

5. Souhrn výsledků a závěry

5.1. Náchylnost *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* vůči různým druhům leishmanií

Podrod *Adlerius* (Diptera: Psychodidae) zahrnuje cca 20 známých druhů rozšířených ve Starém světě. Jejich taxonomie je velmi obtížná a je založena zpravidla na morfologických znacích přítomných u samců. Některé druhy jsou suspektními vektory viscerální leishmaniózy, nejméně u jednoho druhu, *P. arabicus*, byl potvrzen přenos kožní leishmaniózy působené druhem *L. tropica* (*P. arabicus* (Jacobson a kol., 2003)).

Výskyt druhu *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* se shoduje s výskytem jak kožní (*L. major*, *L. tropica*), tak i viscerální (*L. infantum*) leishmaniózy. Abychom posoudili vektorovou kompetenci druhu ke kožním leishmaniózám, provedli jsme experimentální infekce druhu leishmaniemi *L. major* a *L. tropica* a porovnali jsme je s infekcemi v jejich přirozených (*L. major* – *P. duboscqi*, *L. tropica* – *P. sergenti*) i nepřirozených vektorech (*Lu. longipalpis*).

Při infekcích flebotomů *P. halepensis*, *P. duboscqi* a *Lu. longipalpis* druhem *L. major* bylo třetí den po sání nakaženo více než 90% samic všech zkoumaných modelů. Převládaly silné až velmi silné infekce. Třetí den po sání parazité počali unikat přes peritrofickou matrix do ektoperitrofického prostoru – nejpomaleji u druhu *P. duboscqi*. U druhu *P. halepensis* v tu dobu převládaly dlouhé nektomonády lokalizované v ektoperitrofickém prostoru a přítomnost parazitů ve zbytku nestrávené krve uvnitř peritrofické matrix byla velmi sporadická. Šestý den po sání byly infekce opět u více než 90% samic druhů *P. halepensis* a *Lu. longipalpis*, u druhu *P. duboscqi* bylo nakaženo 75-80% samic.

Do šestého dne po sání byla strávena veškerá krev a nestrávené zbytky byly defekovány u všech druhů. Leishmanie migrovaly anteriorně směrem ke stomodeální valvě. Infekce u druhu *P. halepensis* byly silné až velmi silné, u druhů *P. duboscqi* a *Lu. longipalpis* byly signifikantně slabší. Do šestého dne po sání byla kolonizována stomodeální valva z 88% u druhu *P. halepensis*, ze 67% u druhu *P. duboscqi*, naproti tomu u druhu *L. longipalpis* pouze z 28%. Desátý den po sání převládaly u všech zkoumaných druhů silné infekce – parazité kolonizovali thorakální střevo a stomodeální valvu ve většině případů. Infekce v proboscis a pharynx byly pouze ojedinělé.

Při infekcích flebotomů *P. halepensis* a *P. sergenti* druhem *L. tropica* bylo po celou dobu sledování (od třetího po desátý den po sání) nakaženo mezi 70 a 85% samic obou druhů. Rozdíl byl patrný mezi pozorovanými vektory pouze v době, kdy leishmanie unikaly z peritrofického prostoru. Zatímco u druhu *P. halepensis* bylo třetí den po sání v endoperitrofickém prostoru pouze 47% leishmanií, u druhu *P. sergenti* jich zůstávalo 70%. Do šestého dne po sání byly všechny leishmanie v oblasti thorakálního střeva a do oblasti stomodeální valvy dosahovaly u druhu *P. halepensis* z 83% a u druhu *P. sergenti* ze 75%. Desátý den po sání převládaly u obou druhů masivní infekce stomodeální valvy, v některých případech infekce dosahovala až do pharynx a proboscis.

Studium experimentálních infekcí druhů *L. major* a *L. tropica* prokázalo, že *P. halepensis* je vysoce náchylný na oba uvedené kmeny leishmanií a že

vývoj těchto druhů leishmanií je zcela srovnatelný s jejich vývojem v přirozených vektorech.

Naše experimentální studie prokázala, že *P. halepensis* by mohl být vektorem kožní leishmaniózy. Podle Killick-Kendricka (1999) musí být splněna čtyři základní kritéria, aby mohl být určitý druh flebotoma považován za potvrzeného přenašeče určitého druhu leishmanie. První z nich je persistence parazitů při experimentální infekci, včetně přestání defekace (viz výsledky výše), druhou pak schopnost sání na člověku a zvířecím rezervoáru.

