

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Miroslav Homola

**Srovnání peritrofické matrix u čtyř druhů flebotomů
(Diptera: Psychodidae) a její role ve vývoji leishmanií
(Kinetoplastida: Trypanosomatidae).**

A comparison of the peritrophic matrix in four sand flies species
(Diptera: Psychodidae) and its role in the *Leishmania* development
(Kinetoplastida: Trypanosomatidae).

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Jovana Sádlová, Ph.D.

Praha 2017

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 25. dubna 2017

.....

Poděkování

Chtěl bych poděkovat zejména mé školitelce Jovaně Sádlové, která mi po celou dobu mého působení v naší laboratoři byla skvělou a ochotnou vedoucí, i v těžkých chvílích nikdy neztratila nadšení, dobrou náladu a důvěru ve mě a pomohla mi stát se mladým začínajícím vědeckým pracovníkem. Dále bych chtěl poděkovat Mírovi Hylišovi a Ondrovi Šebestovi za pomoc s mikroskopickou částí této práce a Jozefu Jandovi s metodou FACS. Děkuji také vedoucímu naší laboratoře prof. Petru Volfovi za cenné rady a náměty k průběžným výsledkům této práce, kolegům Jitce Myškové, Táně Spitzové a Heleně Krutákové za pomoc při některých experimentech a vyhodnocování výsledků, a i ostatním kolegům za příjemnou atmosféru vytvořenou v naší laboratoři.

Závěrem bych chtěl poděkovat všem členům své rodiny za bezmeznou podporu, pochopení a zázemí, které mi vytvořili během celého mého vysokoškolského studia a bez kterých by tato práce také nemohla vzniknout.

Abstrakt český

Flebotomové (Diptera: Psychodidae) jsou jedinými prokázanými přenašeči leishmanií (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) působících v obratlovčím hostiteli onemocnění leishmaniózu. Stejně jako ostatní dospělci řádu Nematocera, produkují flebotomové peritrofickou matrix (PM) typu 1 jako odpověď na příjem potravy (nasátí krve). PM je acelulární obal jehož základní složkou je chitin s navázanými proteiny. Ve střevě hmyzu plní PM zásadní úlohu v ochraně střevního epitelu před poškozením a patogeny, zlepšuje funkce trávení a u krevsajících druhů je zapojena do detoxikace hemu.

Samice flebotomů nasají leishmanie spolu se sátou krví a ty pak prodělávají ve flebotomovi složitý morfologický vývoj zakončený kolonizací stomodeální valvy. Jednou z hlavních bariér, které přitom překonávají, je právě PM. Tématem této práce je role PM ve vektorové kompetenci druhu *Sergentomyia schwetzi*. Morfologie a kinetika tvorby a rozpadu PM u *S. schwetzi* je porovnána se třemi druhy flebotomů lišícími se vektorovou kompetencí pro *L. donovani*. Význam PM pro vývoj leishmanií v *S. schwetzi* je následně experimentálně potvrzen jejím porušením pomocí exogenní chitinázy z *Beauveria bassiana*. Zatímco v běžných podmínkách leishmanie nedokážou unikat z PM a jsou vydefekovány, při porušení PM exogenní chitinázou dokáží *L. donovani* a *L. major* v *S. schwetzi* vyvinout zralé infekce včetně kolonizace stomodeální valvy a tvorby metacyklických stádií.

Klíčová slova: peritrofická matrix, chitináza, flebotomus, leishmanie

Abstrakt anglický

Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) are the only proven vectors of *Leishmania* parasites (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). In Nematoceran Diptera, including sand flies, adults produce a type 1 peritrophic matrix (PM) which is secreted in response to the distension of the midgut caused by blood meal. The PM is an acellular envelope composed of chitin fibres and proteins, which protects the midgut epithelium against abrasion and pathogens and improves digestion. In hematophagous insects, the PM also plays a central role in heme detoxification.

Female sand flies acquire *Leishmania* with a bloodmeal and the parasites undergo complicated development in their gut finished by the colonization of the stomodeal valve. The PM is one of the most important barriers in *Leishmania* development and its role in the vector competence of the *S. schwetzi* is the main topic of this master thesis. The PM's kinetic and morphology in the *S. schwetzi* is compared with other three sand fly species which differ in susceptibility to *L. donovani*. The key role of the PM in *S. schwetzi* vector competence is finally proved by disrupting the PM using the exogenous chitinase from *Beauveria bassiana*. Under these artificial conditions, the *Leishmania* parasites (*L. donovani* and *L. major*) are able to exit the PM, colonize the stomodeal valve and even evolve into metacyclic promastigote infective stages in the gut of *S. schwetzi*.

Key words: peritrophic matrix, chitinase, sand flies, leishmania

Obsah

| | | |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | ÚVOD a CÍLE PRÁCE | 1 |
| 1.1 | Cíle práce | 3 |
| 2 | LITERÁRNÍ PŘEHLED | 4 |
| 2.1 | Morfologie trávicího traktu flebotoma | 4 |
| 2.2 | Struktura, morfologie a kinetika PM | 6 |
| 2.3 | Funkce peritrofické matrix | 8 |
| 2.4 | Proces trávení a role PM v něm | 9 |
| 2.5 | Proteiny peritrofické matrix | 10 |
| 2.6 | Vývoj leishmanií ve flebotomech | 11 |
| 2.7 | Překážky ve vývoji leishmanií ve flebotomech..... | 14 |
| 2.8 | Role <i>S. schwetzi</i> v přenosu leishmanií..... | 20 |
| 3 | METODIKA..... | 22 |
| 3.1 | Chov kolonií flebotomů | 22 |
| 3.2 | Použité druhy leishmanií a jejich kultivace | 22 |
| 3.3 | Sledování kinetiky a morfologie peritrofické matrix pomocí světelné mikroskopie..... | 23 |
| 3.4 | Příprava preparátů na histologii..... | 23 |
| 3.5 | Příprava preparátů na transmisní el. mikroskopii..... | 25 |
| 3.6 | Měření tloušťky peritrofické matrix | 27 |
| 3.7 | Testování vlivu komerčních chitináz na přežití leishmanií <i>in vitro</i> | 27 |
| 3.8 | Testování vlivu komerčních chitináz na přežití jiných provoků <i>in vitro</i> | 27 |
| 3.9 | Výběr nevhodnější houby pro produkci chitinázy a měření chitinázové aktivity..... | 28 |
| 3.10 | Produkce chitinázy houbou <i>Beauveria bassiana</i> | 29 |
| 3.11 | Testování vlivu jednotlivých chitináz na přežití leishmanií <i>in vitro</i> s využitím metody FACS | 29 |
| 3.12 | Experimentální rozrušení peritrofické matrix u <i>S. schwetzi</i> | 31 |
| 3.13 | Experimentální infekce flebotoma <i>S. schwetzi</i> s využitím chitináz | 31 |
| 3.14 | Zjištění přítomnosti O-glykosylovaných proteinů ve střevě čtyř druhů flebotomů | 34 |
| 3.15 | Statistická analýza | 35 |
| 4 | PROTOKOLY CHEMIKÁLIÍ | 36 |

| | | |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5 | VÝSLEDKY | 43 |
| 5.1 | Srovnání vlastností peritrofické matrix čtyř druhů flebotomů s odlišnou vektorovou kompetencí pro <i>L. donovani</i> | 43 |
| 5.2 | Vliv chitináz na přežití leishmanií <i>in vitro</i> | 52 |
| 5.3 | Experimentální rozrušení peritrofické matrix <i>S. schwetzi</i> | 57 |
| 5.4 | Vliv experimentálního rozrušení PM na vývoj leishmaniových infekcí v <i>S. schwetzi</i> | 61 |
| 5.5 | Zjištění přítomnosti O-glykosylovaných proteinů ve střevě čtyř druhů flebotomů | 70 |
| 6 | DISKUZE | 71 |
| 7 | ZÁVĚR | 76 |
| 7.1 | Shrnutí výsledků: | 76 |
| 7.2 | Závěr: | 77 |
| 8 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 78 |

Seznam zkratek

| | |
|------------------------------------|---------------------------------------------|
| AMG – anteriorní mesenteron | AP – anteriorní plug |
| BSA – bovinní sérový albumin | DAPI – modré fluorescenční barvivo |
| EC – epitelální buňka | E.Sp. – vnitřní prostor peritrofické matrix |
| GalNAc – N-acetylgalaktosamin | GFP – zelený fluorescenční protein |
| GPI – glykofosfatidilinositol | HPA – <i>Helix pomatia</i> aglutinin |
| Ch = Chit. – chitináza | ICP – inhibitory cysteinových proteáz |
| INF – infekce | ISP – inhibitory serinových proteáz |
| KB = BB – krevní bolus | KONT – kontrola |
| LPG – lipofosfoglykan | MV – mikrovily |
| PBS – fosfátový pufr | PM – peritrofická matrix |
| PSG – „promastigote secretory gel“ | PT – posteriorní tail |
| RBC – červené krvinky | SDS – dodecylsírán sodný |
| SV – stomodeální valva | TEM – transmisní elektronová mikroskopie |
| TMG – thorakální mesenteron | TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| Va – vajíčka | |

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Leishmanióza je parazitární onemocnění způsobené prvky rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). V obratlovčím hostiteli (včetně člověka) leishmanie napadají fagocytující buňky (především makrofágy), ve kterých přežívají a mohou se dále šířit po těle. Klinické projevy onemocnění se liší podle druhu leishmanie i imunitní odpovědi hostitele. Nejméně závažné jsou kutánní (kožní) formy, závažné jsou mukokutánní (kožně-slizniční) a zejména viscerální (útrobní) leishmaniózy, které jsou v neléčených případech často smrtelné. Ze všech popsaných druhů a poddruhů leishmanií je jich přibližně 20 patogenních pro člověka (Maroli et al. 2012). Dle WHO se každý rok objeví přibližně 0,9 – 1,3 milionů nových případů všech forem leishmanióz (z toho 300 tisíc viscerálních forem). Kutánní a mukokutánní forma leishmaniózy se vyskytuje především ve státech Afgánistán, Saudská Arábie, Brazílie, Bolívie, Irán, Peru, a Sýrie, zatímco viscerální forma nejčastěji ve státech Bangladéš, Brazílie, Indie, Nepál a Súdán. Každý rok podlehne viscerální formě 20 až 30 tisíc pacientů (WHO 2014).

Leishmanióza se spolu s dalšími chorobami (např. spavou nemocí) řadí mezi tzv. opomíjené nemoci – „neglected diseases.“ Protektivní očkování lidí zatím neexistuje a léčba závažných forem leishmanióz je problematická a dlouhodobá. V současnosti se léčí viscerální leishmaniózy systémovými antimykotiky (Amfotericin-B), dále jsou v terapii využívány preparáty antimonu (Sb^V), Miltefosin aj. Byla však již zaznamenána resistance jak na preparáty antimonu, tak na Miltefosin a i jiná léčiva (shrnutí např. v (Croft et al. 2006, Maltezou 2009, Dorlo et al. 2012).

Přenos leishmanióz je zprostředkován flebotomy (Diptera: Psychodidae). Z více než 800 popsaných druhů flebotomů (rody *Phlebotomus*, *Lutzomyia* a *Sergentomyia*) je pouze 98 z nich potvrzenými či z přenosu podezřelými přenašeči leishmanií (Maroli et al. 2012). V samicích flebotomů leishmanie nasáté spolu s krví hostitele prodělávají složitý morfologický a funkční vývoj (shrnutí např. (Kamhawi 2006, Bates 2007)). Schopnost vyvíjet se v přenašeči je přitom do značné míry druhově specifická – určité druhy leishmanií se dokážou vyvíjet jen v určitých druzích flebotomů. O této vektorové kompetenci rozhodují především faktory působící v časně fázi infekce, a to zejména odolnost parazitů vůči střevním proteázám flebotoma, jejich schopnost opustit peritrofickou matrix a přichytit se k epitelu mesenteronu (Dostálová & Volf 2012). Nekompetentní druhy leishmanií jsou vydefekovány spolu s nestrávenými zbytky potravy.

Peritrofická matrix (PM) je nebuněčný obal tvořený především chitinem, glykoproteiny a proteoglykany, který se tvoří v mesenteronu okolo nasáté krve. Mezi hlavní funkce PM ve střevě hmyzu patří mechanická ochrana epitelu střeva před drsnými nebo ostrými složkami potravy a zlepšení trávení díky vzniku trávicích proudů a kompartmentalizaci střeva na endoperitrofický prostor a ektroperitrofický prostor (Terra 1990, 2001). U krevsajících zástupců hraje PM klíčovou roli také v detoxikaci hemu uvolňovaného z nasáté krve (Pascoa et al. 2002). Jednou z nejdůležitějších a nejspíše i evolučně fixovanou úlohou PM je však ochrana před nejrůznějšími patogeny (Lehane 1997). Paraziti si vyvinuli rozdílné způsoby k jejímu překonání, ale v případě leishmanií je otázka role PM při jejich vývoji ve flebotomech stále otevřená.

Hlavním cílem této diplomové práce je ověřit roli PM při vývoji leishmanií ve flebotomech druhu *Sergentomyia schwetzi*. Výsledky publikované členy naší laboratoře naznačily, že u tohoto druhu je právě PM ta bariéra, která znemožňuje vývoj *L. donovani* a dalších druhů leishmanií (Sádlová et al. 2013). Ve své diplomové práci budu srovnávat *S. schwetzi* s dalšími třemi druhy flebotomů s odlišnou vektorovou kompetencí pro *L. donovani*: konkrétně se dvěma druhy přirozených přenašečů *L. donovani* (*P. orientalis* a *P. argentipes*) (Elnaiem 2011, Maroli et al. 2012) a druhem *P. papatasi*, který vývoj *L. donovani* nepodporuje (Schlein & Jacobson 1998).

V první části diplomové práce budu u těchto čtyř druhů flebotomů srovnávat morfologii a kinetiku tvorby a rozpadu PM, a to za pomoci světelné mikroskopie na nativních a histologických preparátech a také za pomoci elektronové mikroskopie. V druhé části diplomové práce chci pak experimentálně potvrdit roli PM ve vektorové kompetenci druhu *S. schwetzi* rozrušením PM pomocí přidání exogenní chitinázy a srovnáním vývoje leishmanií u této a kontrolní skupiny flebotomů.

1.1 Cíle práce

Tato magisterská práce navazuje na hypotézu postulovanou autory Sádlová et al. (2013), kteří považují za klíčový důvod rezistence *S. schwetzi* k lidským leishmaniím velmi krátkou dobu mezi rozrušením PM a defekací zbytků potravy. Cílem této práce je tuto teorii ověřit a rozvinout ji, a to konkrétně:

1) Zjistit, zda je pozdní degradace PM u druhu *S. schwetzi* dána jejími specifickými vlastnostmi a liší se od PM přirozených přenašečů. Proto bude *S. schwetzi* srovnávána s třemi dalšími druhy flebotomů s odlišnou vektorovou kompetencí. *Phlebotomus argentipes* a *P. orientalis* jsou přirození přenašeči *L. donovani*, druh *P. papatasi* je k *L. donovani* rezistentní. Srovnány budou následující parametry:

- kinetika tvorby a rozpadu PM
- hrubá morfologie, ultrastruktura a tloušťka PM

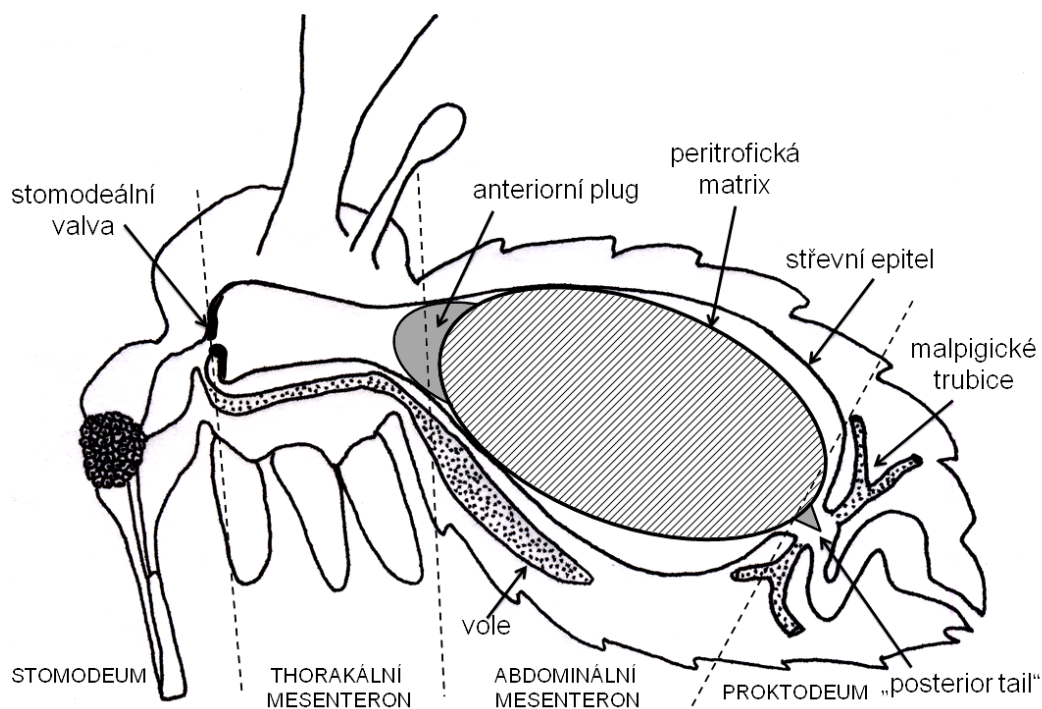
2) Experimentálně narušit integritu PM pomocí exogenní chitinázy a zjistit, zda za těchto podmínek jsou lidské leishmanie schopny dokončit v *S. schwetzi* svůj vývoj. Tato část práce bude probíhat v následujících krocích:

