomus longipes*, *P. perniciosus* a *Lutzomyia longipalpis*. První náznaky tvorby PM se u nich objevují mezi **12 až 18 hod.** po nasátí. Do druhé skupiny s **rychlou tvorbou PM** patří např.: *Sergentomyia arpaklensis*, *L. spinicrassa*, *P. caucasicus*, kde první náznaky PM jsou viditelné již po **3 až 6 hodinách** a plně vytvořená PM již po 12 hod. od nasátí (Sádlová and Volf 2009).

U muchničky (*Simulium vittatum*) je kinetika PM velice rychlá. Plně vytvořená PM se u ní objevuje již 6 hod. po nasátí a 48 hod. po něm jsou všechny samice vydefekované a buňky střevního epitelu mají stejnou morfologii jako před nasátím (Ramos et al. 1994).

U komárů je vytvořena PM např. u druhu *Aedes triseriatus* mezi 23 – 25 hodinami (Richardson and Romoser 1972) a u druhu *Culex nigripalpus* okolo 13 hod. po nasátí (Romoser and Cody 1975).

Ještě před vytvořením vlastní PM se často kolem nasáté krve tvoří želatinózní obal, který je barvitelný Mallory barvením a je prvním indikátorem vznikající PM. Samice druhů *Aedes aegypti* a *Culex fatigans* mají tuto želatinózní vrstvu již několik hod. po nasátí (Waterhouse 1953). U komára *Aedes triseriatus* se tato modře barvitelná vrstva vytvoří již 20 min. od nasátí (Richardson and Romoser 1972).

7. Morfologie peritrofické matrix

7.1 Anteriorní plug

Na plně vytvořené PM typu 1 u flebotomů a komárů můžeme pozorovat tzv. **anteriorní plug** (viz obr. 3). První si této struktury všiml Waterhouse (1953), který ve svých pozorováních uvádí, že na anteriorním konci PM je někdy možno spatřit krátký, trubicovitý výrůstek (Waterhouse 1953). Anteriorní plug se vyskytuje též u ovádů (Waterhouse 1953).

Anteriorní plug je **syntetizován buňkami anteriorního mesenteronu (AMe)** a poté peristaltickými pohyby natlačen na PM. Plní funkci důležité bariéry, která odděluje anteriorní a posteriorní část mesenteronu (PoMe). Díky tomu nedochází k ovlivnění trávení krve v PoMe nejrůznějšími inhibitory proteáz, které jsou obsažené v nektaru a tráveny v AMe (Richardson and Romoser 1972). Ke stejnému závěru, tedy že anteriorní plug je tvořen AMe, se přiklání i Freyvogel a Staubli (1965). K tomu dodávají, že PM je po nějakém čase rozpuštěna ve fyziologickém roztoku, naproti tomu anteriorní plug nikoliv. To znamená, že je tedy **tvořen nejen v jiné části mesenteronu, ale i z jiného materiálu** než PM (Freyvogel and Staubli 1965).

Anteriorní plug tvoří bariéru nejen pro postup sacharidové potravy do PoMe, ale i pro leishmanie, které putují z PoMe přes AMe na stomodeální valvu. Ty musejí tedy počkat, až bude PM rozrušena a uvolní se tím vstup do AMe a teprve poté mohou kolonizovat stomodeální valvu (Sádlová and Volf 2009).

7.2 Morfologické struktury na posteriorním konci

Jako anteriorní plug, je i tato struktura vidět pouze na plně rozvinuté PM (viz obr. 3). V angličtině se užívá název „posterior tail,“ prozatím bez české varianty. Může být bud'

otevřená, či uzavřená. U flebotoma *P. duboscqi* je tento konec válcovitý a na konci uzavřený, proto z něj nemohou unikát erytrocyty volně do střeva (Sádlová and Volf 2009). Podobný tvar jako u *P. duboscqi* je přítomen i u flebotoma *P. papatasi* (Warburg 2008). Naproti tomu u druhu *P. perniciosus* je tento konec otevřen a kolem tohoto ústí je patrný tmavý prsteneček (Walters et al. 1993). U flebotoma *L. spinicrassa* je tento konec také otevřený a velice variabilní, od pouhého otvoru do PM až po válcovitou strukturu s otevřeným koncem (Walters et al. 1995).

7.3 Změny během trávení krve

Během trávení krve dochází ke změnám ve zbarvení a tvaru PM. U flebotoma *Phlebotomus duboscqi* např. začíná tvorba PM 3 hodiny po nasátí. V čase 24 hod. po sání začíná **tmavnout díky inkrustaci hemem**, který se uvolňuje při trávení červených krvinek. Toto tmavnutí postupuje od anteriorního i posteriorního konce PM směrem ke středu, kde zůstává světlý pruh. I ten je ale později zbarven. Trávení je ukončeno přibližně třetí den po nasátí. PM je v tuto dobu díky zmenšení obsahu tráveniny **zdeformovaná** a jsou na ní pozorovatelné nejrůznější **záhyby** (Sádlová and Volf 2009).

Anteriorní plug, podobně jako „**posterior tail**“, **nejsou v přímém styku s trávenou krví**, a proto **nejsou temně zbarveny** díky trávenému hemu, jako zbytek PM (Sádlová and Volf 2009). Obdobné změny ve zbarvení PM probíhají i u komárů (Freyvogel and Staubli 1965).

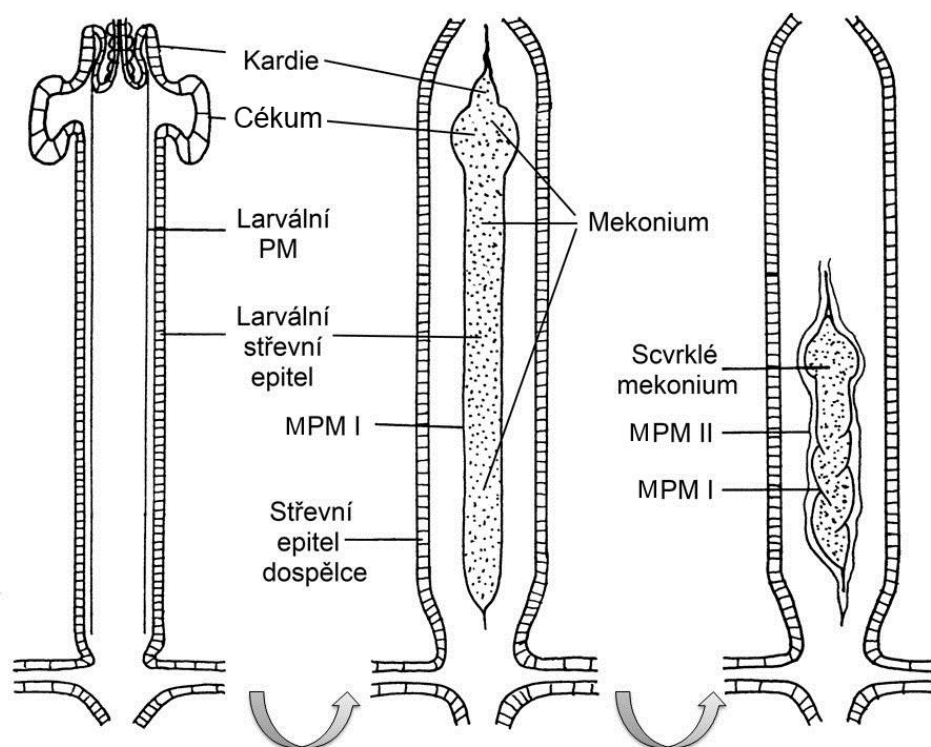
8. Speciální využití peritrofické matrix

8.1 Mekoniální peritrofická matrix

Mekonium je složeno ze **zbytků střevního larválního epitelu**, který je odloučen a nahrazen regenerujícími buňkami. Ty vytvoří střevní epitel budoucího dospělce (Christophers 1960). Mekonium samotné můžeme rozdělit do tří samostatných částí. Přední dvě části vznikají z larválního epitelu vystylajícího kardií a cékum. Největší třetí část vzniká z epitelu, vystylajícího zbytek střeva larvy (Romoser 1974). Buňky, které vystylaly kardií, tvoří úzký výběžek v přední části mekonie. Z buněk, které se nacházely v céku, vzniká na mekoniu „**vyboulčina**“ (Moncayo et al. 2005) (viz obr. 9).