My jsme pozorovali, že samice druhu *P. halepensis* při sání preferovaly člověka před králíkem (81 vs. 21 samic), dále člověka před krysou (50 vs. 31), stejně pak králíka před krysou (61 vs. 18). To znamená, že samice vždy preferovaly jako zdroj krevní potravy většího živočicha. Výběr hostitele neměl žádný signifikantní vliv ani na mortalitu samic ani na jejich plodnost (počet nakladených vajec) ve srovnání s ostatními druhy flebotomů (Harre a kol., 2001).

Třetí kritérium pro úspěšné potvrzení vektora leishmaniózy je úspěšný a zdokumentovaný přenos leishmanií sáním na dalším hostiteli (Killick-Kendrick, 1999). V naší studii jsme se o tento přenos pokusili, celkem 137 samic všech tří druhů v pozdním stádiu infekce sálo na devíti křečcích. Ačkoli se u dvou křečků objevily v místech vpichu samic slabé edémy, veškeré kultivační pokusy zůstaly negativní. Experimentální přenos *L. major* druhem *P. halepensis* se tedy prozatím nezdařil.

Posledním (čtvrtým) kritériem pro potvrzení *P. halepensis* jako přenašeče *L. major* by byla izolace parazitů z flebotomů odchycených v terénu. Toto kritérium též do dnešního dne nebylo naplněno zejména kvůli determinačním obtížím při určování samic podrodu *Adlerius*.

5.2. Nové poznatky o roli metaloproteázy gp63 v přenašeci

Gp63 je hlavním povrchovým proteinem leishmanií, který je přítomen zejména v promastigotních stádiích leishmanií. V hostiteli zastává řadu funkcí, jeho funkce ve vektoru však zůstává neobjasněna. Byla vyslovena domněnka, že gp63 by se mohla účastnit při získávání živin z krevní potravy degradací hemoglobinu a dalších proteinů (Schlein, 1993). V naší studii jsme pro experimentální infekci druhu *Lu. longipalpis* použili tři linie *L. amazonensis* lišící se expresí metaloproteinázy gp63 na svém povrchu: kontrolní (s běžnou úrovní exprese), mutanty, kteří měli produkci gp63 zablokovanou a mutanty, kteří gp63 overexprimovali. Porovnávali jsme infekce těchto tří experimentálních skupin mezi sebou.

Linie *L. amazonensis* se významně lišily v raných fázích infekce, to jest druhý den po sání. Kontroly a overexprimující mutanti ukazovali vyšší infektivitu pro flebotomy (okolo 90%), převažoval výskyt středních a velmi silných infekcí (až 80%). Naopak mutanti se zablokovanou expresí gp63 měli infektivitu okolo 70%. Převažovaly střední a slabé infekce, velmi silných infekcí bylo dosaženo pouze ve 30% případů. Výsledky nasvědčují, že gp63 hraje určitou úlohu ve vývoji *L. amazonensis* a to zejména v rané fázi infekce.

Naproti tomu v pozdních fázích infekce (devátý den po sání) se jednotlivé linie od sebe významně neodlišovaly. Všechny se vyskytovaly

zhruba u 50% samic s maximálně převažujícími velmi silnými a středními infekcemi. Ve všech případech byla infekce lokalizována do oblasti stomodeální valvy a thorakálního střeva.

Stav infekce a její nesignifikantní rozdíly u zkoumaných skupin mutantů v pozdním stádiu je možné vysvětlit několika způsoby. Teoreticky by bylo možné, že produkce gp63 nebyla u této linie potlačena irreverzibilně a že v nepřítomnosti selekčního tlaku tunikamycinu se během vývoje ve flebotomech obnovila. Reizolace parazitů ze střev infikovaných samic do média obsahujícího tunikamycin však tento výklad vyloučila. Reizolace parazitů byla úspěšná jak druhý tak devátý den po infekci flebotomů. K odvržení plasmidu zodpovědného za regulaci produkce gp63 tedy během vývoje ve vektoru nedochází. Je však možné, že funkce gp63 byla u mutantů nahrazena expresí jiných proteinů (Chakrabarty a kol., 1996, McGwire a kol., 2002).