- výběr vhodného zdroje chitinázy – test vlivu chitinázy na přežití leishmanií *in vitro*
- test vlivu exogenní chitinázy na PM druhu *S. schwetzi in vivo*
- test vlivu exogenní chitinázy na vývoj leishmanií v *S. schwetzi*

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Morfologie trávicího traktu flebotoma

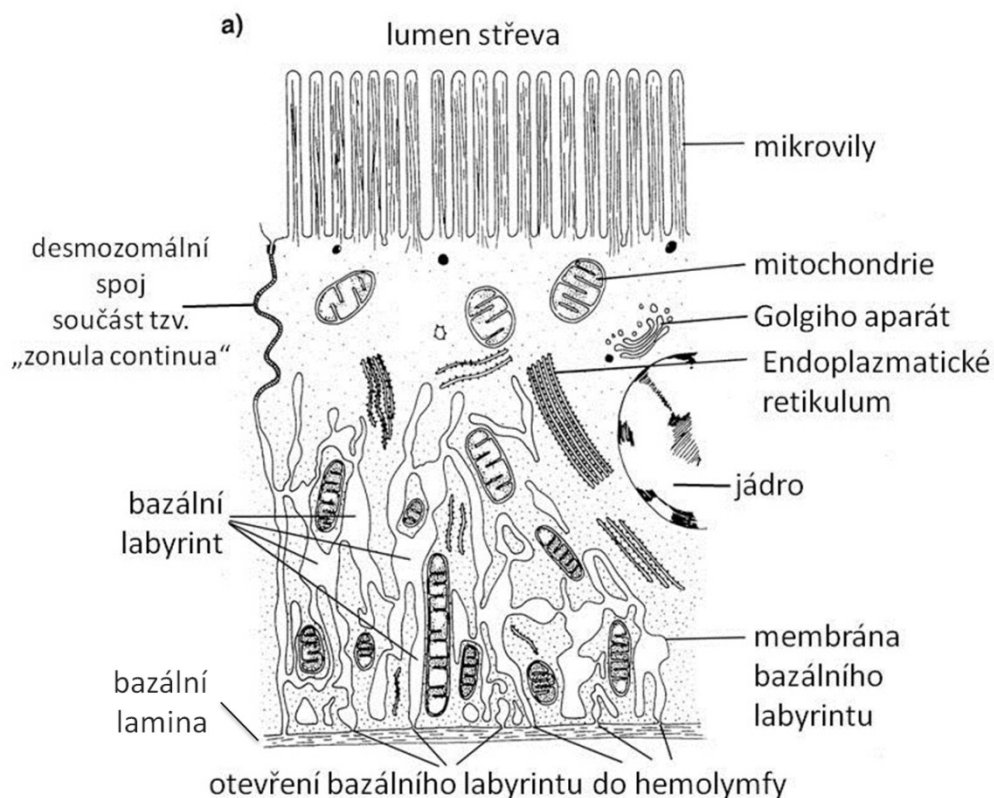
Střevo hmyzu je rozděleno do třech částí. Přední střevo (stomodeum), střední střevo (mesenteron) a zadní střevo (proktodeum), přičemž velká většina trávicích procesů se odehrává v mesenteronu (viz obr. 1). Stomodeum i proktodeum jsou vytvořeny z ektodermu, zatímco mesenteron je původu endodermálního. Vole je jediná struktura ze stomodea, která je zapojena do procesu trávení potravy a slouží především k jejímu shromažďování (Terra 1990). Peritrofická matrix (PM) rozděluje mesenteron na ektoperitrofický prostor (mezi PM a střevním epitelem) a endoperitrofický prostor (uvnitř PM) (Terra 2001).



Obr. 1 – Trávicí soustava flebotoma. Šrafovane vyznačená nasátá krev (krevní bolus).
Dle Sádlová (nepublikováno).

Mesenteron komárů i flebotomů je rozdělen do třech částí. Rozhraní stomodea a mesenteronu tvoří stomodeální valva, která se skládá z obou těchto epitelů, je tedy na povrchu kryta vrstvou chitinu. Další částí je trubicovitý anteriorní (thorakální) mesenteron, po kterém následuje posteriorní (abdominální) mesenteron, který je schopen velkého rozšíření po nasátí krve (Richardson & Romoser 1972). Epitel mesenteronu je složen z jedné vrstvy trávicích buněk sedících na bazální lamině (viz obr. 2). Tyto buňky mají povrch na straně obrácené do lumen střeva zvětšený pomocí četných výběžků - mikrovilů a jejich cytoplazma obsahuje velký počet mitochondrií, ribozomů a drsného ER. Na apikálním konci jsou

epiteliální buňky navzájem spojeny kontinuálním mezibuněčným spojem tzv. „zonula continua“ (Terra 1988). Velmi podobnou morfologii má trávicí epitel komárů (Freyvogel & Staubli 1965, Richardson & Romoser 1972).



Obr. 2 – Morfologie typické epiteliální buňky ve fyziologickém stavu. Dle (Chapman 1998) upraveno.

Po nasátí krve dochází u buněk střevního epitelu k morfologickým změnám. Roztažením abdominálního mesenteronu se buňky epitelu zploští a získají dlaždicový tvar, čímž se zploští i jádro. Buňky epitelu se poté v závislosti na rychlosti trávení navrátí do svého původního sloupcovitého tvaru, např. u *Phlebotomus duboscqi* se tak děje po 72 hod (Sádlová & Volf 2009). Stejně změny tvaru buněk střevního epitelu po nasátí krve byly pozorovány např. u *Aedes triseriatus* (Richardson & Romoser 1972) a jiných druhů komárů (Freyvogel & Staubli 1965).

2.2 Struktura, morfologie a kinetika PM

Peritrofická matrix je acelulární struktura tvořená chitinovými fibrilami a na ně navázanými glykoproteiny a proteoglykany. Chitinový základ dodává peritrofické matrix pružnost a pevnost, zatímco na něj navázané proteiny (peritrofiny) a jejich glykosylace určují velikost a selektivitu pórů, které se v PM nacházejí, a taktéž v ní zadržují vodu (Peters 1992, Lehane 1997). V evoluci se PM zřejmě vyvinula z gastrointestinálního mukusu (který chrání epitel střeva u savců i hmyzu) a peritrofiny (proteiny navázané na PM) vznikly nejpravděpodobněji z mucinů získáním chitin-vázající domény (Lehane 1997).

Chitinové fibrily jsou syntetizovány chitin syntázou (CHS) spojením GlcNAc (N-Acetyl-D-glucosamine) podjednotek do dlouhého řetězce. Hmyz má k dispozici dvě chitin syntázy. První z nich (CHS1) je zodpovědná za tvorbu kutikulárního chitinu a druhá (CHS2) je zapojena pouze do tvorby PM (Arakane et al. 2004). Chitinové mikrofibrily se tvoří u báze mikrovilů buněk střevního epitelu a mohou být uspořádány třemi základními způsoby (náhodně, čtverečně a hexagonálně), nebo kombinacemi těchto základních uspořádání (Peters 1992). Z celkové váhy PM tvoří chitin jen 5 % (měřeno u bzučivky), přesto se jedná o její esenciální složku (Tellam & Eisemann 2000).

Flebotomové a komáři tvoří PM typu 1 Na tvorbě tohoto typu PM se podílí celý mesenteron a v přirozených podmínkách se tvoří jen po příjmu potravy (nasátí krve) (Richards & Richards 1977). Tvorba PM typu 1 je podmíněna roztažením epitelu mesenteronu. U komárů se tedy vytvoří i po vstříknutí fyziologického roztoku či vzduchu do trávicího traktu komára přes anální otvor. Takto nepřírodně vzniklá PM se však značně liší od té, která se tvoří po nasátí krve, a to absencí na ní navázaných proteinů a menší tloušťkou (Freyvogel & Jaquet 1965). Na tvorbu PM nemá velký vliv druh přijaté krve (např. savčí x ptačí). Její tvorbu neovlivňuje ani krev s přídavkem heparinu, ani defibrinovaná krev či jen příjem krevního séra (Freyvogel & Staubli 1965). Při tvorbě PM typu 1 není celý mesenteron synchronizován, ale pouze malé oblasti mesenteronu pracují synchronně a tvoří malou celistvou část budoucí PM. Celá PM se pak skládá z těchto jednotlivých částí, které nasedají jedna na druhou a vytvoří kompaktní obal (Peters 1992).

Na přední části plně vytvořené PM typu 1 u některých druhů flebotomů a komárů můžeme pozorovat morfologickou strukturu zvanou anteriorní plug (AP) (viz obr. 1). Anteriorní plug je syntetizován buňkami thorakálního mesenteronu a poté je peristaltickými pohyby natlačen na hlavní část PM syntetizovanou v abdominálním mesenteronu (Freyvogel & Staubli 1965). Plní zřejmě funkci důležité bariéry, která odděluje thorakální a abdominální část mesenteronu. Díky tomu nedochází k ovlivnění trávení krve v abdominálním mesenteronu inhibitory proteáz, které jsou obsažené v nektaru – cukerná potrava je trávena

pouze v thorakálním mesenteronu (Richardson & Romoser 1972). Anteriorní plug tvoří bariéru nejen pro postup sacharidové potravy do abdominálního mesenteronu, ale nejspíše i pro leishmanie, které putují obráceným směrem na stomodeální valvu (Sádlová & Volf 2009).

Další morfologickou strukturou viditelnou na plně vytvořené PM typu 1 je tzv. posteriorní tail (PT) (viz obr. 1). Tato struktura může být buď otevřená, či uzavřená. U flebotoma *P. duboscqi* je tento konec válcovitý a na konci uzavřený, proto z něj nemohou unikat erythrocyty volně do střeva (Sádlová & 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 prstenec (Walters et al. 1993). U flebotoma *Lutzomyia 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).

Anteriorní plug, podobně jako posteriorní tail, nejsou v přímém styku s trávenou krví, a proto nejsou temně zbarveny díky inkrustaci hemem, vznikajícím při trávení krve (viz kap. 2.3), jako zbytek PM (Sádlová & Volf 2009). Obdobné zbarvení PM bylo pozorováno i u komárů (Freyvogel & Staubli 1965).

U flebotomů je po strávení krve PM degradována jejich vlastními chitinázami, které rozštěpují chitinové mikrofibrily a dojde k jejímu rozpadu. Aktivita těchto enzymů vrcholí před defekací flebotoma a to u *L. longipalpis* i *P. papatasi* přibližně v čase 48 hod po sání. Žádná chitinázová aktivita nebyla detekována v nenasátých samicích (Ramalho-Ortigao & Traub-Cseko 2003, Ramalho-Ortigao et al. 2005). Chitinázy se však neúčastní jen degradace, ale i tvorby PM, při níž plní dva zásadní úkoly. Kontrolují tloušťku PM (rovnováha mezi její tvorbou a degradací) a určují její porozitu (Shen & Jacobs-lorena 1997). Při přidání allosamidinu (inhibitor chitináz) do sítě krve je výsledná PM tlustější a mnohem méně organizovaná. Allosamidin také ovlivňuje defekaci PM. Ta v případě jeho podání zůstává ve střevě komára až 8 dní, oproti 4 dnům u kontrolní skupiny (Shahabuddin et al. 1993).

Jednotlivé druhy flebotomů se velice liší v rychlosti tvorby PM a tato rychlost je druhově specifická. Flebotomy můžeme rozdělit dle rychlosti tvorby PM do dvou skupin. Pomalou rychlost tvorby PM mají např.: *P. longipes*, *P. perniciosus* a *L. longipalpis*, u kterých se první náznaky tvorby PM 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 od nasátí (Sádlová & Volf 2009).

2.3 Funkce peritrofické matrix

V trávicím traktu hmyzu je stomodeum a proktodeum ektodermálního původu, a proto je potaženo vrstvou kutikuly, která chrání epitel a je nepropustná pro vodu a plyny. Protože mesenteron tuto výstelku postrádá, ochrannou funkci zde zpravidla plní PM (Terra 1988).

Nezákladnější funkcí PM ve střevě hmyzu je ochrana střevního epitelu před mechanickým poškozením (Sudha & Muthu 1988). Tato struktura je však také zapojena do trávicího procesu (viz kap. 2.4) (Terra 1990) a plní klíčovou roli při obraně před patogeny (Lehane 1997). U krevsajícího hmyzu je navíc zapojena i do detoxikace hemu (Pascoa et al. 2002).

Během procesu trávení krve vzniká rozpadem erytrocytů a v nich obsaženého hemoglobinu ve střevě volný hem, který je velmi reaktivní a poškozuje okolní tkáň. Je proto inkorporován do PM a ta díky tomu postupně tmavne. Maximum navázaného hemu se objevuje okolo 48 hod po nasátí (*Aedes aegypti*) (Pascoa et al. 2002). Autor dodává, že komáři (a flebotomové) nepřeměňují hem na hemozoin (jiná forma detoxikace hemu), protože pH ve střevě komára je mírně zásadité a tudíž nevhodné k této reakci. Tmavnutí (inkrustace hemem) u druhu *P. duboscqi* postupuje od anteriorního i posteriorního konce PM směrem ke středu, kde zůstává světlý pruh, i ten je ale později zabarven (Sádlová & Volf 2009). Jedním z proteinů, které se podílejí na navázání hemu, je AeIMUC1. Jedná se o integrální protein PM, který je v ní připevněn svými chitin-vázajícími doménami. Hem váže pomocí svých šesti domén s cystein-prolin opakujícími se aminokyselinami. Tento protein se podílí zřejmě i na detoxikaci jiných sloučenin obsahujících kov (Devenport et al. 2006).

Klíčovou rolí PM v trávicím traktu hmyzu je však nejpravděpodobněji 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) pozorováním na motýlech dokazuje, že přítomnost či absence PM (alespoň v rámci řádu Lepidoptera) je dána možnou bakteriální kontaminací potravy. Motýli, kteří se přiživují např. na hnilém ovoci, savčí moči, výkalech či mršinách tvoří PM vždy (a to nejčastěji typ 2) (Lehane 1997).

2.4 Proces trávení a role PM v něm

U hmyzu s PM typu 2 dochází ke vzniku trávicích proudů uvnitř PM (endoperitrofický prostor) a okolo PM (ektoperitrofický prostor). 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 obr. 2), přes kterou se díky většímu povrchu může dostat více vody. Buňky v přední části střeva, které jsou zodpovědné za její resorpci, mají naopak mnohem delší mikrovily a méně invaginovanou bazální membránu (Terra 1988).

Samotné trávení potravy je rozděleno do několika fází. V první, tzv. iniciační fázi trávení, dojde ke zmenšení molekulové hmotnosti trávené potravy, která poté díky tomu může projít přes póry PM do ektoperitrofického prostoru. V tomto prostoru dochází ke druhé fázi trávení, kdy jsou živiny rozštěpány na dimery a malé oligomery, které jsou poté vstřebány buňkami epitelu, ve kterých dochází ke třetí, finální části trávení (Terra et al. 1979). Po strávení veškeré potravy jsou nestrávené zbytky společně s PM (či jejími rezidui) vyloučeny ve formě exkrementu.

Trávení krve se však u hematofágního nematocerního hmyzu liší od trávení cukerné potravy. Cukerná potrava je nejprve uschována ve voleti a potom postupně čerpána do mesenteronu. Naopak krev je nasáta rovnou do mesenteronu (Terra 2001). Vole je vystláno kutikulou a je tudíž pro vodu neprostupné. Nasátou krev je však nutné zbavit přebytečné vody v mesenteronu (Terra 1988). Velká část přebytečné vody je také u komárů (Williams et al. 1983) a flebotomů (Sádllová et al. 1998) vylučována análním otvorem v podobě kapek již během sání na hostiteli (tzv. prediureze). V případě nasátí cukerné potravy až po sání krve, v době kdy je již přítomna PM, je prostorové oddělení trávení posíleno ještě díky anteriornímu plugu na PM, který tvoří bariéru mezi thorakálním a abdominálním mesenteronem (Richardson & Romoser 1972). Toto prostorové oddělení je kromě výše zmíněných důvodů důležité i proto, že 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).

Ve střevě nenasátého flebotoma se trávicí enzymy udržují jen na minimální úrovni sekrece, která se po nasátí krve zvyšuje s píky aktivity typickými pro jednotlivé druhy flebotomů. Jedná se především o serinové proteázy typu trypsinu a chymotrypsinu. Uvnitř střeva je udržováno mírně zásadité pH v rozmezích 8 – 9 (Dillon & Lane 1993a). Trávicí

enzymy se tvoří u komárů a flebotomů jen jako odpověď na nasátou krev, ne na roztažení mesenteronu jako v případě tvorby PM. Pokud je komárům podána pouze latexová suspenze (Billingsley & Rudin 1992) či flebotomům pufr TRIS (Dillon & Lane 1993a), nedojde ke zvýšení bazální úrovně tvorby trávicích enzymů. Syntéza trávicích enzymů není u komárů (Billingsley & Rudin 1992) ani flebotomů (Pimenta et al. 1997) závislá na přítomnosti či absenci PM.

Na základě pokusů, kde byla tvorba PM zablokována, je zřejmé, že PM sice zlepšuje kvalitu trávení, ale na druhou stranu ho zpomaluje. U druhů *Anopheles stephensi* a *Aedes aegypti* po zablokování tvorby PM bylo trávení krve rychlejší, než v případě její přítomnosti. Rychlost trávení (či přítomnost PM) přitom nemělo vliv na počet nakladených vajec (Villalon et al. 2003). Jiný výsledek byl pozorován u flebotoma *L. longipalpis*. U samic se zablokovanou tvorbou PM bylo sice také pozorováno rychlejší trávení, ale celkově menší počet nakladených vajec a jejich dřívější vykladení. 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. Možný důvod zvýšené mortality mohl také být přímý kontakt epitelu s produkty trávení hemoglobinu a následný oxidativní stres (Araújo et al. 2012).