Degradace mekonie probíhá tak, že nejdříve dojde k jeho degradaci v posteriorní části, poté v anteriorní a naposledy v jeho střední části. V době rozkladu mekonie se u všech

studovaných druhů objevovaly v lumen střeva (mezi mekoniem a střevním epitelem) granule, které jsou nejspíše základem budoucí MPM I (Moncayo et al. 2005).



Obr. 9: Vznik mekonia ze střevního larválního epitelu a jeho morfologické změny v čase. Upraveno podle (Romoser 1974).

Mekonium obalují dvě PM. První z nich (MPM I) vzniká v první polovině vývoje kukly a velice dobře kopíruje tvar samotného mekonia. Po natrávení a částečném zmenšení mekonia překryje MPM I ještě MPM II. Ta však, na rozdíl od MPM I, nepřiléhá tak těsně k jeho tvaru. V některých případech je opravdu velmi volná a někdy dokonce může uzavírat i vzduchovou bublinu, která se občas vyskytuje ve střevě vyvíjející se kukly, či již vylíhlého jedince. Obalený mekoniální materiál je většinou vyloučen do 24 hod. po vylíhnutí dospělé. V ojedinělých případech však může ve střevě nenakrmeného dospělé vydržet až 33 dní (pozorováno na *Culex nigripalpus*). V případě, že komár pozře potravu ještě před vyloučením zbytků mekonium, je toto mekonium uzavřeno v PM, která obaluje trávenou krev a je vyloučené spolu s ní (Romoser 1974).

MPM I tvořily všechny pozorované kukly komárů (*Aedes aegypti*, *Ochlerotatus triseriatus*, *Culex nigripalpus*, *Psorophora columbiae*, *Anopheles stephensi*) od stáří 15 – 30 hod. Do této doby však nebyla pozorována ani tvorba MPM mezi mikrovily (Moncayo et al. 2005). V jiném pokusu byla tvořena mekoniální MPM I mezi 8 – 12 hod. po zakuklení larvy

(*Anopheles stephensi*, *Culex p. pipiens*), nejpozději však 15 – 24 hod. po zakuklení (*Aedes aegypti*) (Romoser et al. 2000). **MPM II nebyla nikdy během stádia kukly pozorována.** MPM II se začíná tvořit až v čerstvě vylíhlých dospělcích, během prvních 24 hod. a je svou strukturou mnohem bližší PM, která se tvoří po nasátí krve (Moncayo et al. 2005). Toto pozorování souhlasí s předchozím (Romoser 1974), kde mekoniální MPM II taktéž nebyla pozorována u žádného druhu ve stádiu kukly (kromě několika jedinců *Anopheles stephensi*). Tvoří se až po vykuklení dospělé a to nejdříve po 24 hodinách. Tvorba a vyloučení mekoniální PM probíhá **stejně u samců i samic komárů** (Romoser et al. 2000). Velice podobná mekoniální PM, jaká byla pozorována u komárů, byla nalezena i u tiplíka *Culicoides variipennis*. Byla však u něj, na rozdíl od komárů, pozorována jen jediná MPM. Svou strukturou a načasováním tvorby odpovídá MPM I u komárů a objevuje se u tiplíka **ne dříve než 25 hod. po zakuklení** (Villalba et al. 2011).

Z předešlých výzkumů tedy vyplývá, že **PM netvoří komáři pouze po nasátí krve**, ale i ve stádiu kukly. Též není pravda, že PM vzniká pouze jako následek roztažení mesenteronu (Freyvogel and Jaquet 1965), ale i samovolně (alespoň co se týče MPM I) v okolí mekonie (Romoser 1974).

Hlavní funkcí mekoniální PM je **ochrana budoucího dospělého během stádia kukly proti bakteriím**, které může obsahovat střevo larvy. Ke snížení počtu bakterií dochází po poslední defekaci larvy, avšak ve stádiu kukly dochází opět k jeho nárůstu díky množení těch, které nebyly vydefekovány. Ve většině studovaných jedinců nebyly sice žádné bakterie nalezeny, avšak u jedinců u kterých byly bakterie přítomny, drtivá většina z nich (**97%**) byla soustředěna **uvnitř mekoniální PM** (Moll et al. 2001).

8.2 Peritrofická matrix jako materiál pro kuklení

Vrtavec průsvitný (*Gibbium psylloides*) využívá podobně jako např. larvy brouků z čeledi Murmidiinae svou PM při procesu kuklení. Vrtavec tvoří dva typy PM. **První** z nich se tvoří v průběhu celého larválního stádia a její vrstvy obsahují všechny tři typy uspořádání PM (náhodné, hexagonální i čtvercové) s převahou hexagonálního. **Druhou** z nich tvoří larva před kuklením. Vzniká utvořením PM prvního typu, jejím **rozpadem a stlačením**. Takto vzniklá struktura má podobu hedvábného vlákna a chitinové mikrofibrily jsou v ní uloženy paralelně s osou vlákna a je posléze použita na tvorbu kokonu (Tristram 1977).

9. Funkce peritrofické matrix

9.1 Ochrana před mechanickým poškozením

Jednou z funkcí PM je, že chrání střevní epitel u hmyzu před mechanickým poškozením podobně jako střevní mukus u savců (Lehane 1997). Tato funkce PM je všeobecně přijímána jako správná a některými autory dokonce vyzdvihována jako ta nejdůležitější, proč v evoluci PM stále přetrvává (Waterhouse 1953). Avšak jediní, kdo se pokusili dokázat, zda epitel mesenteronu bude v případě absence PM poškozen, byli Sudha a Muthu (1988). Ti tento pokus provedli s mutovanými housenkami bource morušového (*Bombyx mori*), které netvořily PM. Díky peristaltickým pohybům střeva a tření trávené potravy o stěny střeva opravdu došlo k **poškození jejich mesenteronu** (Sudha and Muthu 1988).

9.2 Ochrana před patogeny

9.2.1 Obrana střevního epitelu

Epitel komára je před patogeny chráněn několika způsoby. První bariéra je PM, která znemožňuje vstup infekčních organismů do epitelu. Druhou jsou enzymy tvořené přímo střevním epitelem komára, které mohou napadnout případné patogeny (Houk et al. 1979). Další překážkou jsou nejrůznější glykoproteiny a muciny, které na svém povrchu tvoří buňky mesenteronu (Abraham and Jacobs-Lorena 2004). **Patogenní organismy** ve střevě komára mohou tedy být **napadeny proteolytickými enzymy či poškozeny prudkou změnou pH**. Uniknout tomuto nepřátelskému prostředí se proto snaží buď **ještě před vytvořením PM** a počátkem tvorby trávicích enzymů – např. mikrofilárie, nebo se **nechají obalit PM**, která je zpočátku před trávicími enzymy částečně chrání – např. plasmodium (Kato et al. 2008) či leishmanie (Pimenta et al. 1997).

Mezi patogeny, kteří opouštějí mesenteron komára ještě **před vytvořením PM**, patří **arboviry**. Ty invadují epitel komára ještě před jejím vytvořením a hlavně **před tvorbou trávicích enzymů** (Houk et al. 1979). Stejně se chovají i **mikrofilárie**. Na vývojový cyklus mikrofilárie *Brugia pahangi* v komárovi *Aedes aegypti* **nemá vliv** inhibice tvorby PM, což autoři považují za důkaz toho, že opouští střevo ještě před jejím vytvořením (Kato et al. 2008).