Experimenty s gp63 mutanty prováděli též Joshi a kol. (1998 a 2002) u *L. major*. Tito autoři nezaznamenali žádné rozdíly ve vývoji a síle infekce mezi skupinou s knockakutovanými geny pro gp63 a kontrolní skupinou produkující gp63 v běžné míře. Experimenty však byly prováděny při 28°C, narozdíl od našich experimentů, které byly prováděny při 23°C. Je známo, že vývoj leishmanií ve vektoru je ovlivňován teplotou okolního prostředí a vývoj infekcí *L. major* je rychlejší při teplotě 28°C než při teplotě 23°C (Leaney, 1977). Dále pak je samozřejmě možné, že gp63 může mít různou funkci ve zkoumaných druzích leishmanií (rozdíl mezi *L. major* a *L. mexicana*) a v jejich interakci s různými vektory (*P. papatasi* oproti *Lu. longipalpis*).

5.3. Mechanismus „regurgitační“ teorie - zjištění poškození či blokace stomodeální valvy flebotomů v pozdních stádiích infekce leishmaniemi

V nematocerních dvoukřídých je hlavní úlohou stomodeální valvy (SV) zajištění jednosměrného toku potravy během sání a zabránění regurgitace střevního obsahu. U flebotomů je úlohou SV navíc směřování potravy podle jejího charakteru buď do střeva nebo do volete (Tang a Ward, 1998). Bylo popsáno, že samice flebotomů infikované leishmaniemi mají problémy s opětovným sáním krve na hostiteli – sají opakovaně a krátce (review Molyneux a Jefferies, 1986). Leishmanie kolonizují přední část střeva, omezují příjem krve a zapříčiňují zpětný tok střevního obsahu společně s parazity do hostitelské tkáně (Killick-Kendrick a kol., 1977, Jefferies a kol., 1986, Molyneux a Jefferies, 1986). Navíc u plně rozvinutých infekcí jsou promastigoti v oblasti SV obklopeni viskózním gelem. Ten je vytvářen parazity (Stierhof a kol., 1999) a zřejmě se podílí na blokaci SV (Lawyer a kol., 1987, 1990; Walters a kol., 1987, 1989a,b; Killick-Kendrick a kol., 1988; Rogers a kol., 2002). Zároveň byly popsány degenerativní patologické změny stomodeální valvy (Schlein, a kol., 1992, Schlein 1993). V těchto studiích byly prezentovány různé stupně destrukce cylindrických buněk formujících valvu, separace individuálních buněk od tkáně a jejich zmenšení nebo ztráta jejich buněčné membrány. Narušení funkce SV opět způsobuje regurgitaci obsahu mesenteronu do potravní léze (Schlein a kol., 1992; Schlein, 1993). Tato zajímavá hypotéza o

narušení SV však nebyla přesvědčivě prokázána a nedostatečný materiál v publikacích Schleina a kol. (1992), Walterse a kol., (1987, 1989b) a Walterse (1993) byl předmětem sporů mezi zastánci a odpůrci této teorie.

Abychom potvrdili či vyvrátili Schleinovu hypotézu, pokusili jsme se o co nejdokonalejší zobrazení leishmanií v trávicím traktu flebotomů a o zdokumentování případných změn, ke kterým při infekcích dochází v oblasti stomodeální valvy. Nejprve jsme inkubovali střeva se SV infekčních samic flebotomů s FITC značenými protilátkami proti tubulinu (poskytnuty MBÚ AVČR, Praha Krč) pro zobrazení leishmanií. Pro značení struktur trávicího traktu jsme vyzkoušeli dva lektiny (WGA a PNA), protilátky proti kutikulární výstelce (prof. Pimenta, Centro de Pasquisas Rene Rachou, Belo Horizonte, Brazílie) a calcofluor (optický bělič, který se váže na celulózu a chitin). Pozorování byla prováděna na fluorescenčním mikroskopu Olympus BX51 a na konfokálním mikroskopu Olympus Fluoview. Výsledky nebyly uspokojivé, protože samotná inkubace střeva *in vitro* s uvedenými látkami patrně nebyla dostačující k jejich proniknutí do tkáně a neposkytla možnost pozorovat leishmanie uvnitř stomodeální valvy a střeva.