2.5 Proteiny peritrofické matrix

Peritrofická matrix je tvořena chitinovými vlákny, obalenými proteiny (peritrofíny), které určují velikost a selektivitu pórů PM a propojují jednotlivá chitinová vlákna (Peters 1992).

Peritrofíny vznikly nejpravděpodobněji ze střevních mucinů získáním chitin-vázající domény (Lehane 1997). Majoritní protein PM komára *Aedes aegypti* (Ag-Aper1) má dvě homologní chitin-vázající domény, kterými spojuje dohromady jednotlivá chitinová vlákna (Shen & Jacobs-Lorena 1998). Jeho chitin-vázající doména je velice podobná chitin-vázající doméně chitinázy AgChi-1, která se také váže na chitinová vlákna a přestřihává je (Shen & Jacobs-lorena 1997). Ve flebotomech *P. papatasi*, *P. perniciosus* a *L. longipalpis* byly popsány transkriptomy dvou molekul peritrofínů (Ramalho-Ortigão et al. 2007, Jochim et al. 2008, Dostálová et al. 2011). Peritrofíny, které mají více chitin-vázajících domén, se také nejspíše podílejí na zesíťování chitinových mikrofibril. Ty, které mají jen jednu chitin-vázající doménu, zřejmě obalují volné konce chitinových mikrofibril (Dostálová & Volf 2012). V PM komára *Anopheles gambiae* byl objeven protein postrádající chitin-vázající doménu. Tento protein je pravděpodobně vázán mezi ostatní peritrofíny PM (Dinglasan et al.

2009). Homolog tohoto proteinu byl objeven i v transkriptomu druhu *P. perniciosus* (Dostálová et al. 2011).

Veškeré proteiny PM mohou tvořit 22-55 % její váhy (Lehane 1997). Peritrofiny určují velikost pórů v PM a tím i její propustnost pro trávicí enzymy (Terra 1990). Póry nejsou po celé ploše PM stejně veliké a i počet pórů stejné velikosti se může velice lišit. Často se jejich velikost pohybuje mezi 7-8 nm. Ta se zjišťuje buďto srovnáním výskytu trávicích enzymů o známé molekulové hmotnosti či barvených dextranů (cukerné zbytky) v endo- a ekto-peritrofickém prostoru (Terra 1990).

Při experimentálním nasání flebotomů krví, či jen fyziologickým roztokem, se proteinové složení PM velice liší. K transkripci mRNA peritrofinů dochází totiž pouze po nasátí krve (Ramalho-Ortigão et al. 2007), což je v souladu s výše zmíněným starším pozorováním, že v případě nasátí jiné tekutiny než krve se sice vytvoří PM, ale ta je strukturně velice odlišná od té, která se tvoří kolem krevního bolu (Freyvogel & Jaquet 1965). Podobně výrazně se liší i glykosylace jednotlivých proteinů v závislosti na přijaté potravě a tento proces je velice dynamický (Moskalyk et al. 1996). Glykosylace peritrofinů určuje selektivitu pórů PM a také její propustnost pro vodu. Málo glykosylované peritrofiny navíc podléhají snáze proteolytickému štěpení (Lehane 1997).

Zajímavostí může být vliv leishmanií na transkripci molekul peritrofinů. Ta byla snížena v případě nakažení flebotoma *P. papatasi* leishmanií *L. major* (Ramalho-Ortigão et al. 2007) zatímco v případě nakažení *L. longipalpis* leishmanií *L. infantum chagasi* došlo k nadprodukcí některých z nich (Jochim et al. 2008). V případě zablokování exprese genu PpPer1 (peritrofin *P. papatasi* účastníci se spojování chitinových mikrofibřil) došlo ke zvýšení počtu *L. major* o 40 % ve střevě *P. papatasi* 48 hod po sání. To naznačuje, že i exprese peritrofinů může mít vliv na přežití leishmanií ve střevě flebotoma a její modulace může být pro leishmanie výhodou (Coutinho-Abreu et al. 2013)

2.6 Vývoj leishmanií ve flebotomech

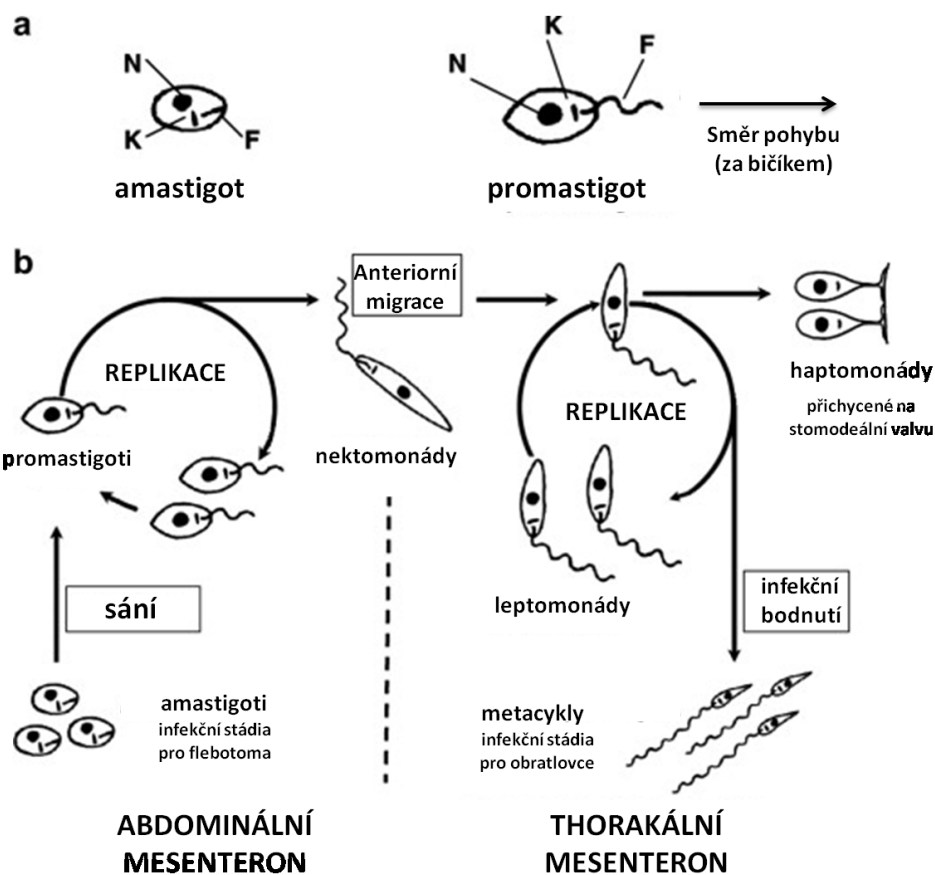
Flebotomy, kteří jsou schopni přenášet leishmanie, můžeme rozdělit na dvě skupiny. První z nich jsou ty druhy, které dokáží přenášet jen jeden druh leishmanie a žádný jiný a hovoříme o nich jako o specifických vektorech. Patří sem např. *P. papatasi* přenášející *L. major*. Do druhé skupiny řadíme ty druhy flebotomů, kteří jsou schopni přenášet více druhů leishmanií. O těchto druzích hovoříme jako o permisivních vektorech a řadíme sem např. flebotoma *L. longipalpis* či *P. arabicus*, kteří jsou schopni nespécificky přenášet více druhů leishmanií (Volf & Myskova 2007).

Flebotomové se řadí mezi thelmofágy („poolfeeders“), kteří při sání poškodí tkáň svým ústním ústrojím a sají krev vytékající z této rány. Tato sátá krev také díky poškození okolní tkáně obsahuje i makrofágy s amastigotními stádii leishmanií. Ve střevě flebotoma se amastigoti transformují na promastigoty (v důsledku změny okolního prostředí jako je např. pH, teplota atd.). Další vývoj leishmanií ve flebotomech probíhá třemi možnými způsoby, podle kterých byly ustanoveny tři velké skupiny leishmanií: Suprapylaria, Peripylaria a Hypopylaria (Lainson & Shaw 1987), které v podstatě odpovídají třem podrodům *Leishmania*, *Viannia* a *Sauroleishmania*. Poznatky o vývoji leishmanií ve flebotomech jsou dobře shrnuty v následujících pracích: (Bates & Rogers 2004, Kamhawi 2006, Bates 2007, Ramalho-Ortigao et al. 2010, Dostálová & Volf 2012).

Zástupci podrodu *Leishmania* prodělávají ve flebotomech tzv. suprapylariální vývoj, který probíhá v mesenteronu a stomodeu (skupina Suprapylaria (viz obr. 3)). Procykliční promastigoti (transformovaní z amastigotů) se dělí uvnitř nasáté krve a po opuštění peritrofické matrix se transformují na dlouhé nedělicí se nektomonády, které jsou velmi pohyblivé a dokážou se přichytit svým bičíkem na stěnu střeva (viz kap. 2.7.3). Z nektomonád vznikají leptomonády, které se dělí a kolonizují thorakální mesenteron. Z leptomonád se diferencují dvě oddělené populace již nedělicích se buněk. První z nich jsou haptomonády, které jsou přichycené na chitinové výstelce stomodeální valvy a rozrušují ji svými chitinázami. Další populací buněk jsou metacykly, které při transformaci ztratily schopnost přichycení na epitel střeva a jsou infekční pro savčího hostitele (shrnutí v (Bates 2007)). Další, nověji popsanou funkcí leptomonád je produkce PSG v thorakálním mesenteronu (Rogers et al. 2002).

Leishmanie z podrodu *Vianna* (např. *L. braziliensis*) se nejprve přichycují v proktodeu na chitinovou výstelku střeva. Poté se infekce přesunují anteriorně a leishmanie prodělávají velice podobný vývoj jako předchozí skupina. Protože jejich vývoj zasahuje všechny tři hlavní části trávicího traktu flebotomů, hovoříme o nich také jako o skupině Peripylaria (shrnutí v (Bates 2007)).

Leishmanie z podrodu *Sauroleishmania* prodělávají ve flebotomech buď peripylariální vývoj jako zástupci podrodu *Vianna*, nebo je jejich vývoj omezen na proktodeum, pak hovoříme o skupině Hypopylaria. Jejich přenos je pravděpodobně kontaminativní či se děje pozřením flebotoma konečným hostitelem (viz kap. 2.8). O vývoji této skupiny v přenašečích je však známo daleko méně podrobností, než je tomu v případě medicínsky významnějších podrodů *Leishmania* a *Viannia* (shrnutí v (Bates 2007)).



Obr. 3 – Vývojový cyklus leishmanií ze skupiny *Suprasyllaria* ve flebotomech; b). V části a) srovnání promastigotního a amastigotního stádia; N – jádro, K – kinetoplast, F – bičík. Dle (Bates 2007).

Leishmanie ze skupin *Suprasyllaria* i *Peripylaria* tedy završují vývoj v přenašeči anteriorní migrací do thorakálního mesenteronu a kolonizací stomodeální valvy. Při této migraci využívají leishmanie osmotaxi a chemotaxi. Jsou schopny detekovat cukr (pozitivní chemotaxe), jednoduché soli (osmotaxe) a dokonce i sliny flebotomů (pozitivní chemotaxe) (Barros et al. 2006).

Leishmanie, které kolonizují stomodeální valvu, ji svými chitinázami začnou rozrušovat (Schlein et al. 1991, Volf et al. 2004). Toto porušení vede ke ztrátě funkčnosti stomodeální valvy, která již neplní úlohu bariéry mezi předním a zadním střevem, nasátá krev se proto regurgitací vrací zpět a strhává s sebou infekční metacyklická stádia leishmanií do obratlovčího hostitele. Regurgitace krve také prodlužuje čas nutný k plnému nasátí flebotoma. Tento mechanismus experimentálně prokázali Rogers et al. (2008), kteří srovnali rozdíl mezi *L. mexicana* a její mutantní variantou s nadprodukcí chitinázy. Skupině flebotomů nakažené mutantní linií trvalo 2,5x déle, než se plně nasála. U myši, na kterých sáli flebotomové nakažené mutantní linií, došlo k dřívějšímu výskytu lézí, což bylo vysvětleno pravděpodobně vyšším množstvím inokulovaných parazitů (Rogers et al. 2008).

Leishmanie však nepoškozují pouze stomodeální valvu, ale regurgitaci a přenosu leishmanií na hostitele napomáhá také k zablokování celého thorakálního mesenteronu „zátkou“ tvořenou samotnými leishmaniami a gelem, který leishmanie produkují. Tento gel produkují samotné leishmanie (Stierhof et al. 1999) a to vývojové stádium leptomonád (Rogers et al. 2002). Tento gel je složen především z filamentózního proteofosfogykanu (fPPG) (Ilg et al. 1996). Později byl tento gel nazván „promastigote secretory gel“ PSG a mezi jeho funkce patří především zablokování thorakálního mesenteronu, což vede k obtížím při sání flebotoma na hostiteli. Mezi další funkce patří vytvoření prostředí vhodného pro metacyklogenezi a vyvíjení tlaku na stomodeální valvu, která pod tímto tlakem zůstává otevřena (Rogers et al. 2002). PSG hraje důležitou úlohu i v imunitní odpovědi obratlovčího hostitele, na kterém infekční flebotom sají. Při tomto sání se do obratlovčího hostitele dostávají nejen sliny flebotoma, ale i infekční metacyklická stadia parazita spolu s PSG. Všechny tyto tři komponenty dohromady ovlivňují imunitní odpověď obratlovčího hostitele, která rozhodne o vývoji infekce v něm (shrnuje v (Rohoušová & Volf 2006).

2.7 Překážky ve vývoji leishmanií ve flebotomech

Epitel krevsajícího dvoukřídlého hmyzu je před patogeny chráněn několika způsoby. První bariéra jsou enzymy tvořené střevním epitelem, které mohou poškozovat případné patogeny (Houk et al. 1979). Druhou bariérou je PM, která znemožňuje prostup infekčních organismů směrem k epitelu. Další překážkou jsou nejrůznější glykoproteiny a muciny, které na svém povrchu tvoří samotné buňky epitelu mesenteronu (Abraham & Jacobs-Lorena 2004).

2.7.1 Vliv trávicích enzymů na vývoj leishmanií ve flebotomech

Jednou z prvních překážek ve vývoji leishmanií uvnitř trávicího traktu flebotoma je tvorba trávicích enzymů spuštěná nasátím krve do abdominálního mesenteronu (Dillon & Lane 1993a). Hlavní povrchové molekuly leishmanií zodpovědné za ochranu před trávicími enzymy jsou fosfogykany (Secundino et al. 2010). Přesto zřejmě dochází k určité mortalitě leishmanií v časných fázích vývoje i u kompetentních vektorů. Tato mortalita může dosahovat i 35 % (Rogers et al. 2002) či 50 % (Pimenta et al. 1997) (v obou pokusech byli flebotomové infikovány přirozeně amastigoty v makrofázích). Tento letální efekt trávicích enzymů na leishmanie byl potvrzen i *in vitro* (Pimenta et al. 1997).

Leishmanie jsou však schopny snížit expresi trávicích enzymů (trypsinového a chymotrypsinového typu) ve střevě svého přirozeného přenašeče. Právě toto snížení je pravděpodobně jedním ze základních faktorů ovlivňujících vektorovou kompatibilitu. Schlein

a Romano (1986) popsali, že *L. major* snižuje produkci trávicích enzymů svého přirozeného přenašeče *P. papatasi* o 28%, zatímco nekompatibilní *L. donovani* ji naopak zvýšila o 32 %. Borovsky a Schlein (1987) poté upřesnili, že spíše než o celkovém snížení exprese trávicích enzymů by bylo vhodnější hovořit o oddálení vrcholu jejich tvorby. Při infikování *P. papatasi* druhem *L. major* došlo k výraznému snížení aktivity trávicích enzymů na začátku trávení krve (pokles o 50 % a 66 %; 20 hod a 30 hod po sání), zatímco v čase 52 hod došlo ke zvýšení oproti kontrole na 184 % aktivity. Při infekci flebotoma leishmanií *L. donovani* nebyl tento pokles tolik markantní jako u *L. major*, došlo k poklesu o 14% v čase 30 hod po sání a k navýšení pouze na 105% aktivity v čase 52 hod po sání. Zablokování funkce trypsinu exogenním inhibítorem (soyabean trypsin inhibitor) použili autoři jako důkaz, že právě trávicí enzymy ovlivňují přežití leishmanií. Po jeho zablokování byla *L. donovani* schopna přežít v trávicím traktu nepřirozeného přenašeče *P. papatasi* (Borovsky & Schlein 1987). Z výsledků předešlého pokusu můžeme předpokládat, že více náchylné k trávicím enzymům jsou pravděpodobně leishmanie transformující se z amastigotů na promastigoty. Zvýšení píku tvorby trávicích enzymů v čase 52 hod po sání na 184 % oproti kontrole již nejspíše transformovaným leishmaniím nevadí. Oddálení píku tvorby trávicích enzymů při nakažení *P. papatasi* leishmanií *L. major* popisují i Dillon & Lane (1993b). Letální efekt trávicích enzymů potvrzují i Schlein a Jacobson (1998), kteří inhibicí trypsinu (stejným způsobem jako v předchozím případě) zvýšili počet přeživších parazitů *L. donovani* ve střevě *P. papatasi* z 5 % na 70 %. Pozitivní vliv na vývoj leishmanií (nárůst o 30 %) mělo i použití heparinované krve, které snížilo aktivitu střevních proteáz (Schlein & Jacobson 1998). Ke stejným výsledkům dospívají i Volf a Svobodova (2001). Nutno však podotknout, že některé studie nezaznamenaly sníženou expresi trávicích enzymů ve střevě flebotoma po nakažení kompatibilním druhem leishmanie (Pimenta et al. 1997, Secundino et al. 2010).