9.2.2 Únik z peritrofické matrix

Pro **plasmodium** je PM jednou z bariér v jeho vývoji. V případě přítomnosti **dvou PM** (díky druhému nasátí krve ještě před vyloučením předchozí, která byla infekční) klesl významně počet ookinetů *Plasmodia gallinaceum* v mesenteronu komára *Aedes aegypti* o 16 % až 32 % (Billingsley and Rudin 1992). Při **přidání allosamidinu**, což je inhibitor chitináz, je **naprosto znemožněn** vývoj plasmodií v komárovi, což bylo studováno na modelech *Aedes aegypti* – *Plasmodium gallinaceum* a *Anopheles freeborni* – *Plasmodium falciparum*. Chitináza plasmodií je tedy dobrým cílem pro zablokování jejich přenosu v komárech. Samotná **chitináza** plasmodia je **aktivovaná trávicími enzymy komára** a to především trypsinem. K její aktivaci je potřeba pravděpodobně odštípnutí její části na C – konci (Shahabuddin et al. 1993). Chitináza druhu *Plasmodium gallinaceum* se začíná syntetizovat až 20 hod. po vytvoření zygoty (Huber et al. 1991). Před únikem z PM setrvává plasmodium v mesenteronu komára minimálně 24 hod., během kterých prodělávají gametocyty (nezralá pohlavní stádia) gametogenezi a posléze splynutí samčích a samičích gamet. V tomto období jsou tato stádia **velice citlivá** k trávicím enzymům komára. Při **inaktivaci tvorby PM** se podstatně **snižuje infektivita plasmodia**. PM tedy chrání (alespoň zpočátku) plasmodium před trávicími enzymy, které přes PM prostupují mnohem pomaleji (Kato et al. 2008).

Dle některých autorů by měly využívat **leishmanie** stejný způsob opuštění PM jako plasmodia a Schlein (1991) pozoroval, že v neinfikovaných flebotomech druhu *P. papatasi* dochází k rozpadu PM v její zadní části, zatímco u infikovaných *Leishmania major* v její přední části, kde je naakumulovaná největší část parazitů. Z toho usuzuje, že při úniku z PM používá leishmanie vlastní chitinázu. Jejich chitinázovou aktivitu též dokládá na poškození kutikulární výstelky stomodeální valvy po jejím obsazení leishmaniemi (Schlein et al. 1991). Ale zatímco všichni autoři se dnes shodují, že leishmanie používají svoji chitinázu k rozrušení stomodeální valvy, otázka jejího využití při úniku z PM je složitější. **Alespoň u některých druhů přenašečů a leishmanií je experimentálně prokázáno, že leishmanie pasivně čekají na rozpad PM pomocí chitináz flebotoma.** Například u druhu *P. duboscqi* nebyl rozdíl mezi degradací PM mezi skupinou samic infikovaných *L. major* a kontrolní neinfikovanou skupinou. U obou skupin se rozrušila nejprve zadní část PM a to ve stejnou dobu (Sádlová and Volf 2009). Navíc na elektron-mikroskopických řezech PM, s uvnitř uzavřenými leishmaniemi, neobjevili žádné známky poškození PM. To bylo naopak viditelné např. v okolí symbiotických kvasinek, které se přirozeně vyskytují v mesenteronu střeva.

Rychlost trávení krve není důležitá při přenosu leishmanií. Klíčovou událostí pro jejich přenos je **časový prostor mezi rozpadem PM a defekací** nestrávených zbytků. Např.

u flebotoma *Sergentomyia schwetzi* je degradace PM odložena až do doby její defekace a leishmanie tudíž nestačí opustit včas endoperitrofický prostor a obsadit střevní epitel. Proto ***S. schwetzi* není přenašečem leishmanií**. Na rozdíl od předchozího druhu např. u flebotoma *Lutzomyia longipalpis* nedochází k defekaci ihned po degradaci PM a leishmanie mohou volně opustit prostor uvnitř PM. Je tedy naopak **vhodným přenašečem leishmanií**. (Sádlová et al. 2013).

Při vývoji leishmanií však PM netvoří pouze bariéru (zmíněno výše). V časných fázích vývoje (přeměna amastigotů nasátých s krví na pohyblivé procyklické promastigoty) naopak leishmanie **chrání před účinkem trávicích enzymů**, především trypsinu (podobně chrání i plasmodium). Při zablokování PM a použití inhibitoru trypsinu, se zmenšila mortalita leishmanií oproti kontrole s normálním vývojem PM. Při **zablokování jen tvorby PM** došlo během 4 hod. po nasátí k **usmrcení více než 90 % amastigotů** (v kontrolní skupině jen 50 %). Je tedy zřejmé, že usmrcení části amastigotů během jejich vývoje ve flebotomovi je běžné, avšak u samic se zablokovanou tvorbou PM již 12 hod. po nasátí byla **zabita všechna** amastigotní stádia (Pimenta et al. 1997).

Při nákaze komára *Aedes aegypti* **virem dengue (typ 2)** dochází k **velkým změnám tvořené PM**. Ta se tvoří mnohem dříve a již po 6 hodinách od nasátí je srovnatelná s PM, která se tvoří u neinfikované krve 12 hod. Na elektron-mikroskopických řezech je pozorovatelná zvýšená tloušťka PM a více jejích vrstev poskládaných nad sebou. Jako i jiné arboviry, virus *dengue* opouští nasátou krev ještě před vytvořením PM, a proto tato **dřívější tvorba PM je zřejmě obranou komára proti němu** (Suwanmanee et al. 2009).

9.2.3 Důležitost funkce obrany proti patogenům

Ochrana před nejrůznějšími cizopasníky byla nejspíše největší evoluční výhodou organismů, které ji vlastnily. Lehane (1977) předpokládá, že právě tato funkce je hlavním důvodem jejího vývoje a udržení během evoluce i u hmyzu živícího se tekutou potravou či jinými šťávami. Naproti tomu Waterhouse (1953) se domnívá, že v případě výskytu PM u hmyzu sajícího tekutou potravu, nebyl pouze v evoluci dostatečný tlak na její vymizení. Lehane (1997) podkládá své tvrzení pozorováním na motýlech a dokazuje, že přítomnost či absence PM (alespoň v rámci řádu Lepidoptera) je dána možnou **bakteriální kontaminací potravy**. Ti zástupci motýlů, kteří se živí pouze nektarem či rostlinnými šťávami, **PM postrádají** (či tvoří PM typu 1, která nechrání tak dobře střevní epitel jako typ 2). Naopak ti zástupci, kteří se kromě rostlinných šťáv přiživují např. na hniječím ovoci, savčí moči, výkalech či mršinách **tvoří PM vždy** (a to nejčastěji typ 2) (Lehane 1997).

U komárů je velice zajímavé, že larvy tvoří PM typu 2, zatímco dospělci PM typu 1. Komáří larvy je velice těžké nakazit nějakým patogenem, zatímco dospělci jsou dobrými přenašeči spousty patogenů (Terra 2001). Toto pravidlo však neplatí bez výjimky. Moucha tse-tse (*Glossina morsitans*) tvoří PM typu 2, ale přesto je velice dobrým přenašečem patogenů (Peters 1992).

