

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Martiny Hajmové

Interakce *Phlebotomus* – *Leishmania*

Posuzovaná práce se skládá z podrobného literárního úvodu (19 stran), tří publikací, podrobného souhrnu výsledků a závěrů, citované literatury a přílohy, kterou tvoří další publikace s tématem související.

Cíle disertační práce jsou velmi podrobně formulovány do tří hlavních bodů (odpovídajícím jednotlivým publikacím) dále rozvedených do dílčích cílů. Cíle sice spolu úzce souvisejí, ale každý se zabývá jiným aspektem interakce obou organismů a připadá mi logické diskutovat o každém z nich zvláště, včetně dotazů a připomínek.

Prvým cílem bylo zjistit náchylnost *P. halepensis* vůči dvěma druhům leishmanií (*L. major* a *L. tropica*) a infekce porovnat s infekcemi přirozených (i nepřirozených) přenašečů obou druhů. Šlo tedy v podstatě o zjištění, zda *P. halepensis* může být přenašečem těchto leishmanií, což se dá zjistit jen experimentem kvůli obtížné determinaci samic flebotomů. U druhu *L. major* se infekce *P. halepensis* podobala infekci přirozeného přenašeče (*P. duboscqui*) stejně jako infekci nepřirozeného přenašeče (*L. longipalpis*). Podobně tomu bylo i u infekcí druhem *L. tropica*, kdy se podrobně dokumentovaný průběh infekce lišil od infekce *P. sergenti* v momentě úniku leishmanií z peritrofického prostoru. Provedené experimenty prokázaly splnění dvou ze 4 kritérií, podle nichž lze určitý druh phlebotoma považovat za vektora příslušného druhu leishmanie: oba původci kožní leishmaniózy dokončili v phlebotomech vývoj a *P. halepensis* preferuje člověka před menšími hostiteli a sání na člověku jej neznevýhodňuje. Třetí obecně uznávané Killick-Kendrickovo kritérium zatím splněno není; experimentální přenos *L. major* na křečky sáním infikovaných *P. halepensis* se dosud nezdařil. Agens také dosud nebylo identifikováno ve flebotomech odchycených v terénu (čtvrté kritérium).

Otázky:

1. Publikace je z r. 2003 a předpokládám, že tým ve studiu tohoto tématu pokračuje. Byly získány další informace o možnosti přenosu kožní leishmaniózy druhem *P. halepensis*?
2. Může mít zjištěná drobná odlišnost v průběhu infekce *P. halepensis* a *P. sergenti* nějaký biologický význam?
3. Nelze samice podrodu *Adlerius* determinovat pomocí molekulárních technik (ITS2 rDNA sekvence), podobně jako rozlišují druhy podrodu *Paraphlebotomus*?

Druhým cílem bylo odhalení funkce metaloproteázy gp63 ve flebotomovi pomocí infekcí mutantní *L. amazonensis*. Experimenty prokázaly velmi přesvědčivě, že rané fáze infekce jsou expresí gp63 ovlivněny: mutanti se zablokovanou expresí měli infektivitu sniženou. V pozdní fázi infekce se rozdíly vyrovnaly. Pomocí reizolace leishmanií ze střev infikovaných samic bylo prokázáno, že exprese není zablokována reverzibilně a že pravděpodobnější hypotézou je nahrazení funkce gp63 jinými proteiny u mutantů. Rozdíly od výsledků jiných autorů, kteří nezpozorovali vliv gp63 ani v rané fázi infekce jsou vysvětlovány možným vlivem teploty, možností rozdílů mezi leishmaniemi i mezi flebotomy.

Otázka:

4. Které z těchto tří možných vysvětlení považuje Martina Hajmová za nejpravděpodobnější a proč? Jaké je teplotní optimum pro aktivitu uvedené metaloproteázy (vzhledem k prokázaným funkcím u infekce definitivního hostitele bych předpokládal vyšší teploty, ale je tomu opravdu tak?) ?

Třetím cílem bylo objasnění mechanismů regurgitační teorie pomocí sledování stavu stomodeální valvy flebotomů různých druhů v pozdějších stádiích infekce. Studium stomodeální valvy infikovaných flebotomů na úrovni elektronové mikroskopie přesvědčivě prokázalo oprávněnost dříve vyslovených hypotéz o usnadnění přenosu parazita poškozením SV s následkem zpětného toku obsahu střeva do potravní léze. Ve shodě s dřívějšími pracemi je toto poškození přičítáno působení chitinázy na chitinózní výstelku SV (Schleinova hypotéza). Podobnými experimenty na jiném modelu (*Culex* a *Trypanosoma*) bylo prokázáno, že tento mechanismus je obecný pro trypanosomatidy infikující nematocerní Diptera.

Otázka

5. V jedné z citovaných prací (Joshi et al 2005) je vyslovena domněnka o funkci chitinázy leishmanií i při infekci definitivního hostitele; je dokonce označena za novou determinantu virulence. Má Martina představu, jak by mohl tento enzym působit v lidském makrofágu? Působí v něm jinak, než svou enzymatickou aktivitou?

Přílohu práce tvoří publikace o ultrastruktuře střevní svaloviny *L. longipalpis* a *P. duboscqi* a jejím změnám v průběhu přijímání potravy. Základní stavba je pro představitele obou rodů stejná, ale rozdíly v detailech (reorganizace po strávení krve) jsou patrné.

Všechny publikace tvořící předloženou disertační práci jsou publikovány ve špičkových časopisech oboru a prošly náročným recenzním řízením. I český doprovodný text je psán logicky, přehledně, srozumitelně a pečlivě. Prohřešků proti češtině (např. opakované používání slova „kontrola“ v jeho anglickém významu na str. 11, shoda podmětu a přísudku: „amastigoti jsou nasávání“ str. 21) a drobných překlepů jsem našel minimum a nesnižují vysokou úroveň předložené práce.

Jak je z výše uvedeného patrné, vytčené cíle byly splněny. Martina Hajmová prokázala schopnost samostatně vědecky pracovat, formulovat problém, získat výsledky, kriticky je posoudit a zasadit do kontextu poznatků získaných jinými autory. Domnívám se, že na úrovni publikací i celé práce se projevuje kladně i vedení práce a součinnost celého týmu, věnujícího se problematice leishmaniózy.

Práci doporučuji k obhajobě a komisi doporučuji udělit Mgr. Martině Hajmové po obhájení práce titul PhD.

V Českých Budějovicích 8.3. 2006

RNDr. Oleg Ditrich, CSc