V genomu *L. major* byly nalezeny inhibitory serinových peptidáz (ISP), které inhibují např. elastázu, trypsin a chymotrypsin. V genomu leishmanií však nebyl nalezen žádný cílový enzym, který by tyto inhibitory mohly blokovat, naproti tomu se tyto potenciálně blokovatelné enzymy vyskytují v savcích a hmyzu. Tyto ISP produkované leishmaniemi tedy s největší pravděpodobností hrají roli v interakcích mezi nimi a flebotomem (Ivens et al. 2005). To, že ISP mají vliv na serinové proteázy flebotoma bylo již experimentálně prokázáno (Morrison et al. 2012) stejně tak se asi uplatňují i v savčím hostiteli, kdy mutantní varianty leishmanií se zablokovanou tvorbou těchto inhibitorů vykazovaly defektní přežití v makrofázích (Eschenlauer et al. 2009).

V genomu *L. major* byly také nalezeny inhibitory cysteinových proteáz (ICP), u kterých byla predikováno možné zapojení v životním cyklu leishmanií (Ivens et al. 2005).

Besteiro et al. (2004) pozorovali, že tyto ICP nemají vliv na cysteinové proteázy, které leishmanie syntetizují. V navazujících pokusech bylo zjištěno, že všechny mutantní linie *L. mexicana* defektní v tvorbě ICP i nadprodukující ICP jsou schopny infikovat makrofágy *in vitro*, avšak mutanta nadprodukující ICP vykazovala *in vivo* defektní přežití v myši (Besteiro et al. 2004). Produkce ICP však nemá vliv na vývoj leishmanií ve flebotomech. Při infekci *L. longipalpis* stejnými mutantními liniemi *L. mexicana* jako v předchozím pokusu, nedošlo k žádnému rozdílu ve vývoji infekcí těchto mutant oproti kontrolní linii (Jecna et al. 2009).

2.7.2 Role PM ve vývoji leishmanií a způsoby jejího překonání

V časných fázích vývoje tvoří PM ochrannou vrstvu, která zpomaluje rychlost difuze enzymů směrem do středu krevního bolu. To bylo experimentálně dokázáno při infekci *P. papatasi* druhem *L. major*, kdy za pomoci exogenní chitinázy byla zablokována tvorba PM a tím došlo k selhání vývoje leishmanií v jinak kompetentním druhu flebotoma. Pokud byl přidán také inhibitor proteáz (soyabean trypsin inhibitor), vyvíjela se infekce normálním způsobem. Autoři tyto výsledky interpretovali jako potvrzení negativního vlivu trávicích enzymů a zároveň ochranného vlivu PM na vývoj leishmanií (Pimenta et al. 1997).

Prostupu trávicích enzymů kromě PM mechanicky brání i erytrocyty. V případě experimentálního zdvojnásobení jejich počtu v sáte krvi dojde i za nepřítomnosti PM k navracení počtu přeživších parazitů ke stejným počtům jako v kontrolách (Pimenta et al. 1997). Adler (1938) byl prvním, kdo pozoroval, že stoupající poměr krevního séra má negativní vliv na vyvíjející se leishmanie *L. tropica* ve flebotomovi *P. papatasi*. Stejný efekt potvrzují i Pimenta et al. (1997) na *L. major* a *P. papatasi*, kdy v případě nasátí čistého krevního séra dochází ke stejné redukci počtu parazitů jako v případě experimentálního rozrušení PM exogenní chitinázou. Samotná PM se okolo nasátého séra zformuje, je však tenká a není zcela celistvá (Pimenta et al. 1997).

V pozdější fázi vývoje leishmanií ve flebotomech ztrácí PM ochrannou roli a může naopak tvořit mechanickou bariéru pro postup infekce. Pokud leishmanie neopustí endoperitrofický prostor, jsou vydefekovány spolu se zbytky potravy flebotoma. První tuto skutečnost pozoroval Feng (1951) při zkoumání vývoje *L. donovani* ve flebotomech *P. chinensis* a *P. mongolensis*. Zjistil, že u *P. mongolensis* dojde k vydefekování leishmanií uvnitř PM spolu s nestrávenými zbytky potravy, na rozdíl od druhého druhu, který tyto leishmanie přenáší. Walters et al. (1992) pozoroval, že leishmanie druhu *L. panamensis* byly schopny opustit endoperitrofický prostor jen ve 30 % flebotomů druhu *P. papatasi*, který není

jejich přirozený přenašeč. Následnou anteriorní migraci pozoroval jen u 1 % případů, takže nekompatibilita tohoto druhu leishmanie byla patrná i na dalších úrovních (přichycení na epitel střeva).

Pokud je rozpad PM experimentálně zablokován přidáním allosamidinu (inhibitor chitináz) či potlačením tvorby chitinázy flebotoma (RNAi interference), nedojde k rozpadu PM a leishmanie jsou vydefekovány (Pimenta et al. 1997; Coutinho-Abreu et al. 2010).

Dle některých autorů leishmanie využívají k rozrušení a opuštění PM vlastní chitinázy podobně jako plasmodia (Shahabuddin et al. 1993). Schlein et al. (1991) usoudili, že při úniku z PM používají leishmanie vlastní chitinázu na základě pozorování, kdy v neinfikovaných flebotomech druhu *P. papatasi* dochází k rozpadu PM v její zadní části, zatímco u infikovaných *L. major* v její přední části, kde je naakumulovaná největší část parazitů. Jím popisovaná degradace přední části PM však odpovídá transparentnímu anteriornímu plagu, který je přítomen i u neinfikovaných flebotomů a pro leishmanie je stejně neprostupný, jako jiné části PM. Autoři navíc uvádějí, že ve střevech nenakažených nasátých flebotomů nebyla detekována žádná chitinázová aktivita po celou dobu trávení krve, z čehož usuzuje, že na degradaci PM se podílí pouze chitináza leishmanií. To je ale v rozporu s později popisovanými a dobře experimentálně podloženými výsledky jiných autorů, kteří popisují zapojení chitináz flebotomů do přirozeného cyklu tvorby a degradace PM (Ramalho-Ortigao & Traub-Cseko 2003, Ramalho-Ortigao et al. 2005).

Vliv chitinázy na vývoj ve flebotomech byl také testován na mutantech *L. mexicana* nadprodukcující chitinázu v jejich přirozeném přenašeči *L. longipalpis* (Joshi et al. 2005). Tato mutantní linie byla použita pro infekci flebotomů (*L. longipalpis*) a myši (BALB/c). Při vývoji ve flebotomech tyto mutantní leishmanie dříve kolonizovaly stomodeální valvu, z čehož autoři usuzují, že leishmanie využívají svoji chitinázu i pro opuštění PM. Stomodeální valva byla na elektron-mikroskopických snímcích více poškozena oproti kontrolní skupině (Rogers et al. 2008). Zatímco se tedy autoři v dnešní době shodují, že leishmanie používají svoji chitinázu k rozrušení stomodeální valvy, otázka jejího využití při úniku z PM je sporná. Proti zapojení chitináz leishmanií do degradace PM svědčí i fakt, že tento enzym je inaktivován hemoglobinem (Schlein & Jacobson 1994). Alespoň u některých druhů přenašečů a leishmanií je navíc poměrně jasně experimentálně prokázáno, že leishmanie pasivně čekají na rozpad PM pomocí chitináz flebotoma. Například u druhu *P. duboscqi* nebyl pozorován žádný rozdíl v degradaci 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 & Volf 2009). Navíc na elektron-mikroskopických řezech s leishmaniami uzavřenými v endoperitrofickém prostoru nebyly objeveny žádné známky

poškození PM. To bylo naopak viditelné např. v okolí symbiotických kvasinek, které se přirozeně vyskytují v mesenteronu střeva.

Klíčovou událostí pro vývoj leishmanií v přenašeči je nejpravděpodobněji 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 přichytit se na střevní epitel. To je zřejmě příčinou toho, že *S. schwetzi* není přenašečem leishmanií (Sádlová et al. 2013). Tento fakt musí být ale experimentálně ověřen, stejně jako ověření použití vlastní chitinázy leishmanií při úniku z PM.

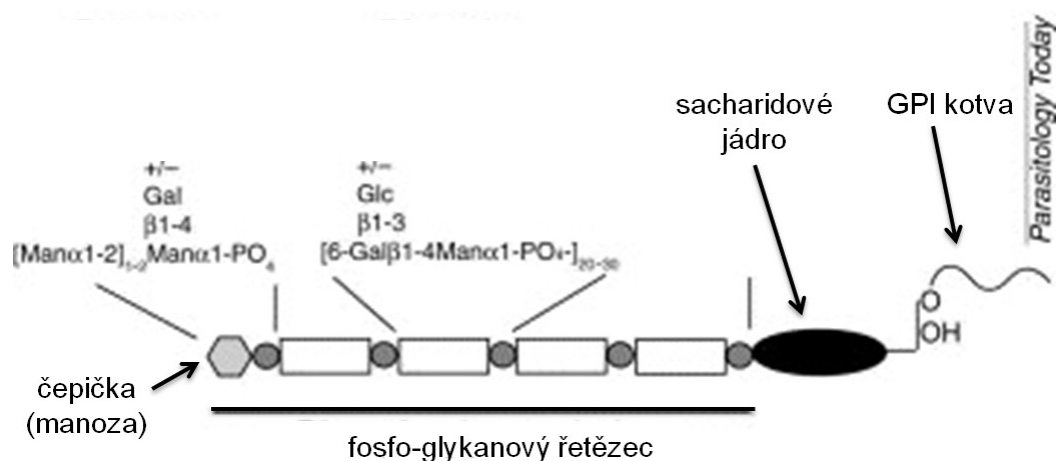
2.7.3 Přichycení leishmanií ve střevě flebotoma

Leishmanie používají rozšířený konec svého bičíku pro přichycení za pomoci hemidesmozomů na těch místech střeva, kde se nachází kutikulární výstelka (stomodeum a proktodeum, včetně stomodeální valvy). Tuto schopnost sdílejí i s jinými trypanosomatidy a tyto struktury jsou schopny vytvořit i *in vitro* (Wakid & Bates 2004). V případě uchycení leishmanií na střevní epitel flebotoma však nebyly žádné podobné struktury nikdy detekovány a toto přichycení je s největší pravděpodobností zajištěno interakcí mezi molekulami na povrchu leishmanie a střeva flebotoma (Bates 2008). Není zcela jasné, proč je pouze bičík zapojen do tohoto přichycení, když molekuly potřebné pro toto uchycení jsou pravděpodobně přítomny na celém povrchu leishmanie. Jedním z možných důvodů by mohlo být pouze jednoduché vysvětlení, že leishmanie mají bičík na přední části těla a proto je tato struktura jako první v kontaktu s epitelem střeva a svým tvarem je vhodná pro uchycení mezi mikrovily (Bates 2008).

Pro uchycení na stěnu střeva leishmanie využívají své povrchové molekuly. Hlavní povrchovou molekulou všech druhů leishmanií je lipofosfoglykan (LPG), jehož základními částmi jsou: a) glykofosfatidilinositolová (GPI) kotva, která uchycuje celou strukturu v plazmatické membráně; b) na ni navazující sacharidové jádro; c) dále pak dlouhý fosfoglykanový řetězec Gal(β 1,4)Man(α 1)-PO₄; d) na konci je tento řetězec zakončen oligosacharidovou čepičkou (viz obr 4). První dvě struktury jsou mezi různými druhy leishmanií konzervované, zatímco poslední dvě velmi polymorfní a to i v rámci jednotlivých kmenů z různých geografických oblastí (Sacks & Kamhawi 2001). Tyto mezidruhové rozdíly jsou nejspíše jedním z hlavních mechanismů zajišťujících specifické vztahy mezi leishmaniemi a přenašeči (Kamhawi 2006). LPG molekuly jsou specifické pro promastigotní formy leishmanií a během prvních 2 – 3 dní po nasátí nejsou na leishmaniích

transformujících se z amastigotů v promastigoty ještě povrchové molekuly LPG přítomny (Davies et al. 1990, Saraiva et al. 1995).

Metacykličtí promastigoti pak opět ztrácí schopnost vázat se na molekuly střevního epitelu, což je důležité v přenosu těchto infekčních stádií do hostitele (Pimenta et al. 1992, Kamhawi et al. 2004). Mechanismus tohoto jevu je druhově specifický. U *L. major* dochází k pokrytí velké části řetězce postranních cukrů neutrálním disacharidem manozou (Man(α 1-2)Man) (McConville et al. 1992), u *L. donovani* jsou jednotlivá koncová cukerná rezidua ohnuta a navzájem pospojována (Sacks et al. 1995), u *L. chagasi* je snížena exprese sacharidových zbytků (Soares et al. 2002).



Obr. 4 – Molekula LPG s vyobrazením jejích jednotlivých částí. Dle (Ilg 2000) upraveno.

LPG byl dlouho považován za jedinou povrchovou molekulu odpovědnou za přichycení leishmanií na epitel střeva flebotoma. Na dvojici *L. major* – *P. papatasi* bylo popsáno, že vazbu zajišťují sacharidy navázané podél fosfoglykanového řetězce LPG (Pimenta et al. 1992) a molekuly buněk střevního epitelu identifikované a popsané jako galektin (PpGalec) (Kamhawi et al. 2004). Tento galektin byl nalezen i u blízkého příbuzného druhu *P. dubosqi*, který je také vektorem *L. major* (Kamhawi et al. 2004). Po zablokování vazebných míst pro LPG na stěně střeva flebotoma, nebyla procyklická stádia *L. major* schopna přichytit se na jeho střevní epitel (Pimenta et al. 1992).

Alespoň u některých druhů flebotomů však není přichycení závislé na LPG leishmanií ani galektinu flebotoma. O těchto druzích hovoříme jako o permissivních vektorech, protože jsou často schopny přenášet více druhů leishmanií. Jedná se např. o druhy *L. longipalpis* či *P. arabicus* (Volf & Myskova 2007). Většina známých druhů flebotomů, které jsou vektory leishmanií, patří právě do skupiny permissivních vektorů (přenášejí více druhů leishmanií). To může být důležité především z epidemiologického hlediska, kdy se leishmanie mohou snadno šířit na nová ohniska v těchto permissivních druzích (Volf & Myskova 2007). Toto na LPG

nezávislé přichycení leishmanií ve střevě flebotoma bylo experimentálně prokázáno. Mutantní varianta *L. major* defektní v tvorbě LPG nebyla schopna přežít ve svém přirozeném přenašeči *P. papatasi*, byla však schopna přežít a vytvořit silnou infekci v permissivních druzích *P. arabicus* a *L. longipalpis*, což je důkazem toho, že LPG není zapojen do přichycení leishmanií v permissivních vektorech (Myskova et al. 2007). Střeva zkoumaných permissivních přenašečů reagovala s HPA biotinem a soyabean agglutininem, což jsou molekuly vážící se na terminální GalNAc sacharidová rezidua typická pro O-glykosylace. Při *in vivo* vizualizaci se tato HPA vážící místa vyskytovala hlavně na povrchu mikrovilů, kde se typicky leishmanie váží. Vazba leishmanií v těchto permissivních vektorech je tedy nejspíše zajišťována glykoproteiny obsahujícími GalNAc na povrchu stěny střeva flebotomů a lektinovými receptory na povrchu leishmanií (Myskova et al. 2007).

2.8 Role *S. schwetzi* v přenosu leishmanií

Flebotomové z rodu *Sergentomyia* jsou prokázány vektory leishmanií z podrodu *Sauroleishmania*. Ty jsou nepatogenní pro člověka a prodělávají ve flebotomech jednoduchý hypopylariální nebo peripylariální vývoj. Oproti původnímu názoru, že se jedná o skupinu bazální na fylogenetickém stromu leishmanií, díky novějším a kvalitnějším fylogenetickým analýzám dnes víme, že se jedná o sesterskou skupinu podrodu *Leishmania* (Espinosa et al. 2016) a znaky považované pro svou jednoduchost za původní jsou spíše sekundárně zjednodušené (shrnuté v (Bates 2007)). Oproti ostatním druhům leishmanií, které žijí uvnitř fagosomu makrofágů a jiných fagocytyjících buněk v podobě amastigotů, žijí sauroleishmanie volně v krevním oběhu ve formě procyklických promastigotů a nebo ve formě amastigotů v monocytech či erytrocytech (Wilson & Southgate 1979, Paperna et al. 2001). Jejich přenos je nejspíše kontaminativní (prediureze při sání flebotoma na hostiteli) (Bates 2007) či pozřením flebotoma plazím hostitelem (Wilson & Southgate 1979). Vzhledem k jejich přítomnosti především v zadní části trávicího traktu flebotoma nejsou pravděpodobně paraziti šířeni bodnutím jako u ostatních poddruhů leishmanií (Wilson & Southgate 1979, Shatova & Saf'ianova 1991, Zhang & Leng 1997).