9.3 Ochrana před toxickými látkami

9.3.1 Detoxikace DDT a DDE

Další funkce PM je detoxikační. Je schopna na sebe navázat DDT či DDE, to vzniká po ztrátě HCl z DDT (dehydrohalogenace) a jedná se o první produkt jeho přirozené degradace – neztrácí však svou toxicitu. Abedi a Brown (1961) provedli pokus s **larvami** různých kmenů druhu *Aedes aegypti*, z nichž především kmen Trinidad – R byl vůči DDT rezistentní. Tento rezistentní kmen **po přidání DDT vylučoval 9x více PM**, než kmen vnímavý. PM se vylučovala z těla larvy řitním otvorem tak rychle, že na něm zůstávala často přichycena v podobě „ocásku.“ Takovýmto způsobem v nepřítomnosti DDT ani jeden z kmenů PM nevylučoval. **DDT se váže přímo na PM v podobě bílých granulí.** Zvýšená sekrece PM však nebyla pozorována u rezistentního kmenu Penang, kde je za tuto rezistenci odpovědný jiný faktor, nejspíše genetický (Abedi and Brown 1961).

9.3.2 Detoxikace Hemu

Hemoglobin je jedním z hlavních proteinů v krvi savců a jeho početnost může dosahovat až **60 %** ze všech krevních proteinů. **Během rozkladu hemoglobinu vznikají volné radikály, které způsobují oxidativní stres a poškozují buňky** (Graca-Souza et al. 2006). Hem, který vzniká při rozkladu hemoglobinu, mimoto **poškozuje membránu buňky**. Za prvé mění její propustnost, dále katalyzuje oxidaci jejích lipidů a mění jejich organizaci. Jelikož se jedná o amfifilní molekulu, je schopný se **včlenit do fosfolipidové dvojvrstvy** a při velkém poškození dochází k rozpadu buňky (Schmitt et al. 1999). **Hemoglobin není toxický pro lidský organismus**, samotný hem však toxický je, a proto i v našem těle existuje spousta chemických drah, které jej rozkládají, či alespoň přeměňují na nereaktivní sloučeniny (Kumar and Bandyopadhyay 2005).

U organismů, které **postrádají PM**, se vyvinuly nejrůznější způsoby detoxikace hemu. Jednou z nich je **přeměna hemu na hemozoin**, jak to dělá např. plasmodium. V jeho trávicích vakuolách je kyselé pH (4,5 a 5,5), které je vhodné pro přeměnu hemoglobinu na

konečný produkt hemozoin (malarické barvivo) (Goldberg et al. 1990). Stejně jako plasmodium, i krevsající ploštice *Rhodnius prolixus* přeměňuje přijatý hemoglobin na hemozoin, mechanismus přeměny je však s největší pravděpodobností odlišný (Oliveira et al. 2000b). Mimoto tato ploštice ve své krevomíze obsahuje **protein RHBP**, který se váže na hemoglobin a zabraňuje jeho rozkladu a následnému oxidativnímu stresu (Dansa-Petretski et al. 1995). Dalším organismem přeměňujícím hemoglobin na hemozoin je *Schistosoma mansoni* (Oliveira et al. 2000a).

U krevsajících organismů, **kteří vlastní PM**, právě ona hraje velice důležitou roli v detoxikaci hemu. Během procesu trávení PM postupně tmavne díky inkrustaci touto sloučeninou a maximum navázaného hemu se objevuje okolo 48 hod. po nasátí (*Aedes aegypti*). Bylo zjištěno, že v případě nasátí plazmy či latexového roztoku k této barevné změně nedochází (Pascoa et al. 2002). Jedním z proteinů, které se podílejí na navázání hemu je **AeIMUC1**. Jedná se integrální protein PM a je k ní připevněn svými chitin-vázajícími doménami. Hem váže pomocí svých šesti domén s cystein-prolin opakujícími se aminokyselinami. AeIMUC1 se začíná syntetizovat jako odpověď na nasátí krve a maximum svojí exprese dosahuje 4 hodiny po něm. Tento protein se podílí zřejmě i na detoxikaci jiných sloučenin obsahujících kov (Devenport et al. 2006). V okolí navázaného hemu je pozorovatelné v elektronovém mikroskopu veliké množství elektron-denzních granulí prozatím neznámé funkce. Komáři **nepředělávají** hem na hemozoin, protože pH ve střevě komára je mírně zásadité a tudíž nevhodné k této reakci (Pascoa et al. 2002).

Právě **detoxikace hemu je Achillovou patou všech krví se živících a v krvi žijících organismů** a tuto slabinu je možno využít v boji proti nim, jako se to povedlo např. u plasmodia (Graca-Souza et al. 2006). Lék proti malárii – **chloroquonin** – se váže na hem přímo uvnitř trávicích vakuol plasmodia a zabraňuje jeho přeměně na nereaktivní hemozoin (Goldberg et al. 1990).

9.4 Vylepšení funkce trávení

9.4.1 Anatomie trávicího traktu

Střevo hmyzu můžeme rozdělit do třech částí. (viz kap. 4) Přední střevo, střední střevo a zadní střevo, přičemž velká většina trávicích procesů se odehrává ve středním střevě (mesenteronu). Vole je jediná struktura ze stomodea (přední střevo), která je zapojena do procesu trávení a slouží většinou k jejímu shromažďování (Terra 1990). PM rozděluje mesenteron na ektoperitrofický prostor (mezi PM a střevním epitelem) a endoperitrofický prostor (uvnitř

PM) (Terra 2001). Někteří autoři taktéž vymezují přímo PM jako další prostor, ve kterém se odehrávají důležité procesy během trávení a jsou přímo na ní navázány nejrůznější enzymy (Peters 1992).

9.4.2 Proces trávení

Po příjmu potravy může být tato potrava buďto nějaký čas skladována ve voleti, či může rovnou přecházet do mesenteronu. U komárů, flebotomů a možná i jiných krevsajících Dipter je rozdílný příjem cukernaté potravy a krve. Cukerná potrava je nejprve uschována ve voleti a potom postupně čerpána do mesenteronu. Naopak krev je nasáta rovnou do mesenteronu (Terra 2001). Toto oddělení je důležité, protože proteázové inhibitory, obsažené často v nektaru, se nedostanou do přímého kontaktu s trávicími enzymy (především trypsinem) a nemohou tedy proces trávení krve ovlivnit (Gooding et al. 1973).

Samotný trávicí proces můžeme rozdělit do **tří fází** a představit si jej na příkladu smutnice (*Rhynchosciara americana* – Diptera), tvořící PM typu 2. V první, tzv. iniciační fázi trávení, dojde ke zmenšení molekulové hmotnosti trávené potravy, která poté díky tomu může projít přes PM do ektoperitrofitického prostoru. V tomto prostoru dochází k druhé fázi trávení, kdy jsou živiny rozštěpány na dimery a malé oligomery (s výjimkou trehalózy, která je rovnou degradována na dvě molekuly glukózy) a anteriorním trávicím proudem jsou unášeny dopředu. Tam jsou poté vstřebány buňkami céky, ve kterých dochází ke třetí, finální části trávení. Malá část živin je též vstřebána v posteriorním ventriculu (Terra et al. 1979). Po strávení veškeré potravy jsou nestrávené zbytky společně s PM (či jejími rezidui) vyloučeny ve formě exkrementu. Stejně jako u smutnice probíhá trávení i u ostatních Dipter.

Na rozdíl od tvorby PM, která není závislá na druhu přijaté potravy, **trávicí enzymy se tvoří u komárů jen jako odpověď na nasátou krev**. V případě nasátí pouze latexové suspenze se trávicí enzymy vůbec netvoří (trypsin), a nebo zůstávají na minimální úrovni tvorby (aminopeptidáza). V případě nasátí krve se trávicí enzymy syntetizují normálně s vrcholy 24 hod. u *Aedes aegypti* a 30 hod. po nasátí u *Anopheles stephensi*. **Syntéza trávicích enzymů není závislá na přítomnosti či absenci PM** (Billingsley and Rudin 1992).