Poté byla využita technika kapilárového sání, kdy jsou samice flebotomů přinuceny sát přesně definovaný roztok (v tomto případě směsi protilátek uvedené výše) z tenké kapiláry, která je jim nasazena na ústní ústrojí. Ohrnutí spodního pysku přitom spouští samovolný sací reflex. Fluorescenčně značené protilátky se tak mohly dostat do trávicího traktu samic *in vivo*. Pozorování na konfokálním mikroskopu Olympus Fluoview však přesto nedala uspokojivou odpověď na otázku způsobu přichycení parazitů a opět nebylo možné pozorovat ani případná poškození stomodeální valvy.

Proto jsme přistoupili k přípravě vzorků pro elektronovou mikroskopii. Pomocí transmisní elektronové mikroskopie (1200 Jeol) jsme pořídili detailní fotodokumentaci zdravé stomodeální valvy. Apikální konce cylindrických buněk valvy jsou u zdravé stomodeální valvy pokryty tenkou elektrondensní chitinovou výstelkou a v oblasti vnitřní části valvy u jejího otevírání se do stomodea jsou patrné filamentární struktury. Tyto filamentární struktury dosud nebyly popsány v žádné studii ultrastruktury flebotomů, ačkoli podobné struktury jsou patrné i na mikrofotografiích prezentovaných Waltersem a kol., (1987, 1989b) a Waltersem (1993). Filamenty spojují buněčnou membránu a vnitřní vrstvu chitinu SV; jsou zřejmě kontraktilní a hrají úlohu při pohybech valvy. Ve Schleinových studiích (Schlein a kol., 1992) tyto filamenty nejsou patrné kvůli nevhodné orientaci ultratenkých řezů použitých pro fotodokumentaci. Tyto filamentární struktury jsou přítomny pouze v buňkách apikálního konce valvy, kde se valva uzavírá a kde cylindrické buňky kontrolují vstup do valvy a tím do střeva.

Pomocí transmisní a rastrovací elektronové mikroskopie jsme pozorovali též vyvinuté infekce leishmanií ve flebotomech (10-12 dní po sání). Parazitě zcela zaplňovali lumen anteriorní části střeva. Leishmanie byly přichyceny ke střevním mikrovillům a chitinózní výstelce stomodeální valvy nebo se volně pohybovaly v lumen střeva. Stomodeální valva byla otevřená a měla pozměněný tvar. Chitinózní výstelka valvy byla odtržená od apikálních konců buněk, filamentární struktury v apikálním konci SV byly degradované. Naproti tomu jádra a mitochondrie cylindrických buněk zůstaly nezměněné. Leishmanie se přichytávaly k chitinózní výstelce pomocí hemidesmozómů,

v některých případech byly u apikálních konců cylindrických buněk pozorovány zbytky degradovaného chitinu.

Schlein a kol. (1991, 1992) vyslovili hypotézu, že k degradaci chitinózní výstelky SV dochází zřejmě působením parazitické chitinázy. K potvrzení této domněnky jsme provedli infekce mutantními kmeny *L. amazonensis* overexprimujícími chitinázu. Infekce těmito mutanty ukázala větší poškození stomodeální valvy ve srovnání s kmeny produkujícími normální úroveň parazitické chitinázy (Rogers a kol., nepublikováno). Degradace chitinózní výstelky by mohla vystavovat tkáň ležící pod ní účinku dalších hydrolytických enzymů parazita, jako například metaloproteázy gp63.

Pro srovnání vlivu parazitů na stomodeální valvu jiných přenašečů jsme provedli infekce komárů trypanosomami. Trypanosomy způsobovaly zbytnění stomodeální valvy, které bylo pozorovatelné již během pitvání pod stereomikroskopem. Pomocí transmisní a rastrovací elektronové mikroskopie byly zobrazeny epimastigoti trypanosom v pozdních stádiích infekce – (12-14 dní po sání). Parazitě byli přichyceni ke stomodeální valvě, na rozdíl od leishmaniových infekcí nebyly pozorovány žádné trypanosomy lokalizované volně v lumen střeva. Destrukce kutikulární výstelky valvy a cylindrických buněk formujících valvu nebyla tak výrazná, jako u leishmaniového modelu, ale byla též patrná.

Naše studie ukázala, že různé trypanosomatidě kolonizují anteriorní část střeva nematocerních Dipter a blokují oblast SV svého vektora. Destrukce valvy nebo blokace její funkce a následná regurgitace parazitů do hostitele při sání krve je zřejmě všeobecnějším fenoménem vyskytujícím se u trypanosomatidů přenášených nematocerním dvoukřídłym hmyzem.