Flebotomové rodu *Sergentomyia* preferenčně sají na plazech. Alespoň některé druhy jsou však schopné sát i na savcích, a protože jsou tyto flebotomové velice hojné v ohniscích leishmaniózy, byli také podezřelí z přenosu leishmanií na lidi (shrnuté v (Maia & Depaquit 2016)). *Sergentomyia schwetzi* má velký areál rozšíření v sub-saharské Africe a je také často nejpočetnějším druhem nalézajícím se v odchyťových pastích při studování flebofauny v ohniscích leishmaniózy (Gebremichael & Lane 1996, Elnaiem et al. 1997, Lambert et al. 2002, Senghor et al. 2011, 2016). Ačkoliv flebotomové z rodu *Sergentomyia* sají preferenčně

na plazech, je u nich popsáno i antropofilní chování (shrnuto v (Maia & Depaquit 2016)). Možnost zapojení tohoto rodu do přenosu leishmanií patogenních pro člověka byla recentně podpořena studií (Senghor et al. 2016). Tito autoři v oblasti Mont-Rolland v Senegalu detekovali DNA *L. infantum* v 4,19 % samic *S. schwetzi* a dokonce v jedné vydefekované samici pozorovali kolonizovanou přední část střeva a metacyklická stádia *L. infantum*. DNA *L. infantum* byla detekována i v jiných druzích místních flebotomů rodu *Sergentomyia* (*S. dubia* (5,38 %) a *S. magna* (3,64 %)) (Senghor et al. 2016).

Laboratorní experimenty, které měly vektorovou kompetenci *S. schwetzi* ověřit nebo vyvrátit ovšem jasně ukázaly, že leishmanie (*L. major*, *L. infantum* a *L. donovani*) nepřeživaly defekaci přenašeče, což bylo způsobeno pravděpodobně nemožností opustit endoperitrofický prostor (Lawyer et al. 1990, Sádlová et al. 2013). Sádlová et al. (2013) vyslovili hypotézu, že za nekompatibilitu *S. schwetzi* pro lidské leishmanie může krátký čas mezi rozpadem PM a její defekací. Tento fakt je však třeba experimentálně ověřit, což je i cílem této diplomové práce

3 METODIKA

3.1 Chov kolonií flebotomů

Dospělci zkoumaných druhů flebotomů – *Sergentomyia schwetzi* (Ethiopie), *Phlebotomus orientalis* (Ethiopie), *P. argentipes* (Indie) a *P. papatasi* (Turecko) – byli chováni v sítích ve specializovaných chovných místnostech se stabilní vzdušnou vlhkostí (60 %), teplotou 26 °C a režimem světlo – tma (14 hod – 10 hod). Dospělci byli krmeni 50% sacharózou *ad libitum*, rozpuštěnou v destilované vodě. Po nasátí na anestetizovaném hlodavci (většinou BALB/c myši) byly samice přeneseny exhaustorem do plastového kelímku vylitého sádrou. Vylíhlé larvy byly krmeny speciální potravou. Ta se skládá ze směsi králíčích bobků a granulí, která se nechá zplesnivět ve speciálních boxech a po vysušení se nadrobno namele. Z kukel vylíhlí dospělci jsou vypuštěni z kelímků do sítě a cyklus je uzavřen. Detailně je chov kolonií flebotomů popsán v práci (Volf & Volfova 2011).

3.2 Použité druhy leishmanií a jejich kultivace

Leishmania major LV561 (LRC-L137; MHOM/IL/1967/Jericho-II)

V pokusech byla použita GFP transfekovaná mutanta tohoto kmenu, která byla poskytnuta doc. Janem Votýpkou a Mgr. Dagmarou Folkovou (Katedra parazitologie, Univerzita Karlova, Praha).

Leishmania donovani (MHOM/ET/2010/GR374)

V pokusech byly použity eGFP transfekované formy této leishmanie (Sádlová et al. 2011).

Leishmania mexicana M379 (MNYC/BZ/62/M379)

V experimentech byla použita mutanta s nadprodukcí chitinázy (LmexCht1 – chitinázový gen nesený v plazmidu pKSNEO) a příslušná kontrola (vnesen pouze plazmid pKSNEO) (Joshi et al. 2005). Tyto leishmanie poskytl prof. Paul Bates, Lancaster University, UK.

Kultivace leishmanií:

Všechny uvedené druhy leishmanií byly kultivovány v 1,5 ml jejich příslušného média (viz kap. 4). Toto médium bylo sterilně napipetované do kultivačních nádob s plochým dnem (Thermo-Scientific) a jako inokulační dávka byly použity 2-3 kapky staré kultury. Tyto kultivační nádoby byly uloženy termostatu při teplotě 23 °C.

3.3 Sledování kinetiky a morfologie peritrofické matrix pomocí světelné mikroskopie

Všechny čtyři druhy flebotomů (*P. papatasi*, *P. orientalis*, *P. argentipes* a *S. schwetzi*) byly studovány v časech 0 hod, 1 hod, 3 hod, 6 hod, 12 hod, 24 hod, 48 hod, 72 hod, 96 hod a 120 hod po sání na anestetizované BALB/c myši. Nasáté samice flebotomů byly znehybněny nízkou teplotou (plastový kelímek na ledu) a vypitvány ve fyziologickém roztoku (viz kap. 4). Pro snadnější vyndání PM ze střeva bylo střevo vyjmuté ponořeno na několik sekund do destilované vody, ve které se střevní stěna odloučila od PM (Gemetchu 1974).

Pomocí světelného mikroskopu (Olympus BX-51) s kamerou (Olympus DP-70) byla u samic zjišťována a fotografována přítomnost a vzhled PM (barva, přítomnost anteriorního plugu, zakončení PM na posteriorním konci, stopy porušení PM), stav trávení krve (velikost krevního bolu) a defekace. Tyto parametry byly zapisovány do protokolu a reprezentativní snímky ukládány v počítači. Pro každý časový interval a každý druh flebotoma bylo vyhodnoceno alespoň 20 samic.

3.4 Příprava preparátů na histologii

Všechny čtyři druhy flebotomů byly podrobeny histologickému zkoumání v čase 24 hod po nasátí na anestetizované BALB/c myši. Tento čas byl vybrán, protože byla u všech druhů flebotomů již/ještě vytvořena PM (viz graf 1 a 2).

Vzorky pro histologii byly připraveny dle následujícího pracovního postupu:

1) Flebotomové byli znehybněni nízkou teplotou (plastová miska na ledu) a vypitváni ve fixáži AFA (viz kap. 4). Každému jedinci byla odstraněna křídla a nohy. Žiletkou byla oddělena zadní část zadečku (cca 2 články) a přední část hrudi. Zbytek tělíčka byl přenesen do zkumavky s čistou fixáží.

2) Fixace ve fixáži AFA v lednici při teplotě 4 °C cca. 48 hod.

3) Vymytí fixáže v roztoku PBS (viz kap. 4) (3 x 15min)

4) Odvodnění vzrůstající ethanolovou řadou:

70% - 15 min (2x)

80% - 15 min

96% - 15 min (2x)

- 5) Prosyčování infiltračním roztokem JB-4 (Polysciences, Inc.) (viz kap. 4) (2 x 30 min)
- 6) Další prosyčování infiltračním roztokem JB-4 (v lednici při 4 °C přes noc)
- 7) Výměna infiltračního roztoku (2 x 30 min)
- 8) Převedení do želatinových zalévacích histologických kapslí (velikost 4; 210 µl) (Polysciences, Inc.) a přidání zalévacího roztoku JB-4 (viz kap. 4). Vzorky uloženy v lednici (4 °C) do vytvrnutí pryskyřice (přes noc).
- 9) Vzorky namočený do dH₂O, aby se rozmočily želatinové kapsle a ty pak byly ze vzorků lehce stáhnuty pryč.
- 10) Krájení bločků na polosilné řezy (4 - 6 µm) na mikrotomu Shandon Finesse ME⁺ (Thermo Scientific) skleněným nožem.
- 11) Přenesení řezu pinzetou na kapku destilované vody na podložním skle a připečení řezů při teplotě cca 80 °C.
- 12) Barvení polosilných řezů Hematoxylinem (4 min) Eosinem (0,2%) (2 min) (viz kap. 4)
- 13) Zalití řezů do zalévacího média (EUPARAL MTNG medium, BioQuip products, Inc).

Práce s preparáty:

Takto připravené a zalité preparáty byly pozorovány na mikroskopu (Olympus BX-51) a nafoceny kamerou (Olympus DP-70). Na preparátech byla zjišťována přítomnost PM, její relativní tloušťka, barva (probíhající inkrustace hemem), přítomnost anteriorního plugu a struktur na jejím posteriorním konci.

Z celkového počtu zalitých bločků (80 ks, 20 ks pro každý druh flebotoma) byly všechny nakrájeny a nafoceno bylo cca 200 fotografií.

3.5 Příprava preparátů na transmisní el. mikroskopii

Flebotomové byli nasáti na anestetizované BALB/c myši a byli pro TEM zpracováni v následujících časech: *P. orientalis*, *P. papatasi* a *S. schwetzi* v čase 48 hod po nasátí a *P. argentipes* v čase 24 po nasátí. Tento čas byl vybrán u každého druhu flebotoma s ohledem na kinetiku jeho PM a k měření byl vybrán interval, kdy je PM již plně zralá, ale ještě nezačíná degenerovat (viz graf 1 a 2).

Vzorky pro TEM byly připraveny dle následujícího pracovního postupu:

1) Flebotomové byli znehybněni nízkou teplotou (plastový kelímek na ledu) a vypitváni v Karnovského fixáži s přidavkem glukózy dle Karnovsky (1965) (upraveno) (viz kap. 4). Každému jedinci byla odstraněna křídla a nohy. Žiletkou byla oddělena zadní část zadečku (cca 2 články) a přední část hrudi. Zbytek tělíčka byl přenesen do zkumavky s čistou Karnovského fixáží.

2) Fixace v Karnovského fixáži v lednici při teplotě 4 °C minimálně 24 hod.

3) Fixace vymyta 0,1% kakodylátovým pufrem s přidavkem glukózy (viz kap. 4) (3 x 15min)

4) Postfixace v 2% OsO₄ (SPI-chem) v kakodylátovém pufru (smíchání zásobního 4% OsO₄ v poměru 1:1 s vypíracím 0,1M kakodylátovým pufrem) při teplotě 4 °C (4 hod.)

5) Promytí vzorků v destilované vodě (2 x 15min)

6) Odvodnění vzrůstající ethanolovou řadou:

35% - 15 min

50% - 15 min

70% - 15 min

80% - 15 min

96% - 15 min

100% - 15 min

7) Další dehydratace 100% acetonem (3 x 15 min)

8) Prosyncování zalévací pryskyřicí SPURR (SPI-chem) ředěné 100% acetonem dle následujícího schématu:

Poměrové díly aceton : pryskyřice

3 : 1 – 4 hod

1 : 1 – 8 hod

1 : 3 – 12 hod

- 8) Převedení do čisté pryskyřice SPURR (2 x 12 hod)
- 9) Zalití vzorků do forem s čistou pryskyřicí SPURR
- 10) Tvrdnutí bločků v termostatu při 70 – 80 °C (12 hod)
- 11) Předkrájení bločků na polosilné řezy (0,5 µm) na ultramikrotomu (Ultracut E Reichert-Jung) skleněným nožem na vodní hladinu.
- 12) přenesení řezů štětečkem na kapku destilované vody na podložním skle a připečení řezů při teplotě cca 80 °C.
- 13) Barvení polosilných řezů 1% Toluidinovou modří (Sigma-Aldrich) (viz kap. 4) pro lepší orientaci ve vzorku a nalezení vhodného místa pro krájení ultratenkých řezů. Vhodné místo bylo vybráno vždy přibližně uprostřed krevního bolu, kolmo na podélnou osu flebotoma (příčný řez).
- 14) Nakrájení ultratenkých řezů (80 – 90 nm) (krájené diamantovým nožem Diatome 45°) a jejich přenesení na měděnou síťku s celulózovou blánou a kontrastování 2,5% vodným roztokem octanu uranulu a roztokem citrátu olova (Reynolds 1963)*.

* Tento bod provedla pí. Kirchmanová z Laboratoře el. mikroskopie Patologicko-anatomického ústavu 1. LF UK.

Práce s preparáty:

Takto připravené preparáty byly pozorovány na elektronovém mikroskopu (TEM JEOL 1011) s CCD kamerou Veleta a akvizičním softwarem iTEM 5.1 (Olympus Soft Imaging Solution GmbH) v Laboratoři el. mikroskopie, PřF UK. Během pozorování byla pořízena obrazová dokumentace PM spolu s částí střevního epitelu při zvětšení 6 000x.

Z celkového počtu zalitých bloků (cca 150 ks) v různých časových intervalech jich byla přibližně polovina nakrájena a prohlédnuta v elektronovém mikroskopu.

3.6 Měření tloušťky peritrofické matrix

Měření tloušťky PM bylo provedeno na fotografiích z transmisní elektronové mikroskopie. Tyto fotografie byly pořízeny na příčných řezech těly flebotomů, přibližně uprostřed krevního bolu při zvětšení 6 000x. Samotné měření bylo provedeno v programu ImageJ. Pro každý druh flebotoma byli vyhodnoceni čtyři jedinci, z každého jedince bylo vyfotografováno 10 fotografií na reprezentativních místech, ze kterých bylo naměřeno 100 měření. Dohromady 400 měření pro každý druh flebotoma, 1 600 měření celkem.

3.7 Testování vlivu komerčních chitináz na přežití leishmanií *in vitro*

Lyofilizát komerční chitinázy ze *Streptomyces griseus* (25Unit; Sigma-Aldrich) a *Trichoderma viride* (25Unit; Sigma-Aldrich) byl rozpuštěn v 1 ml sterilního PBS. Takto připravený roztok byl rozdělen do aliquot a uchováván v mrazáku (-20 °C).

Parazitičtí prvoci *L. major* byli kultivováni ve 200 µl média pro *L. major* (viz. kap. 4) a nebo ve 200 µl inaktivované defibrinované králičí krve (viz kap. 4). Pokus byl proveden v 96 jamkové destičce (Greiner) uložené v termostatu při teplotě 26 °C (stejná teplota při které se udržují kolonie flebotomů viz bod 3.1). Počáteční koncentrace kultury byla 1×10^6 /ml. Chitináza byla zředěna dvojkovou ředící řadou a přidána do jednotlivých jamek v objemu 20 µl tak, aby výsledná koncentrace byla 2,5 U/ml; 1,25 U/ml; 0,6 U/ml; 0,3 U/ml; 0,15 U/ml a 0,07 U/ml. Do kontrol bylo přidáno 20 µl PBS.

Vyhodnocení pokusu proběhlo 24 hod od počátku kultivace. Z každého vzorku bylo odebráno 10 µl média s leishmaniami, ty byly usmrceny v 990 µl 1% formaldehydu v PBS. Počítání koncentrace leishmanií proběhlo v Bürkerově komůrce.

3.8 Testování vlivu komerčních chitináz na přežití jiných provoků *in vitro*

3.8.1 Vliv komerční chitinázy ze *Streptomyces griseus* na *Trichomonas vaginalis in vitro*

Parazitičtí prvoci *T. vaginalis* kmen T1 (poskytnutý J. H. Taiem, Institute of Biomedical Science, Taipei, Taiwan) byli kultivováni ve 200 µl Diamondova TYM média (viz kap. 4) a výchozí koncentrace kultury byla 5×10^3 / ml. Pokus byl proveden v 96 jamkové destičce (Greiner) uzavřené v igelitovém pytlíku s vyvíječem anaerobní atmosféry (Erba Lachema) uložené v termostatu při teplotě 37 °C. Chitináza byla rozředěna dvojkovou ředící řadou a přidána do jednotlivých jamek v objemu 20 µl tak aby celková koncentrace chitinázy v jamce byla 1 U/ml; 0,5 U/ml; 0,25 U/ml; 0,125 U/ml a 0,06 U/ml. Do kontrol bylo přidáno 20 µl PBS.

Vyhodnocení pokusu proběhlo 48 hod od jeho započetí pomocí počítání koncentrace kultury v Bürkerově komůrce.

3.8.2 Vliv komerční chitinázy z *Trichoderma viride* na *Trypanosoma brucei* *in vitro*

Parazitičtí prvoci *Trypanosoma brucei brucei* (29-13) byli kultivováni ve 200 μ l média SDM-79 (viz kap. 4) a výchozí koncentrací kultury 5×10^6 / ml. Pokus byl proveden v 96 jamkové destičce (Greiner) uložené v termostatu při 26 °C. Chitináza byla rozředěna dvojkovou ředící řadou a přidána do jednotlivých jamek v objemu 20 μ l tak, aby výsledná koncentrace byla 2,5 U/ml; 1,25 U/ml; 0,6 U/ml; 0,3 U/ml; 0,15 U/ml a 0,07 U/ml. Do kontrol bylo přidáno 20 μ l PBS.

Vyhodnocení pokusu proběhlo po 24 hod od počátku kultivace pomocí počítání koncentrace kultury v Bürkerově komůrce.

3.9 Výběr nejvhodnější houby pro produkci chitinázy a měření chitinázové aktivity

Houby jako zdroj chitinázy byly zvoleny proto, že je známo, že produkovanou chitinázu uvolňují v relativně velkém množství do okolního prostředí (tekutého média). Ze sbírek mykologického oddělení katedry botaniky PŘF UK jsme získali následující čtyři druhy hub s potenciální chitinázovou aktivitou:

- 1) *Beauveria bassiana* (CCF 4422)
- 2) *Lecanicillium muscarium* (CCF 3297)
- 3) *Isaria farinosa* (CCF 4808)
- 4) *Isaria fumosorosea* (CCF 3272)

Jednotlivé druhy hub byly kultivovány v kultivačních lahvích Corning pro buněčné linie (25 cm²) (Sigma-Aldrich) ve 20 ml tekutého média dle Suresh a Chandrasekaran (1999) (upraveno) (viz kap. 4) za stálého třepání na třepačce (cca 150 RPM) při teplotě 26 °C po dobu jednoho až dvou týdnů.