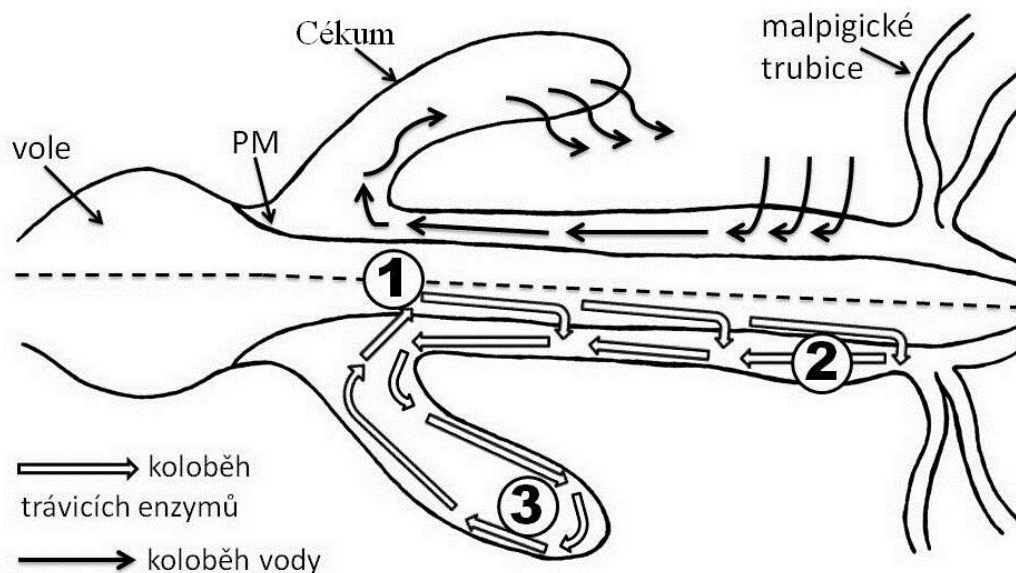
U flebotomů buňky anteriorního mesenteronu AMe nejsou schopny syntetizovat chitin (PM), přesto jsou ale zapojeny do procesu sekrece trávicích enzymů a příjmu živin, i když ne takovou měrou jako buňky PoMe (Sádlová and Volf 2009). Totéž platí i u komárů.

9.4.3 Trávicí proudy

U hmyzu s PM dochází ke **vzniku tzv. trávicích proudů** okolo a uvnitř PM. Jako první pozoroval trávicí proudy Wigglesworth (1933) při studiu análních žaber a jiných vodu-absorbujících tkání komára *Aedes aegypti*. Při požití nejrůznějších barviv larvou komára, vždy se toto barvivo naakumulovalo v céku a tím byl objeven ektoperitrofický trávicí protiproud (Wigglesworth 1933). Trávicí proudy byly prozatím studovány jen na těch zástupcích, kteří tvoří PM typu 2.

Uvnitř PM vede proud směrem posteriorně (**endoperitrofický proud**) a mezi PM a epitelem vede proud anteriorně (**ektoperitrofický proud**). Natrávené živiny se poté vstřebávají v přední části mesenteronu. Anteriorně proudící proud je důležitý při **recyklaci trávicích enzymů** (zrecyklováno je jich tak až 80 %) (Terra 1990). Voda je do prostoru střeva čerpána speciálními buňkami s krátkými mikrovily a se značně **invaginovanou bazální membránou (tzv. bazální labyrint)** (viz kap. 4), přes kterou se díky většímu povrchu může dostat více vody. Podobnou morfologii mají i buňky v přední části střeva, které jsou zodpovědné za její resorpci. Ty však mají mnohem delší mikrovily a naopak méně invaginovanou bazální membránu (Terra 1988).

U evolučně starších zástupců hmyzu (Neoptera) se voda do mesenteronu sekretuje z malpigických trubic. U evolučně mladšího hmyzu (Holometabola) se voda sekretuje pouze v omezené části posteriorního mesenteronu (před vyústěním malpigických trubic). Tato úprava vylepšuje trávení, protože se do trávicího traktu nedostávají žádné metabolity z malpigických trubic, jako u předchozí skupiny. Vývojový trend směrem k nadřádu Panorpoida (patří sem i Diptera) vede k tomu, že trávicí enzymy nevstupují do volete, jako je tomu u evolučně staršího hmyzu (Terra 1990).



1 – iniciační fáze trávení; 2 – střední f. tr.; 3 – finální f. tr. + absorpce živin

Obr. 10: Koloběh vody a trávicích enzymů v trávicím traktu hmyzu.
Upraveno podle (Terra 1988).

9.4.4 Úlohy v trávicím procesu

Podle Terra (1990) plní PM v procesu trávení tyto hlavní úlohy:

- 1) Díky rozdělení prostoru střeva na kompartmenty vznikají dimery a jiné malé částice z trávené potravy pouze v blízkosti epitelu mesenteronu a je tedy minimální pravděpodobnost, že dojde k jejich odplavení, či případnému nevstřebání, čímž se zvyšuje účinnost trávení.
- 2) PM zabraňuje vylučování enzymů spolu s trávenou potravou a tím zmenšuje potřebu syntetizovat nové trávicí enzymy.
- 3) PM zabraňuje nespecifickému navázání velkých částic trávené potravy přímo na epitel střeva, čímž by se zmenšila plocha pro vstřebávání živin.

Později bylo zjištěno, že úlohy 2 a 3 platí pro všechny zástupce hmyzu, zatímco úloha 1 platí pouze pro zástupce Panorpoida, kam patří dvoukřídlí (Diptera) a motýli (Lepidoptera) (Terra 1996).

Je zřejmé, že PM sice **zlepšuje kvalitu trávení**, ale rozhodně ji **neurychluje**. V souladu s tímto tvrzením hovoří i výsledky pokusů, kde byla tvorba PM zablokována. U druhů *Anopheles stephensi* a *Aedes aegypti* po **zablokování tvorby PM bylo trávení krve rychlejší**, než v případě její přítomnosti. Tento pokus potvrzuje, že **prostup trávicích enzymů přes PM je klíčovým faktorem v rychlosti trávení**. Při absenci PM mají tyto enzymy mnohem snadnější a rychlejší cestu k trávené potravě. Rychlost trávení (přítomnost PM) neměla vliv na počet nakladených vajec (Villalon et al. 2003).

Poslední skutečnost neplatí u flebotoma *Lutzomyia longipalpis*. U samic se zablokovanou tvorbou PM bylo sice také pozorováno rychlejší trávení, ale celkově **menší počet nakladených vajec** a jejich dřívější kladení. U těchto samic také **šestinásobně vzrostla mortalita** před vykladením. Absence PM sice urychlí trávení nasáté krve, avšak nejspíše **nedojde k úplnému rozkladu živin** nutných pro kladení vajec. Možnými příčinami mohou být jednak krátká doba trávení, jednak nevytvoření trávicích proudů při absenci PM, či také přímý kontakt epitelu s produkty trávení hemoglobinu a následný oxidativní stres (Araújo et al. 2012).

Druh komára *Anopheles maculipennis atroparvus* zřejmě **netvoří PM**. Proces trávení krve však u něj probíhá podobně jako u ostatních druhů komárů (Freyvogel and Staubli 1965).

9.4.5 Propustnost peritrofické matrix

Propustnost PM závisí na **velikosti jejích pórů**, která je daná navázanými proteiny na chitinové kostře. Póry nejsou po celé délce PM stejně veliké a i počet pórů stejné velikosti se může velice lišit. Často se jejich velikost pohybuje mezi 7-8 nm. Ta se měří buďto pomocí výskytu trávicích enzymů o známé molekulové hmotnosti v jednotlivých částech PM a elektroperitrofickém prostoru, či za pomoci dextranů. Každý z těchto dextranů obsahuje předem daný počet glukózových jednotek, které jsou nabarvené kvůli jejich lepší detekci (Terra 1990).

Velikost pórů v PM nelze stanovit pouze jejím pozorováním pod elektronovým mikroskopem. PM totiž vzniká seskládáním jednotlivých vrstev PM na sebe a výsledek je tedy podobný, jako kdybychom přes sebe střídavě naskládali plátky ementálu (Terra 1988).

Při zablokování tvorby chitinu u bzučivky *Lucilia cuprina* (typ 2 PM) došlo ke změně propustnosti PM. Při mikroskopickém pozorování však nebyly zjištěny žádné změny v její morfologii. **Z celkové váhy PM tvoří chitin u bzučivky jen 5 %**, přesto se jedná o její esenciální složku (Tellam and Eisemann 2000). Stejný pokus byl proveden i s larvami komárů (PM typu 2), kde chitináza též neměla žádný vliv na morfologii PM (sledováno optickým mikroskopem). Na rozdíl od nich, byli však dospělci (PM 1) velice citliví k přidání chitinázy a jejich PM byla poškozena. Jednou z možností vysvětlení tohoto výsledku může být to, že chitináza vpravená do střeva živočicha není v přímém kontaktu s chitinovými mikrofibrilami. Na nich jsou navázány nejrůznější proteiny (peritrofiny), které k nim nejspíše **znemožňují chitináze přístup** (Shao et al. 2001).

Velikost pórů v PM není závislá na jejím typu tvorby (PM1 x PM2) (Terra 1988).

10. Závěr

Peritrofická matrix je velice **důležitou strukturou s nezastupitelným množstvím funkcí** ve střevě hmyzu (a nejen jeho). Velké množství organismů, které ji obsahuje ve svém trávicím traktu, napovídá o její důležitosti. V případě, že některé organismy PM postrádají, často vytváření struktury, které její funkce alespoň částečně nahrazují.

Na PM bylo v minulosti provedeno spoustu výzkumů, z čehož největší pozornosti se dostalo zejména organismům, které přenášejí pro člověka infekční onemocnění – tj. zejména komárům a flebotomům. PM je zkoumána především jako možný cíl k zablokování přenosu těchto chorob. Dále je PM studována v souvislosti s hmyzími škůdci plodin. V případě zablokování tvorby či možnosti rozpadu PM v těchto škůdcích, mohou být poté napadeni nejružnějšími volně rozšířenými patogeny. Využití GMO plodin, které obsahují gen pro Bt-toxin (z *Bacillus thuringiensis*) může ztěžovat právě PM, která se často podílí na jeho detoxikaci z trávicího traktu organismů (Schmidt 2009).

Ve své magisterské práci se chci blíže věnovat právě funkci obrany střevního epitelu proti patogenům. Chtěl bych zjistit, proč některé druhy flebotomů přenášejí a jiné nepřenášejí leishmanie a potvrdit dosavadní hypotézu, že flebotom *Sergentomyia schwetzi* nepřenáší *Leishmanii donovani* díky tomu, že PM v jeho zažívacím traktu se rozpadá až velice těsně před defekací. Leishmanie tedy nemají dostatek času opustit endoperitrofický prostor a kolonizovat stomodeální valvu. Během mého magisterského studia budu studovat **zejména kinetiku tvorby a rozpadu PM ve flebotomech** – *Phlebotomus orientalis*, *P. papatasi*, *P. argentipes* a *Sergentomyia schwetzi*.

11. Seznam použité literatury

11.1 Primární citace

ABEDI, Z. H. and A. W. A. BROWN, 1961. Peritrophic Membrane as Vehicle for DDT and DDE Excretion in *Aedes aegypti* Larvae. *Annals of the Entomological Society of America*. vol. 54, pp. 539–542.

ABRAHAM, E. G. and M. JACOBS-LORENA, 2004. Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. vol. 34, no. 7, pp. 667–71.

ARAKANE, Y., D. G. HOGENKAMP, Y. CH. ZHU, K. J. KRAMER, Ch. A. SPECHT, R. W. BEEMAN, M. R. KANOST and S. MUTHUKRISHNAN, 2004. Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and alternate exon usage in one of the genes during development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 34, no. 3, pp. 291–304.

ARAÚJO, D., 2012. Disruption of the peritrophic matrix by exogenous chitinase feeding reduces fecundity in *Lutzomyia longipalpis* females. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. vol. 107, no. 4, pp. 543–545.

BAINES, D. M., 1977. Observation on the peritrophic membrane of *Locusta migratoria migratorioides* (R. and F.) nymphs. *Acrida*. vol. 7, pp. 11–22.

BILLINGSLEY, P. F. and W. RUDIN, 1992. The Role of the Mosquito Peritrophic Membrane in Bloodmeal Digestion and Infectivity of Plasmodium Species. *Journal of Parasitology*. vol. 78, no. 3, pp. 430–440.

CORALLINI, C., 2011. Structure and synthesis of the peritrophic membrane in Trichoptera larvae. *ZooSymposia*. vol. 5, pp. 63–70.

DANSA-PETRETSKI, M., J. M. C. RIBEIRO, Geórgia C. A., H. MASUDA and P. L. OLIVEIRA, 1995. Antioxidant Role of *Rhodnius prolixus* Heme-binding Protein. *The Journal of Biological Chemistry*. vol. 270, no. 18, pp. 10893–10896.

DEVENPORT, M., P. H. ALVARENGA, L. SHAO, H. FUJIOKA, M. L. BIANCONI, P. L. OLIVEIRA and M. JACOBS-LORENA, 2006. Identification of the *Aedes aegypti* Peritrophic Matrix Protein AeIMUCI as a Heme-Binding Protein. *Biochemistry*. vol. 45, no. 31, pp. 9540–9549.

DOSTÁLOVÁ, A. and P. VOLF, 2012. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*. vol. 5, no. 1, p. 276.

DOSTÁLOVÁ, A., J. VOTÝPKA, A. J. FAVREAU, K. D. BARBIAN, P. VOLF, J. G. VALENZUELA and R. C. JOCHIM, 2011. The midgut transcriptome of *Phlebotomus (Larrousius) perniciosus*, a vector of *Leishmania infantum*: comparison of sugar fed and blood fed sand flies. *BMC genomics*. vol. 12, no. 1, p. 223.

ELVIN, C. M., T. VUOCOLO, D. ROGER, I. J. EAST, G. A. RIDING, H. EISEMANN, R. L. TELLAM, R. D. PEARSON and C. H. EISEMANN, 1996. Characterization of a Major Peritrophic Membrane Protein, Peritrophin-44, from the Larvae of *Lucilia cuprina*. *The Journal of Biological Chemistry*. vol. 271, no. 15, pp. 8925–8935.