Před měřením chitinázové aktivity byl celý objem média zcentrifugován při 250 g po dobu 10 min a v supernatantu byla exochitinázová aktivita změřena pomocí Chitinase assay kitu (Sigma-Aldrich) dle instrukcí výrobce. Značené chitinázové substráty (4-Nitrophenyl

N,N'-diacetyl- β -D-chitobioside a 4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide) byly hydrolyzovány chitinázou a koncentrace odštěpeného 4-nitrophenolu byla změřena na spektrofotometru INFINITE M200 (Schoeller instruments) při absorbanci 405 nm. Exochitinázová aktivita byla spočítána dle návodu (1U chitinázy uvolní 1 μ mol 4-nitrophenolu z daného substrátu za minutu při pH 4,8 a teplotě 37 °C).

3.10 Produkce chitinázy houbou *Beauveria bassiana*

Entomofágní houba *Beauveria bassiana* byla kultivována v tekutém médiu dle Suresh a Chandrasekaran (1999) (upraveno). Z důvodu potřeby většího množství chitinázy byla kultivována v 500 ml Erlenmeyerových baňkách ve 150 – 200 ml média. Kultivace probíhala za stálého třepání na třepačce (cca 150 – 200 RPM) za teploty 26 °C, která je nejpříznivější pro produkci chitinázy (Suresh & Chandrasekaran 1999). Inokulum bylo cca 10 ml média s *B. bassiana*, která v něm byla kultivována cca 1 týden. Do tohoto inokulačního média byla houba inokulována z šikmého agaru (viz kap. 4), na kterém byla dlouhodobě uchovávána v lednici (4 °C).

Přibližně po 3 týdnech byla kultivace ukončena (dle hustoty narostlé kultury). Veškerý obsah baňky byl slit do 50 ml centrifugačních zkumavek Corning (Sigma-Aldrich) a zcentrifugován při 250 g po dobu 10 min. Supernatant byl odebrán a sterilizován přes 22 μ m milipórový injekční filtr (Millex-GP). Protože velikost chitinázy Bbchit1 se pohybuje mezi 35 - 36 kDA (Fang et al. 2005), bylo možno chitinázu dále zakoncentrovat za pomoci centrifugačních zkumavek s 30 kDA molekulárním filtrem (Amicon).

V takto zakoncentrované chitináze v médiu byla změřena chitinázová aktivita pomocí Chitinase assay kitu (Sigma-Aldrich) (viz bod 3.9). Poté byla rozdělena do aliquot a uložena v mrazáku (-80 °C), kde byla dlouhodobě uchována.

3.11 Testování vlivu jednotlivých chitináz na přežití leishmanií *in vitro* s využitím metody FACS

Parazitické prvoci *L. major* a *L. donovani* byli kultivováni ve 200 μ l příslušného média smíchaného s chitinázou v níže uvedených koncentracích. Výchozí koncentrace leishmanií ve všech jamkách byla 1×10^6 /ml. Pokus probíhal v 96 jamkové destičce (Greiner) uložené v termostatu při teplotě 26 °C (při této teplotě jsou udržovány i kolonie flebotomů viz bod 3.1) a vyhodnocen po 24 hodinách kultivace.

Pro otestování vlivu chitinázy z *B. bassiana* byla smíchána zásobní zakoncentrovaná chitináza (0,14 U/ml) v poměru 1:1 s leishmanii v médiu či v králičí inaktivované defibrinované krvi. Výsledná koncentrace chitinázy byla 0,07 U/ml v jamce. (Stejně byla chitináza ředěna krví i pro experimentální infekce flebotomů viz oddíl 3.13.2). Jako kontrola byly použity leishmanie v médiu či krvi, smíchané se samotným médiem pro kultivaci *B. bassiana* v poměru 1:1.

Pro otestování vlivu komerční chitinázy ze *S. griseus* byla rozředěná chitináza v PBS (zásobní roztok 25 U/ml) v objemu 10 μ l přidána k leishmaniím v médiu (či krvi) tak, aby výsledná koncentrace v jamkách byla 1 U/ml, 0,5 U/ml a 0,07 U/ml (stejná koncentrace jako u *B. bassiana*). V kontrolních vzorcích bylo přidáno 10 μ l PBS.

Při vyhodnocení tohoto pokusu jsme využili metodu průtokové cytometrie (FACS). Použity byly transfekované leishmanie produkující fluorescenční protein GFP. K rozeznání mrtvých buněk od živých jsme využili barvení DAPI, které proniká pouze do mrtvých buněk (a zároveň živé buňky zabíjí, proto bylo přidáno těsně před měřením). Jako pozitivní kontrola měření signálu DAPI sloužily leishmanie zabitě v 1% roztoku formaldehydu v PBS a permeabilizované 0,5 % Tritonem X-100 (Sigma-Aldrich). Mortalita byla počítána jako poměr mrtvých buněk (se signálem pro GFP i DAPI) k živým buňkám (signál pouze pro GFP). Ve vzorcích, kde byl celkový počet detekovaných buněk signifikantně nižší, než v kontrolách, protože mrtvé buňky se již rozložily natolik, že nebyly přístrojem jako buňky rozeznány, jsme mortalitu spočítali porovnáním s počtem buněk v příslušné kontrole. Z každé jamky byl odebrán vzorek 5 μ l, který byl napipetován do 200 μ l fyziologického roztoku. Těsně před měřením daného vzorku byly přidány 2 μ l DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride, 0.005 mg/ml; Thermo Fisher Scientific). Každý vzorek byl v pokusu zdvojen a pokus byl proveden alespoň 3x pro každou koncentraci.

Průtokový cytometr CytoFLEX S (Beckman Coulter, Inc., Brea, California, USA) je osazen čtyřmi lasery (405nm, 488nm, 561nm, 638nm) a třinácti detektory fluorescence. GFP bylo excitováno laserem 488 nm a jeho fluorescence byla detekována s použitím 525/40 filtru. DAPI bylo excitováno laserem 405 nm a jeho fluorescence byla detekována filtrem 450/50. Analýza dat proběhla v programu CytExpert (Beckman Coulter).

3.12 Experimentální rozrušení peritrofické matrix u *S. schwetzi*

3.12.1 Mechanické rozrušení peritrofické matrix

Nasáté samice byly znehybněny nízkou teplotou (plastový kelímek na ledu) a pod binolupou jim byl špendlíkovou hlavičkou jemně zmáčknut zadeček v místech, kde se nacházela nasátá krev. Poté byly samice přeneseny zpět do sítě v pokojové teplotě.

3.12.2 Rozrušení PM nasátím cukru s chitinázou

Pro ověření, do jaké míry samice sají cukr během prvních 48h po nasátí krve, byl nasátým samicím přidán do sítě cukr obarvený potravinářskou modří (Indigokarmín – E132, ACORO spol.). Cukr byl přidán v časech 24 hod a 48 hod po sání krve a kontrolní pitvy proběhly vždy 24 hod po jeho přidání do sítě.

Ve druhé fázi pokusu byl tento obarvený cukr smíchán s komerční chitinázou ze *S. griseus* v koncentraci 1 U/ml. Pokus proběhl dle stejného schématu.

3.12.3 Rozrušení PM nasátím krve s chitinázou

Další možností bylo nasát flebotomy krví s přidanou chitinázou během experimentálního sání na krmítku přes membránu z kuřecí kůže (viz bod 3.13). Komerční chitinázy ze *S. griseus* a *T. viride* (Sigma-Aldrich) byly přidány do inaktivované králičí krve tak, aby výsledná koncentrace byla 1 U/ml a 0,1 U/ml. Supernatant z kultury *B. bassiana* obsahující chitinázu byl smíchán s inaktivovanou králičí krví v poměru 1:1 (výsledná konc. 0,07 U/ml) a v poměru 9:1 (výsledná konc. 0,126 U/ml).

Abychom ověřili, že vliv na PM není způsobený jen naředěním přijímané krve, kontrolní skupina byla nasáta na stejně naředěné krvi fyziologickým roztokem. Kontrolní pitvy byly provedeny 24 hod PBM.

3.13 Experimentální infekce flebotoma *S. schwetzi* s využitím chitináz

Samice flebotomů *S. schwetzi* byly sáty pomocí membránového sání přes kuřecí kůži upevněnou na speciálním skleněném krmítku, které je ohříváno protékající vodou na teplotu 37 °C. Králičí defibrinovaná krev byla inaktivována při 56 °C po dobu 35 min. Kultura leishmanií byla stočena, resuspendována v 1ml fyziologického roztoku a po spočítání naředěna na finální koncentraci 1×10^6 leishmanií v 1 ml krve. Na krmítku zafixovaná v chemických stojanech byly nasazeny sítě s flebotomy a ponechány ve tmě při teplotě 26 °C po dobu cca 2 hod. Poté byli nenasátí jedinci ze sítě vytrženi a nasáté samice chovány v termostatu při 26 °C a stálé vlhkosti s cukerným roztokem *ad libitum*.

3.13.1 Experimentální infekcí s chitinázou ze *S. griseus* a *L. major*

Pokus probíhal dle výše popsaného schématu s použitím *L. major*. Chitináza ze zásobního roztoku 25U/ml PBS byla přidána k suspenzi krve a leishmanií tak, aby její finální koncentrace byla 1 U/ml a 2 U/ml. V kontrolní skupině byla použita inaktivovaná krev spolu s leishmaniemi bez chitinázy.

Kontrolní pitvy (viz další bod) proběhly v den 2 (ověření, zda nakažení během experimentálního sání proběhlo úspěšně) a v den 5 (kontrola infekcí ve střevě flebotoma) po sání.

3.13.2 Experimentální infekce s chitinázou *B. bassiana* a leishmaniemi *L. major* a *L. donovani*.

Tento pokus proběhl dle výše uvedeného schématu v bodě 3.13 s leishmaniemi *L. major* a *L. donovani*. Zakoncentrovaný supernatant z kultury z *B. bassiana* obsahující chitinázu (0.14U/ml) byl smíchán v poměru 1:1 s krví, takže finální koncentrace chitinázy byla 0,07 U/ml a koncentrace leishmanií 1×10^6 /ml. V kontrole bylo místo supernatantu použito samotné médium pro kultivaci houby *B. bassiana*.

Kontrolní pitvy proběhly ve dnech 1, 3, 5, 7 a 10 po sání. Během pitev byla zaznamenávána intenzita infekce, lokalizace infekce a stav defekace flebotoma.

Samice flebotomů byly vypitvány ve fyziologickém roztoku. Byla jim oddělena hlava, křídla a nohy. Za pomoci pinzety a entomologické minucie (No. 20) zapíchnuté ve špejli bylo vytáhnuto ven střevo a leishmanie uvnitř střeva byly pozorovány a foceny pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus BX-51) s kamerou (Olympus DP-70).

Rozlišovány byly tři stupně intenzity infekce:

Lehká infekce (≥ 1 a ≤ 100 leishmanií)

Střední infekce (> 100 a $< 1\,000$ leishmanií)

Silná infekce ($\geq 1\,000$ leishmanií)

Lokalizace infekcí byla hodnocena v pěti kategoriích:

E.Sp. – prostor uvnitř peritrofické matrix (Endoperitrophic space)

AMG – abdominální mesenteron (Abdominal midgut)

TMG – thorakální mesenteron (Thoracic midgut)

Kardia – kolonizována oblast kardie

SV – kolonizovaná stomodeální valva

3.13.3 Morfometrie leishmanií

Rozměry promastigotů leishmanií byly měřeny z flebotomů z předchozího pokusu se silnou infekcí a kolonizovanou stomodeální valvou či oblastí kardié. Vypitvané střevo flebotoma bylo roztlačeno na podložním sklíčku, fixováno methanolem (5 min) a barveno 5% Giemsou (Sigma) pod dobu 20 min. Tato sklíčka byla pozorována na mikroskopu (Olympus BX-51) a nafocena kamerou (Olympus DP-70). V každém pokusu (*L. major* a *L. donovani*) byly použity roztlaky ze čtyř jedinců, z nichž bylo měřeno vždy 50 promastigotů (pro každý druh leishmanie tedy celkem 200 promastigotů). Samotné měření bylo provedeno v programu ImageJ a měřena byla délka a šířka těla parazita a délka bičíku.

Rozlišovány byly tyto morfologické typy promastigotů:

| | |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Dlouhé nektomonády | (délka těla $\geq 14\mu\text{m}$) |
| Leptomonády | (délka bičíku $< 2x$ délka těla; délka těla $< 14\mu\text{m}$) |
| Metacykličtí promastigoti | (délka bičíku $\geq 2x$ délka těla; délka těla $< 14\mu\text{m}$) |

3.13.4 Experimentální infekce s *L. mexicana* s nadprodukcí chitinázy

V pokusu byl použit kmen *L. mexicana* s nadprodukcí chitinázy a jeho kontrola s vneseným prázdným plazmidem. Pokus byl proveden dle schématu v bodě 3.13. Vyhodnocení pokusu proběhlo 24 hod po sání pro kontrolou nakažení flebotomů a v den 7 po sání pro kontrolu vyvinutých infekcí. Pitvy proběhly stejným způsobem jako v bodě 3.13.2.

V rámci tohoto pokusu byla změřena chitinázová aktivita obou kmenů *L. mexicana*. Kultury leishmanií byly stočeny při 300 g a promyty ve fyziologickém roztoku. Poté byla kultura opět stočena a resuspendována v médiu pro *L. mexicana* (viz kap. 4). Výsledný objem média byl 1 ml a koncentrace 1×10^7 /ml leishmanií. Kultivace proběhla za standardních podmínek po následujících 24 hod. Po této době byla změřena chitinázová aktivita v supernatantu obou dvou kmenů pomocí Chitinase assay kitu (Sigma-Aldrich) (viz kap. 3.9).

3.14 Zjištění přítomnosti O-glykosylovaných proteinů ve střevě čtyř druhů flebotomů

O-glykosylace střevních proteinů flebotomů (*P. orientalis*, *P. argentipes*, *P. papatasi* a *S. schwezi*) byla zjišťována s použitím metody Western blot – SDS PAGE. Jako marker O-glykosylovaných proteinů byl použit biotinovaný lektin *Helix pomatia* (HPA biotin). HPA lektin rozpoznává GalNAc (N-acetylgalaktosamin), typický sacharid pro O-glykosylace.

Western blot byl proveden dle následujícího schématu:

- 1) Mesenterony samic flebotomů byly vypitvány po 15 ks do 10 µl Tris-NaCl (viz kap. 4) a uchovávány v -80 °C (ne déle než měsíc).
- 2) Vzorky byly 3x zmrazeny (a rozmrazeny) v tekutém dusíku.
- 3) Vzorky byly svařeny s redukujícím vzorkovým pufrem (ředění 1:4) (viz kap. 4) po dobu 3 min ve vroucí vodě (100 °C).
- 4) Vzorky byly nanесeny na polyakrylamidový gel (starter gel: 4%, dělicí gel: 10%) (Bio-Rad)
- 5) Proteiny byly rozděleny pomocí Mini-PROTEAN II (Bio-Rad) setu pro elektroforézu v SDS pufru (Bio-Rad) při napětí 200 V a nelimitujícím proudu.
- 6) Přenos rozdělených proteinů na nitrocelulóзовou membránu v přístroji iBlot (ThermoFisher). Každý pruh rozdělených proteinů byl rozříznut na dvě poloviny (podélně).
- 7) Blokování membrány v 5% BSA (Sigma-Aldrich) rozpuštěném v Tris-Tween (viz kap. 4) přes noc při 4 °C.
- 8) Zředění HPA biotinu (Sigma-Aldrich) v poměru 1:800 (zásobní roztok: 1mg/ml) v Tris-Tween. Preinkubace poloviny množství HPA biotinu s inhibičním cukrem 0,25M GalNAc (N-acetylgalaktosamin) (Sigma-Aldrich) po dobu 30 min. Druhá polovina HPA biotinu bez přidání inhibičního cukru.
- 9) Promytí membrány Tris-Tween 1 x 5 min
- 10) Přidání HPA biotinu k polovinám proužků, které sloužily pro vyvolání pozitivní reakce. K druhým polovinám přidán HPA biotin blokový GalNAc cukrem, které sloužily jako negativní kontrola. Inkubace 1 hod.
- 11) Promytí 3 x 5 min Tris-tween

- 12) Inkubace se Streptavidin peroxidázou (konc. 2,5 µg/ml) (Sigma-Aldrich) v Tris-Tween po dobu 1 hod.
- 13) Promytí 3 x 5 min Tris-tween a 1x v samotném Tris- NaCl
- 14) Barvení substrátovým roztokem s chloronaftolem (Sigma-Aldrich) do vyvolání reakce
- 15) Zastavení reakce pomocí dH₂O

3.15 Statistická analýza

Mortalita leishmanií *in vitro* byly testována pomocí analýzy variance (ANOVA) včetně Tukeyho Post Hoc testu. Šířka PM byla testována pomocí nested ANOVY opět s využitím Post Hoc testu (t-test s Bonterroniho-Holmovou korekcí). Všechny statistické analýzy byly dělány pomocí statistického programu SPSS verze 23 nebo programu R (<http://cran.r-project.org>).

4 PROTOKOLY CHEMIKÁLIÍ

Fyziologický roztok:

| | |
|-------------------|--------|
| NaCl | 4,38 g |
| dH ₂ O | 500 ml |

PBS:

| | |
|-------------------------------------------------------|----------------|
| NaCl | 8 g |
| KCl | 0,2 g |
| Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O | 1,53 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2 g |
| dH ₂ O | doplnit do 1 L |

Toulinidová modř:

| | |
|--------------------------|--------|
| Toulinidová modř (Sigma) | 1g |
| Borax | 1g |
| dH ₂ O | 100 ml |

Doporučuji rozpouštět v teplé vodě a po rozpuštění všech složek výsledný roztok přefiltrovat přes 22 um injekční filtr.