- FERREIRA, C. and W. R. TERRA, 1989. Spatial organization of digestion, secretory mechanisms and digestive enzyme properties in *Pheropsophus aequinoctialis* (Coleoptera: Carabidae). *Insect Biochemistry*. 1., vol. 19, no. 4, pp. 383–391.
- FREYVOGEL, T. A. and C. JAQUET, 1965. The prerequisites for the formation of a peritrophic membrane in Culicidae females. *Acta Tropica*. vol. 22, p. 1965.
- FREYVOGEL, T. A. and W. STAUBLI, 1965. The formation of the Peritrophic Membrane in Culicidae. *Acta tropica*. vol. 12, no. 2, pp. 118–147.
- GOLDBERG, D. E., A. F. G. SLATER, A. CERAMI and G. B. HENDERSON, 1990. Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle. *Biochemistry*. vol. 87, no. 8, pp. 2931–5.
- GOODING, R. H., A. C. CHEUNG and B. M. ROLSETH, 1973. The digestive processes of haematophagous insects: III. Inhibition of trypsin by honey and the possible functions of the oesophageal diverticula of mosquitoes (Diptera). *The Canadian Entomologist*. vol. 105, pp. 433–436.
- GRACA-SOUZA, A. V., C. MAYA-MONTEIRO, G. O. PAIVA-SILVA, G. R. C. BRAZ, M. C. PAES, M. H. F. SORGINE, M. F. OLIVEIRA and P. L. OLIVEIRA, 2006. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. vol. 36, no. 4, pp. 322–35.
- GUSMAO, D. S., A. V. SATOS, D. C. MARINI, E. S. RUSSO, A. M. D. PEIXOTO, M. B. JUNIOR, M. A. BERBERT-MOLINA and F. J. A. LEMOS, 2007. First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. vol. 102, no. 8, pp. 919–924.
- HEGEDUS, D., M. ERLANDSON, C. GILLOTT and U. TOPRAK, 2009. New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. *The Annual Review of Entomology*. vol. 54, pp. 285–302.
- HOARE, C. A., 1931. The peritrophic membrane of *Glossina* and its bearing upon the life-cycle of *Trypanosoma grayi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. vol. 25, no. 1, pp. 57–64
- HOUK, E. J., F. OBIE and J. L. HARDY, 1979. Peritrophic membrane formation and the midgut barrier to arboviral infection in the mosquito, *Culex tarsalis coquillett* (Insecta, Diptera). *Acta tropica*. 3., vol. 36, no. 1, pp. 39–45.
- HUBER, M., E. CABIB and L. H. MILLER, 1991. Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. vol. 88, no. 7, pp. 2807–10.
- CHAPMAN, R. F., 1998. *The insects structure and function*. 4th ed. B.m.: Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-57048.
- CHRISTOPHERS, R., 1960. *Aedes Aegypti The yellow fever mosquito, Its life history, bionomics and structure*. 1st ed. B.m.: Cambridge University Press. ISBN 978-0521113021.
- JANG, M., B. KONG, Y. JEONG, C. H. LEE and J. NAH, 2004. Physicochemical characterization of alfa-chitin, beta-chitin, and gama-chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. vol. 42, no. 14, pp. 3423–3432.

- KATO, N., C. R. MUELLER, J. F. FUCHS, K. MCELROY, V. WESSELY, S. HIGGS and B. M. CHRISTENSEN, 2008. Evaluation of the function of a type I peritrophic matrix as a physical barrier for midgut epithelium invasion by mosquito-borne pathogens in *Aedes aegypti*. *Vector borne and zoonotic diseases*. vol. 8, no. 5, pp. 701–12.
- KATO, N., C. R. MUELLER, J. F. FUCHS, V. WESSELY, Q. LAN and B. M. CHRISTENSEN, 2006. Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. vol. 36, no. 1, pp. 1–9.
- KUMAR, S. and U. BANDYOPADHYAY, 2005. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology Letters*. vol. 157, no. 3, pp. 175–88.
- LANE, N. J. and J. B. HARRISON, 1979. An unusual cell surface modification: a double plasma membrane. *Journal of cell science*. vol. 39, pp. 355–72.
- LEHANE, M. J., 1997. Peritrophic matrix structure. *Annual Review of Entomology*. vol. 42, pp. 525–50.
- LEHANE, M. J. and A. R. MSANGI, 1991. Lectin and peritrophic membrane development in the gut of *Glossina m. morsitans* and a discussion of their role in protecting the fly against trypanosome infection. *Medical and Veterinary Entomology*. vol. 5, pp. 495–501.
- LEHANE, M.J., 1976. Formation and histochemical structure of the peritrophic membrane in the stablefly, *Stomoxys calcitrans*. *Journal of Insect Physiology*. vol. 22, no. 11, pp. 1551–1557.
- MEGAHED, M. M., 1956. Anatomy and histology of the alimentary tract of the female of the biting midge *Culicoides nubeculosus meigen* (Diptera: Heleidae=Ceratopogonidae). *Parasitology*. vol. 23, no. 1, pp. 73–762.
- MOLL, R. M., W. S. ROMOSER, M. C. MODRZAKOWSKI, A. C. MONCAYO and K. LERDTHUSNEE, 2001. Meconial Peritrophic Membranes and the Fate of Midgut Bacteria During Mosquito (Diptera: Culicidae) Metamorphosis. *Journal of Medical Entomology*. vol. 38, no. 1, pp. 29–32.
- MONCAYO, A. C., K. LERDTHUSNEE, R. LEON, R. M. ROBICH and W. S. ROMOSER, 2005. Meconial Peritrophic Matrix Structure, Formation, and Meconial Degeneration in Mosquito Pupae/Pharate Adults: Histological and Ultrastructural Aspects. *Journal of Medical Entomology*. vol. 42, no. 6, pp. 939–944.
- MORTIMER, T. J., 1965. The alimentary canals of some adult Lepidoptera and Trichoptera. *Transactions of the Entomological Society of London*. vol. 117, no. 3, pp. 67–93.
- MOSKALYK, L. A., M. M. OO and M. JACOBS-LORENA, 1996. Peritrophic matrix proteins of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect molecular biology*. vol. 5, no. 4, pp. 261–268.
- OLIVEIRA, M. F., J. C. D'AVILA, C. R. TORRES, P. L. OLIVEIRA, A. J. TEMPONE, F. D. RUMJANEK, C. M. BRAGA, J. R. SILVA, M. DANSA-PETRETSKI, M. A. OLIVEIRA, W. de SOUZA and S. T. FERREIRA, 2000a. Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. vol. 111, no. 1, pp. 217–21.
- OLIVEIRA, M. F., J. R. SILVA, M. DANSA-PETRETSKI, W. de SOUZA, C. M. S. BRAGA, H. MASUDA and P. L. OLIVEIRA, 2000b. Haemozoin formation in the midgut of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *FEBS Letters*. vol. 477, no. 1-2, pp. 95–8.

- PASCOA, V., P. L. OLIVEIRA, M. DANSA-PETRETSKI, J. R. SILVA, P. H. ALVARENGA, M. JACOBS-LORENA and F. J. LEMOS, 2002. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect biochemistry and molecular biology*. vol. 32, no. 5, pp. 517–23.
- PETERS, W., 1992. *Peritrophic Membranes*. 2nd ed. B.m.: Springer-Verlag. ISBN 3-540-53635-3.
- PETERS, W., S. HEITMANN and J. D'HAESE, 1979. Formation and Fine Structure of Peritrophic Membranes in the Earwig, *Forficula auricularia* (Dermaptera: Forficulidae). *Entomologia Generalis*. vol. 5, pp. 241–254.
- PIMENTA, P. F., G. B. MODI, S. T. PEREIRA, M. SHAHABUDDIN and D. L. SACKS, 1997. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*. vol. 115, pp. 359–69.
- RAMOS, A., A. MAHOWALD and M. JACOBS-LORENA, 1994. Peritrophic Matrix of the Black Fly *Simulium vittatum*: Formation, Structure, and Analysis of Its Protein Components. *The journal of experimental zoology*. vol. 268, pp. 269–281.
- RAYMS-KELLER, A., K. E. OLSON, M. MCGAW, C. ORAY, J. O. CARLSON and B. J. BEATY, 1998. Effect of heavy metals on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Ecotoxicology and environmental safety*. vol. 39, no. 1, pp. 41–7.
- REID, D. F. and M. J. LEHANE, 1984. Peritrophic membrane formation in three temperate simuliids, *Simulium ornatum*, *S. equinum*, and *S. lineatum*, with respect to the migration of onchocercal microfilariae. *Annals of tropical medicine and parasitology*. vol. 78, no. 5, pp. 527–539.
- RICHARDS, A.G. and P. A. RICHARDS, 1971. Origin and composition of the peritrophic membrane of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*. vol. 17, no. 11, pp. 2253–2275.
- RICHARDS, G. A. and P. A. RICHARDS, 1977. The peritrophic membranes of insects. *Annual review of entomology*. vol. 22, pp. 219–240.
- RICHARDSON, M. W. and W. S. ROMOSER, 1972. The formation of the peritrophic membrane in adult *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. vol. 9, no. 6, pp. 495–500.
- ROMOSER, W. S., 1974. Peritrophic membranes in the midgut of pupal and pre-blood meal adult mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*. vol. 11, no. 4, pp. 397–402.
- ROMOSER, W. S. and E. CODY, 1975. The formation and fate of the peritrophic membrane in adult *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. vol. 12, no. 3, pp. 371–378.
- ROMOSER, W. S., R. M. MOLL, A. C. MONCAYO and K. LERDTHUSNEE, 2000. The Occurrence and Fate of the Meconium and Meconial Peritrophic Membranes in Pupal and Adult Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. vol. 37, no. 6, pp. 893–896.
- SÁDLOVÁ, J., V. DVORAK, V. SEBLOVA, A. WARBURG, J. VOTYPKA and P. VOLF, 2013. *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to humans. *Parasites & Vectors*. 1., vol. 6, no. 1, p. 186.
- SÁDLOVÁ, J., J. REISHIG and P. VOLF, 1998. Prediuresis in female *Phlebotomus sandflies* (Diptera:Psychodidae). *European Journal of Entomology*. vol. 95, pp. 643–647.