Karnovského fixáž:

| | |
|---------------------------------|-----------------------------|
| 0,2M kakodylátový pufr (pH 7) | 50 ml |
| 20% vodný roztok formaldehydu | 10 ml |
| 25% roztok glutaraldehydu (SPI) | 10 ml (nebo 31,25 ml 8% GA) |
| Glukóza | 2,7 g |
| dH ₂ O | doplnit do 100 ml |

Doporučuje se skladovat roztok paraformaldehydu a glutaraldehydu i v mrazáku odděleně (tj. přidat paraformaldehyd do zbytku fixáže až těsně před použitím) a jen krátkou dobu.

Roztok formaldehydu (20%):

| | |
|-----------------------|-------|
| Paraformaldehyd (SPI) | 2g |
| dH ₂ O | 10 ml |

Zahřívát vodu za 70 °C, přisypat paraformaldehyd a přidat cca 1-2 kapky 1M NaOH. Celý obsah zcentrifugovat a použít čistou horní vrstvu. Vždy dělat větší množství než je potřeba, paraformaldehyd se nerozpustí všechno a dole zůstává bílá sklovitá sediment.

Kakodylátový pufr 0,2M:

| | |
|-----------------------|-------------------|
| Kakodylan sodný (SPI) | 21,4 g |
| dH ₂ O | doplnit do 500 ml |

Upravit na pH 7 (nikdy ne pomocí pH metru, dojde ke zničení sondy) pomocí lakmusových papírků.

Vypírací roztok 0,1M:

| | |
|------------------------|-------|
| Kakodylátový pufr 0,2M | 50 ml |
| dH ₂ O | 50 ml |
| Glukóza | 2,7 g |

Fixace AFA:

| | |
|----------------------------|------------------------------|
| Formaldehyd 38% | 6 ml |
| Ethanol 96% | 49,48 ml |
| k. octová ledová (bezvodá) | 4 ml |
| dH ₂ O | 40,52 ml (doplnit do 100 ml) |

Skladovat v lednici při 4 °C.

JB-4 Embedding Kit (Polysciences, Inc.):Infiltrační roztok:

| | |
|----------------------|---------|
| JB-4 Plus Solution a | 10 ml |
| Benzoyl Peroxide | 0,125 g |

Zalévací roztok:

| | |
|------------------------------------|--------|
| Infiltrační roztok (čerstvý) | 5 ml |
| JB-4 Plus Solution B (akcelerátor) | 0,2 ml |

Ehrlichův kyselý hematoxylin:

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Hematoxylin C ₁₆ H ₁₄ O ₆ ·3H ₂ O (Lachema) | 2g |
| Ethanol 96% | 100 ml |
| Led. (bezvodá) k. octová | 10 ml |
| Glycerin | 100 ml |
| dH ₂ O | 100 ml |
| Síran hlinito-draselný KAl (SO ₄) ₂ | 3g |

Dozrání lze urychlit 0,4 g KIO₃ (jodičnan draselný) či NaIO₃ (jodičnan sodný). Po rozpuštění přefiltrovat přes 22 µm injekční filtr.

Eosin:

Rozpustit eosin (Lachema) v teplé destilované H₂O dle požadované koncentrace (0,1 – 0,5 %) Po rozpuštění přefiltrovat přes 22 µm injekční filtr.

Low viscosity Embedding Media – SPURR (SPI-chem):

| | |
|----------|------|
| ERL 4221 | 10g |
| DER 736 | 8g |
| NSA | 25g |
| DMAE | 0,3g |

Jednotlivé složky pryskyřice (kromě akcelerátoru DMAE) byly pipetovány do centrifugační falkony (50 ml) a po každé složce byla váha vytaretována. Po promíchání těchto tří složek byl přidán akcelerátor a pryskyřice byla promíchána a uchovávána v mrazáku (-20 °C).

Médium pro kultivaci hub dle Suresh a Chandrasekaran (1999) (upraveno):

| | |
|---------------------------|--------------------|
| Neopepton (BD) | 50g |
| Glukóza | 50g |
| Kvasničný extrakt (Sigma) | 10g |
| Sůl (NaCl) | 2,5 g |
| dH ₂ O | doplnit do 1 litru |

Sterilizovat v autoklávu (120°C, 20 minut)

Šikmý agar z média pro kultivaci hub dle Suresh & Chandrasekaran (1999) upraveno:

Médium bylo namícháno dle výše uvedeného schématu a bylo do něj přidáno 1,5g agaru na 100 ml média. Poté bylo rozděleno do dlouhých skleněných chemických zkumavek, zašpuntováno buničitou vatou a vyklávkováno (viz výše). Po vyndání z autoklávu chladly zkumavky ve stojánku, který byl umístěn tak, aby médium uvnitř vytvořilo co největší plochu a přitom se nedotýkalo vaty na horním okraji.

Médium pro kultivaci hub SAB:

| | |
|-------------------|--------------------|
| Neopepton (BD) | 10g |
| Glukóza | 40g |
| Kvasničný extrakt | 50g |
| dH ₂ O | doplnit do 1 litru |

Sterilizovat v autoklávu (120°C, 20 minut)

Diamondovo médium TYM na kultivaci *T. vaginalis*:

| | |
|-----------------------------------------|-----------|
| trypton (OXOID) | 10 g |
| kvasničný autolyzát (Imuna Pharm) | 5 g |
| maltóza (Sigma) | 5 g |
| L-cystein (Sigma) | 1 g |
| kyselina askorbová (Sigma) | 0,2 g |
| KH ₂ PO ₄ (Fluka) | 0,8 g |
| K ₂ HPO ₄ (Fluka) | 0,8 g |
| citrát železato amonný | 1 ml |
| dH ₂ O | do 900 ml |

Upravit pH pomocí KOH na 6,2. Sterilizovat v autoklávu (120°C, 20 minut) a po sterilizaci přidat 100 ml inaktivovaného koňského séra (10% výsledná koncentrace) (inaktivace séra při 56°C po dobu 30 minut).

Růstové médium SDM-79 pro kultivaci *Trypanosoma brucei brucei*:

1) rozpustit 21,1 g následujících sloučenin ve 200 ml destilované vody

| | |
|--------------------|--------|
| Medium 199 (Sigma) | 2 g |
| Glukoza | 1 g |
| HEPES (Sigma) | 8,74 g |
| MOPS (Sigma) | 5,53 g |
| NaHCO ₃ | 2 g |
| L-Alanin | 200 mg |
| L-Arginin | 100 mg |
| L-Methionin | 70 mg |
| L-Phenylalanin | 80 mg |
| L-Prolin | 600 mg |

| | |
|--------------------------|--------|
| L-Serin | 60 mg |
| L-Taurin | 160 mg |
| L-Threonin | 350 mg |
| L-Tyrosin | 100 mg |
| Adenosin | 10 mg |
| Guanosin | 10 mg |
| D-Glukosamin-HCl | 50 mg |
| Kyselina listová | 4 mg |
| P-Aminobenzoová kyselina | 2 mg |
| Biotin | 0,2 mg |

- 2) rozpustit 7 g D-MEM v 600 ml destilované vody
- 3) po úplném rozpuštění slít 1. a 2. dohromady
- 4) přidat 8 ml MEM amino acids
- 5) přidat 6 ml MEM NONESSENTIAL amino acids
- 6) přidat 5 mg heminu
- 7) přidat 100.000 jednotek penicilinu
- 8) upravit pH na 7,3 pomocí silně koncentrovaného NaOH
- 9) doplnit do 850 ml, tj. přidat 22,5 ml destilované vody
- 10) přidat 150 ml fetální kravské sérum
- 11) přefiltrovat, skladovat při 4°C

Médium *Leishmania major*:

| | |
|-----------------------------------------|------------------|
| Fetal-bovinní sérum (Gibco)* | 5 ml (10%) |
| BME vitaminy (Sigma) | 0,5 ml (1%) |
| Amikacin (Amikin, Bristol-Myers Squibb) | 250 µg/ml |
| M199 medium (Sigma) | doplnit do 50 ml |

* Tepelně inaktivované při 56 °C

Médium *Leishmania donovani*:

| | |
|-----------------------------------------|------------------|
| Fetal-bovinní sérum (Gibco)* | 5 ml (10%) |
| BME vitaminy (Sigma) | 0,5 ml (1%) |
| Sterilní moč | 1 ml (2%) |
| Amikacin (Amikin, Bristol-Myers Squibb) | 250 µg/ml |
| Hygromycin-B (Sigma)** | 150 µg/ml |
| M199 medium (Sigma) | doplnit do 50 ml |

* Tepelně inaktivované při 56 °C

**selekční antibiotikum pro geneticky upravenou linii

Médium *Leishmania mexicana*:

| | |
|-----------------------------------------|------------------|
| Fetal-bovinní sérum (Gibco)* | 5 ml (10%) |
| BME vitaminy (Sigma) | 0,5 ml (1%) |
| Sterilní moč | 1 ml (2%) |
| Amikacin (Amikin, Bristol-Myers Squibb) | 250 µg/ml |
| Geneticin (Sigma)** | 100 µg/ml |
| M199 medium (Sigma) | doplnit do 50 ml |

* Tepelně inaktivované při 56 °C

** selekční antibiotikum pro geneticky upravenou linii

Králičí krev defibrinovaná a deaktivovaná:

Králičí defibrinovaná krev (Veleta), byla těsně před použitím ponořena do vodní lázně o teplotě 56 °C po dobu 35 min.

Tris-NaCl:

| | |
|---------------------|-------------------------|
| Trizma base (Sigma) | 20 mM (ph 7,5) (2,42 g) |
| NaCl | 150 mM (8,76 g) |

Tris-NaCl-Tween:

| | |
|---------------------|-------------------------|
| Trizma base (Sigma) | 20 mM (ph 7,5) (2,42 g) |
| NaCl | 150 mM (8,76 g) |
| Tween 20 (Sigma) | 0,05% |

Redukující vzorkový pufr:

| | |
|----------------------|--------|
| 1M Tris-HCl, pH 6,8 | 60 µl |
| 50% glycerol | 500 µl |
| 10% SDS | 200 µl |
| 1% bromfenolová modř | 100 µl |
| 2-merkapt ethanol | 050 µl |
| dH ₂ O | 90 µl |

Skladovat v mrazáku (-20 °C)

5 VÝSLEDKY

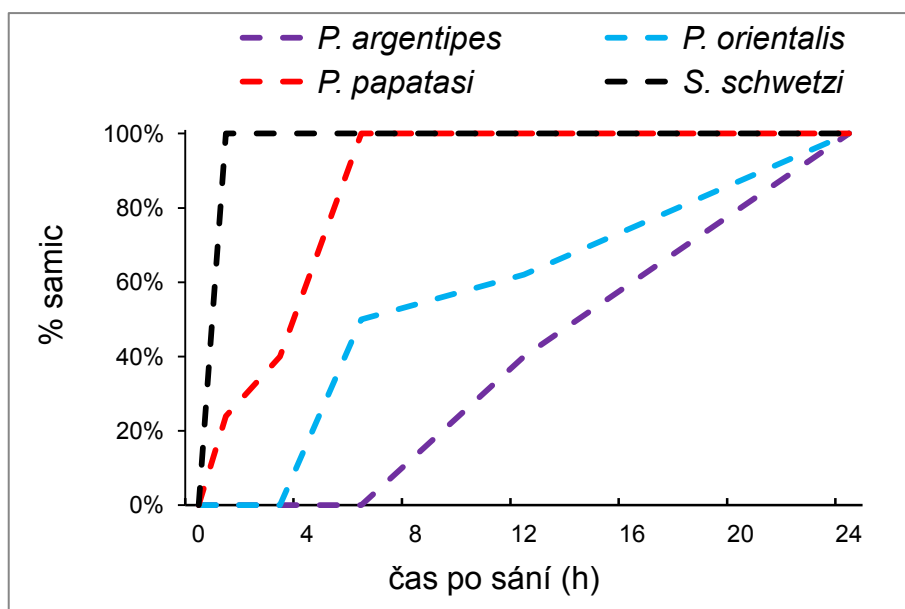
5.1 Srovnání vlastností peritrofické matrix čtyř druhů flebotomů s odlišnou vektorovou kompetencí pro *L. donovani*

V této části práce byly zkoumány dva druhy flebotomů podporující vývoj *L. donovani* (*P. argentipes* a *P. orientalis*) a dva druhy k tomuto parazitu rezistentní (*P. papatasi* a *S. schwetzi*). Srovnáním morfologie a kinetiky tvorby a rozpadu PM u těchto druhů lišících se vektorovou kompetencí chceme zjistit význam PM pro vývoj leishmanií uvnitř trávicího traktu flebotomů.

5.1.1 Kinetika tvorby a rozpadu peritrofické matrix

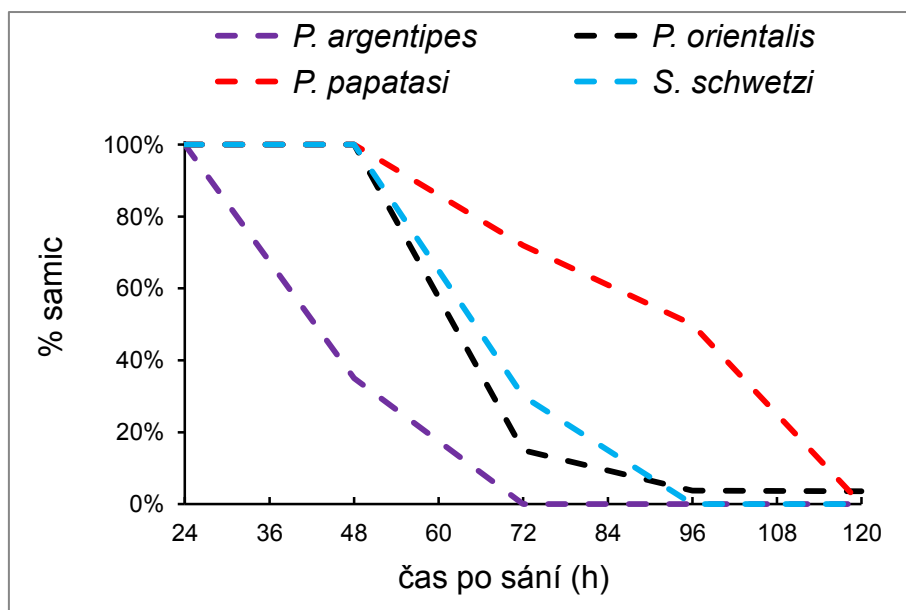
Po sání na anestetizované BALB/c myši byly v různých časových intervalech pitvány samice flebotomů a byla v nich zjišťována přítomnost PM a stav defekace pomocí světelné mikroskopie.

Tvorba PM probíhala nejrychleji u druhu *S. schwetzi*. Již hodinu po sání byla vyvinutá tenká PM u všech samic. Rychlou tvorbu PM jsme zaznamenali také u *P. papatasi*, kde byla PM vytvořena u 100 % samic 4 hod po sání. Nejpomaleji se PM tvořila u obou přirozených přenašečů *L. donovani* – *P. argentipes* a *P. orientalis* – u kterých byla vyvinuta u všech samic až 24 hod po sání (viz graf 1).



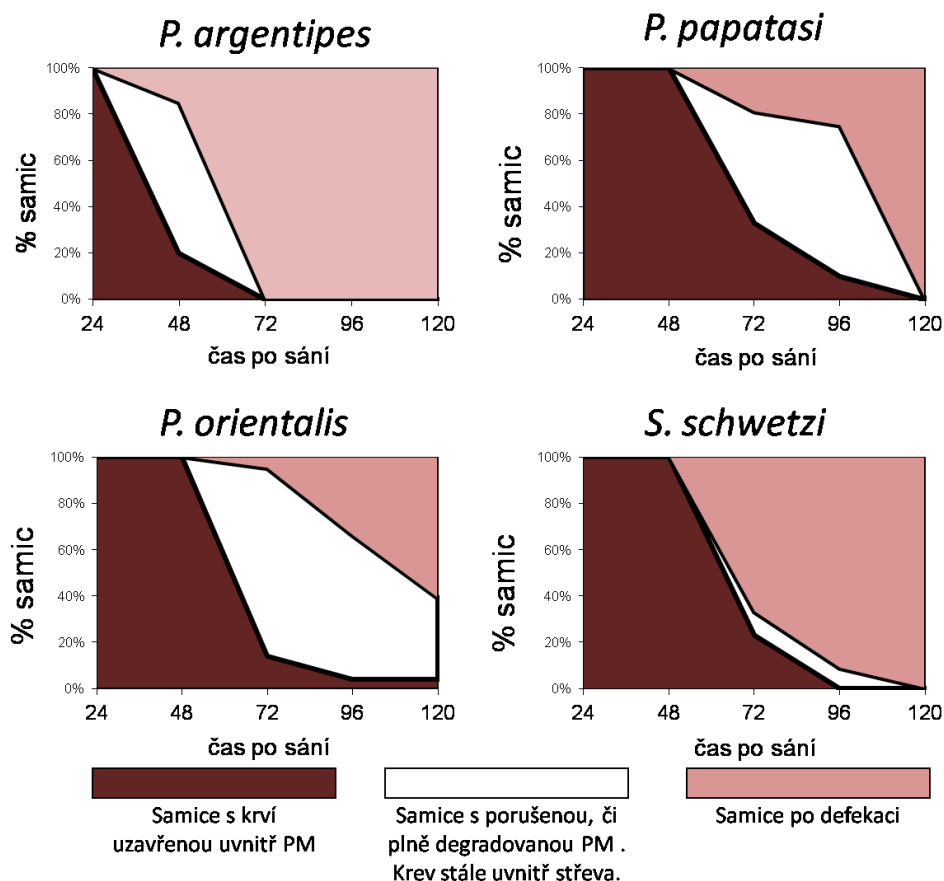
Graf 1 – Průběh tvorby peritrofické matrix u čtyř druhů flebotomů. Pro každý časový interval vypitváno 20 samic.