- SÁDLOVÁ, J. and P. VOLF, 2009. Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. *Cell and tissue research*. vol. 337, no. 2, pp. 313–25.
- SECUNDINO, N. F. C., I. EGER-MANGRICII, E. M. BRAGA, M. M. SANTORO and P. F. P. PIMENTA, 2005. *Lutzomyia longipalpis* Peritrophic Matrix: Formation, Structure, and Chemical Composition. *Morphology, Systematics Evolution*. vol. 42, no. 6, pp. 928–938.
- SHAHABUDDIN, M., T. TOYOSHIMA, M. AIKAWA and D. C. KASLOW, 1993. Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. vol. 90, no. 9, pp. 4266–70.
- SHAO, L., M. DEVENPORT and M. JACOBS-LORENA, 2001. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 6., vol. 47, no. 2, pp. 119–25.
- SHEN, Z. and M. JACOBS-LORENA, 1998. A Type I Peritrophic Matrix Protein from the Malaria Vector *Anopheles gambiae* Binds to Chitin. *Journal of Biological Chemistry*. vol. 273, no. 28, pp. 17665–17670.
- SCHLEIN, Y., R. L. JACOBSON and J. SHLOMAI, 1991. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proceedings: Biological sciences*. vol. 245, no. 1313, pp. 121–6.
- SCHMIDT, N., 2009. Physiological impact of a *Bacillus thuringiensis* toxin on the black cutworm that enhances baculovirus pathogenicity.
- SCHMITT, T. H., W. A. FREZZATTI and S. SCHREIER, 1999. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. vol. 307, pp. 96–103.
- SILVA, C. P., A. F. RIBEIRO, S. GULBENKIAN and W. R. TERRA, 1995. Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. *Journal of Insect Physiology*. 12., vol. 41, no. 12, pp. 1093–1103.
- SINCLAIR, B. J., A. ADDO-BEDIAKO and S. L. CHOWN, 2003. Climactic variability and the evolution of insect freeze tolerance. *Biological Reviews*. vol. 78, pp. 181–195.
- SLU, Chaïka, 1978. Epithelial ultrastructure of the midgut of the horsefly, *Hybomitra schineri* (Tabanidae). *Parazitologija*. vol. 12, no. 2, pp. 183–1.
- SUDHA, P. M. and P. MUTHU, 1988. Damage to the midgut epithelium caused by food in the absence of peritrophic membrane. *Current Science*. vol. 57, pp. 624–625.
- SUWANMANEE, S., U. CHAISRI, L. WASINPIYAMONGKOL and N. LUPLERTLOP, 2009. Peritrophic membrane structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes after infection with dengue virus type 2 (D2-16681). *Applied Entomology and Zoology*. vol. 44, no. 2, pp. 257–265.
- TELLAM, R. L., 1996. The peritrophic matrix. *Biology of the Insect Midgut*. pp. 86–114.
- TELLAM, R. L. and C. EISEMANN, 2000. Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. *Insect biochemistry and molecular biology*. vol. 30, no. 12, pp. 1189–201.
- TELLAM, R. L., G. WIJFFELS and P. WILLADSEN, 1999. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. vol. 29, no. 2, pp. 87–101.

- TERRA, W. R., 1988. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. vol. 21, pp. 675–734.
- TERRA, W. R., 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 6., vol. 47, no. 2, pp. 47–61.
- TERRA, W.R., C. FERREIRA and A.G. DE BIANCHI, 1979. Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *Journal of Insect Physiology*. 1., vol. 25, no. 6, pp. 487–494.
- TERRA, W. R., 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Annual review of entomology*. vol. 35, pp. 181–200.
- TERRA, W. R., 1996. Evolution and function of insect peritrophic membrane. *Frontiers of Brazilian Research*. vol. 48, no. 5/6, pp. 317–324.
- TRISTRAM, J. N., 1977. Normal and cocoon-forming peritrophic membrane in larvae of the beetle *Gibbium psylloides*. *Journal of Insect Physiology*. 1., vol. 23, no. 1, pp. 79–87.
- VILLALBA, L. R. L., W. S. ROMOSER and L. PATRICAN, 2011. Meconial peritrophic matrix and meconial degradation in the biting midge, *Culicoides variipennis* (Coquillett) (Diptera: Ceratopogonidae). *Open Access Insect Physiology*. 2., vol. 1, no. 3, pp. 1–6.
- VILLALON, J.M., A. GHOSH and M. JACOBS-LORENA, 2003. The peritrophic matrix limits the rate of digestion in adult *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*. vol. 49, no. 10, pp. 891–895.
- WALTERS, L. L., K. P. IRONS, H. GUZMAN and R. B. TESH, 1993. Formation and Composition of the Peritrophic Membrane in the Sand Fly *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*. vol. 30, no. 1, pp. 179–198.
- WALTERS, L. L., K. P. IRONS, H. GUZMAN and R. B. TESH, 1995. Peritrophic envelopes of *Lutzomyia spinicrassa* (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*. vol. 32, no. 5, pp. 711–725.
- WARBURG, A., 2008. The structure of the female sand fly (*Phlebotomus papatasi*) alimentary canal. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. vol. 102, no. 2, pp. 161–166.
- WATERHOUSE, D. F., 1953. The occurrence and significance of the peritrophic membrane, with special reference to adult Lepidoptera and Diptera. *Australian Journal of Zoology*. vol. 1, pp. 299–318.
- WIGGLESWORTH, V. B., 1933. The function of the anal gills of the mosquito larva. *Journal of Experimental Biology*. vol. 10, pp. 16–26.
- WILLIAMS, J. C., H. H. HAGEDORN and K. W. BEYENBACH, 1983. Dynamic changes in flow rate and composition of urine during the post-bloodmeal diuresis in *Aedes aegypti*. *Journal of Comparative Physiology*. vol. 153, pp. 257–256.

11.2 Sekundární citace

BALBIANI E. G., 1983. Études anatomiques et histologiques sur le tube digestif des Cryptops. *Archives de Zoologie Expérimentale et générale*. vol. 8, pp. 1-82.

PETERS W., 1968. Vorkommen, Zusammensetzung und Feinstruktur peritrophischer Membranen im Tierreich. *Zeitschrift fuer Morphologie und Okologie der Tiere*. vol. 64, pp. 21-58.

VIERHAUS H., 1971. Über peritrophische Membranen und andere chitinhaltige Strukturen bei Anneliden, unter besonderer Berücksichtigung von *Lumbricus terrestris*. *L. Thesis, Univ. Düsseldorf*.

SAMSON K., 1909. Zur Anatomie und Biologie von *Ixodes ricinus* L. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*. vol. 93, pp. 185-236.