Rozpad PM probíhal nejrychleji u *P. argentipes*, kdy v čase 48 hod po sání byla PM přítomna jen u 35 % samic a v čase 72 hod po sání již nebyla nalezena u žádné samice. Tento druh flebotoma má tedy PM vyvinutou nejkratší dobu ze všech čtyř zkoumaných druhů. U druhů *S. schwetzi* a *P. orientalis* jsme pozorovali podobný průběh degradace PM, ta byla u většiny samic degradována 96 hod po sání. Nejdéle trval rozpad PM u *P. papatasi*, kdy ještě v čase 96 hod po sání byla PM přítomna u 50 % samic. Teprve až 120 hod po sání byla PM u všech samic degradována (viz graf 2).



Graf 2 – Průběh rozpadu peritrofické matrix u čtyř druhů flebotomů. Pro každý časový interval vypitváno 20 samic.

Pro vývoj leishmanií ve střevě flebotomů je důležitý časový interval, kdy je PM ve střevě flebotoma již porušena nebo degradována, ale nedošlo ještě k defekaci. Zbytky nestrávené krve spolu s leishmaniemi jsou v tomto intervalu v kontaktu se střevním epitelem. Tato doba je nejspíše klíčová pro přichycení leishmanií na stěnu střeva, čímž se brání vydefekování se zbytky nestrávené potravy. Další grafy znázorňují čas rozpadu PM ve vztahu k času defekace flebotoma (viz graf 3). Interval mezi těmito událostmi se u jednotlivých druhů výrazně lišil a trval průměrně 21 hod u *P. argentipes*, 38 hod u *P. papatasi* a 48 hod u *P. orientalis*. Výrazně krátký byl však tento interval u *S. schwetzi*, kde trval průměrně pouze 3 hod.

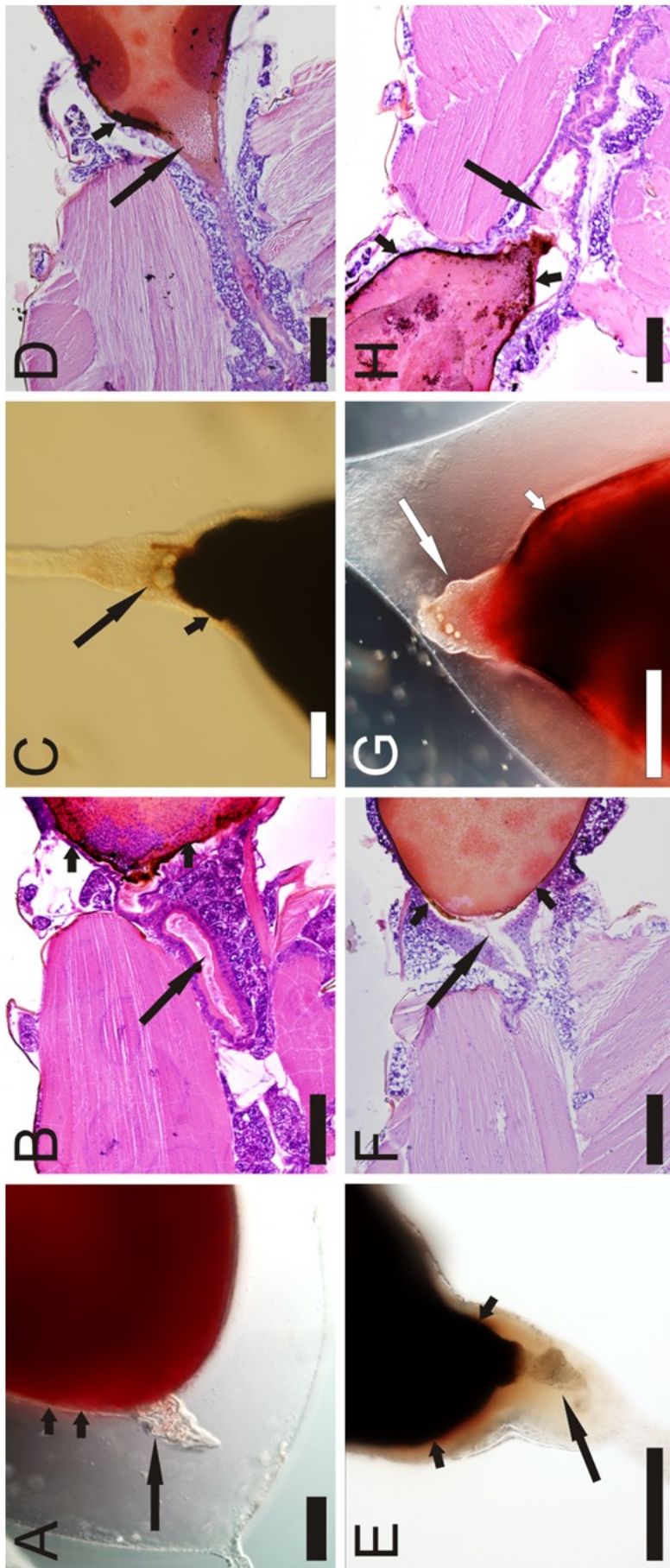


Graf 3 – Vztah mezi rozrušením PM a defekací flebotoma. Bíle vyznačen interval, kdy je degradována PM, ale stále jsou ve střevě zbytky potravy. Pro každý časový interval vypitváno 20 samic.

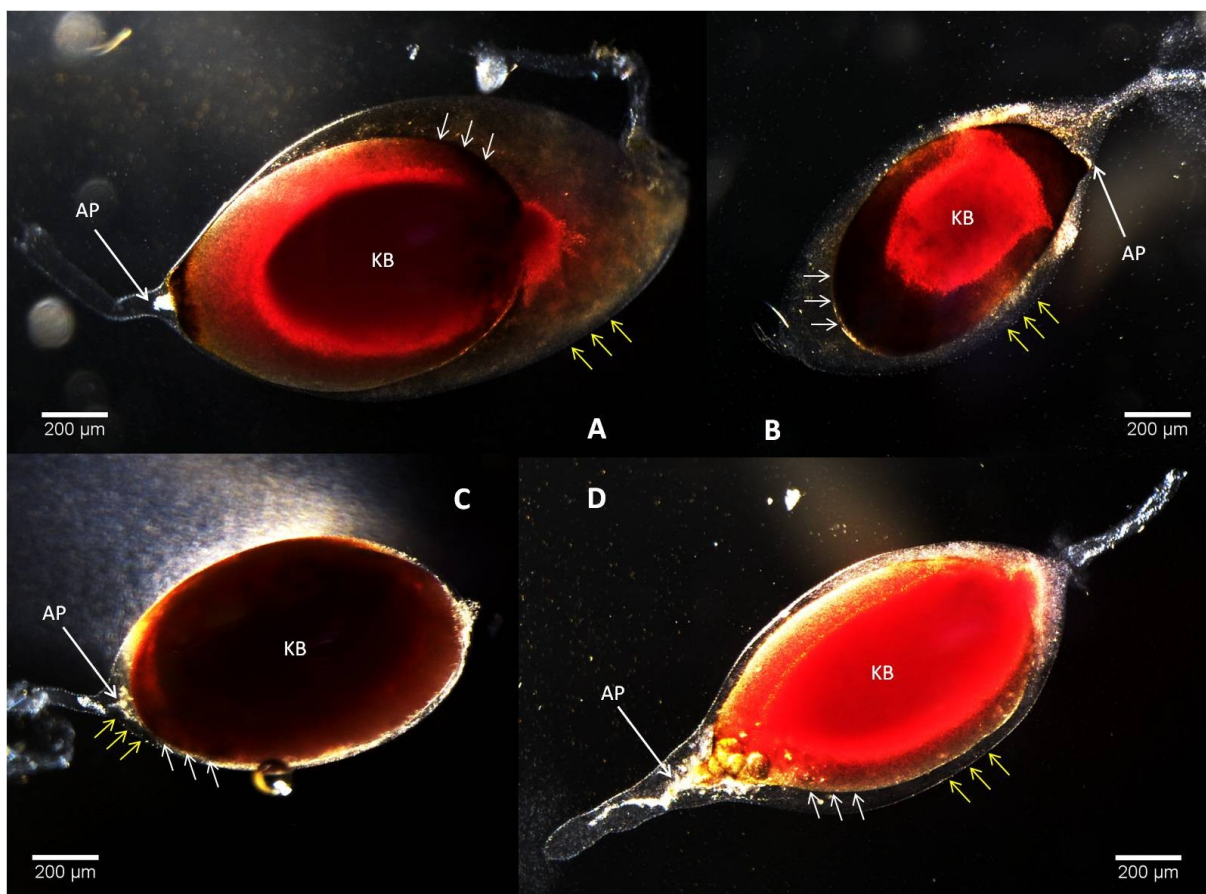
5.1.2 Hrubá morfologie peritrofické matrix

Hrubá morfologie PM byla sledována pomocí světelné mikroskopie a to jak na nativních preparátech pitvaných ve fyziologickém roztoku (obr. 6), tak za pomoci histologických technik na obarvených řezech podélnými řezy těla flebotomů (obr. 7). Z našich pozorování vyplývá, že všechny čtyři druhy flebotomů mají anteriorní část PM zakončenu strukturou, která se nazývá anteriorní plug (AP) (obr. 5). Během trávení krve nedochází k inkrustaci AP hemem.

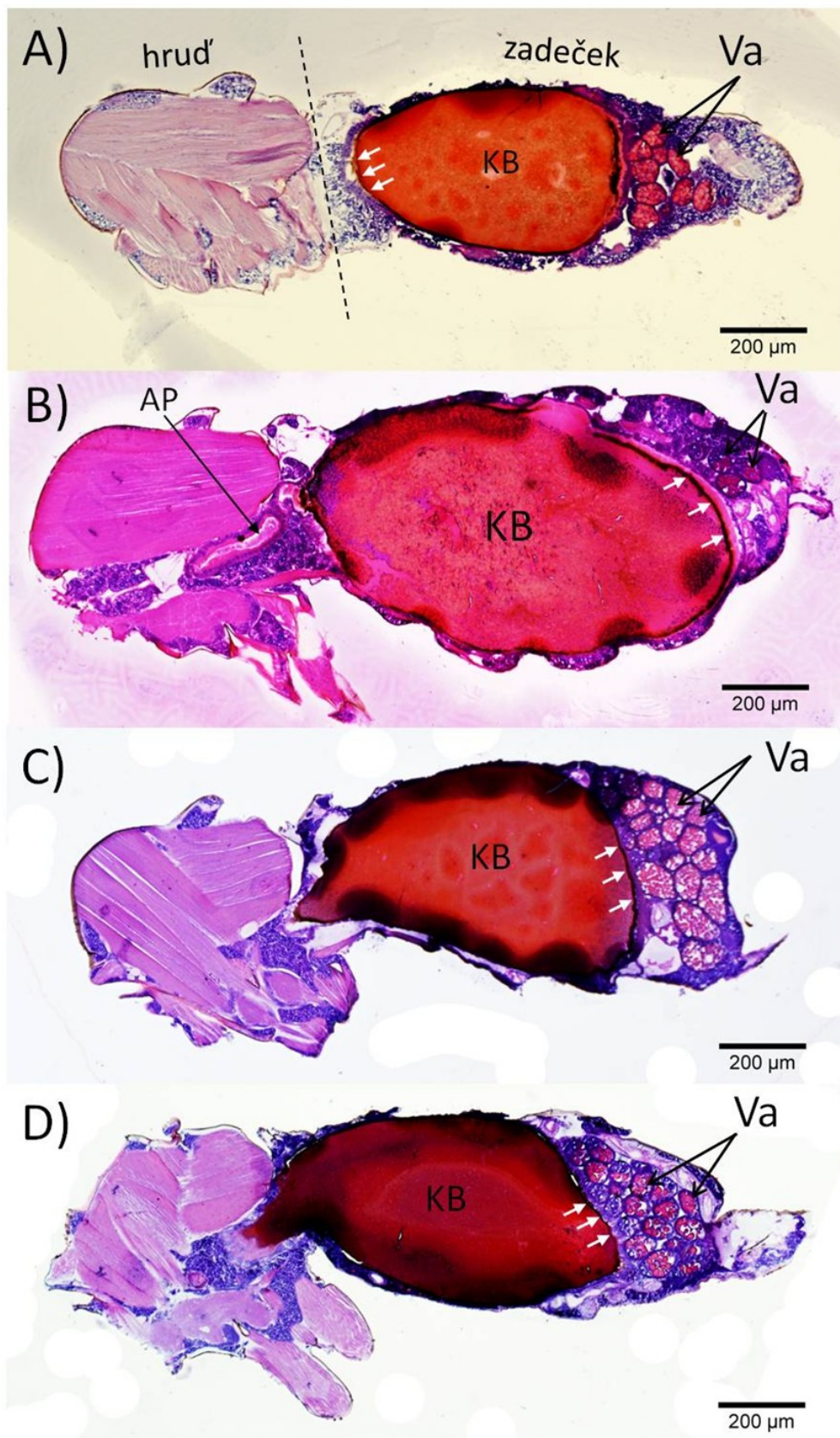
Na posteriorním konci byla PM u všech druhů uzavřena a alespoň u několika jedinců všech čtyř druhů byl na jejím zadním konci detekován tzv. posteriorní tail. Ten také není inkrustována hemem. Inkrustace PM hemem byla plně viditelná na nativních snímcích i na histologických řezech u všech zkoumaných druhů flebotomů ve stejném čase - 24 hod po sání.



Obr. 5 – Fotografie anterimního plugu na nativních snímcích (A, C, E, G) a na histologických preparátech (B, D, F, H). Malé šipky znázorňují PM, velké šipky ukazují na AP. Měřítka na všech snímcích 100 μ m. Na snímcích zachyceny samice flebotomů 24 hod po nasátí v následujícím pořadí: *S. schwetzi* (A, B), *P. argentipes* (C, D), *P. papatasi* (E, F), *P. orientalis* (G, H).



Obr. 6 – Srovnání PM zkoumaných druhů flebotomů na nativních preparátech. Flebotomové na snímcích (*P. papatasi* (A); *P. argentipes* (B); *S. schwetzi* (C), *P. orientalis* (D)) byli nafoceni v čase 24 hodin po sání. Na všech snímcích je zcela zřetelná PM (bílé šipky), která je v čase 24 hod u všech druhů inkrustována hemem, který způsobuje její tmavé zbarvení. Krevní bolus (KB) je uzavřen v PM, na níž ve fyziologickém stavu i přímo navazuje (při pořizování těchto snímků bylo střevo ponecháno ve fyziologickém roztoku, aby se jednotlivé vrstvy od sebe odloučily a byly tak snáze odlišitelné). Na anteriorním konci je patrný anteriorní plug (AP), který není inkrustován hemem a je proto transparentní. Střevo flebotoma je označeno žlutými šipkami. Fotografie byly pořízeny na stereolupě Nikon (SMZ 1270i) metodou focení v zástínu (na tmavém poli, dark field).



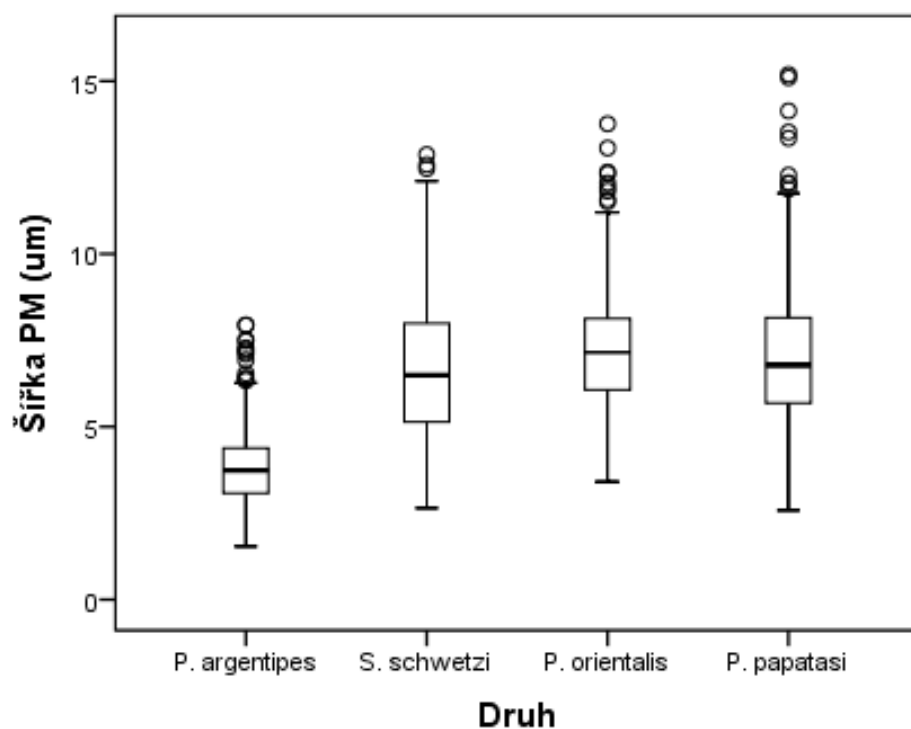
Obr.7 – Srovnání PM zkoumaných druhů flebotomů na histologických řezech (4 – 6 µm silných) u druhů (*P. papatasi* (A); *S. schweztzi* (B); *P. orientalis* (C); *P. argentipes* (D)); zalitých v pryskyřici JB-4 v čase 24 hodin po sání. Všechny druhy flebotomů mají nasátou krev (krevní bolus – KB) vyplněnou většinou zadečku (nejmarkantnější viditelné u *S. schweztzi*) a u všech druhů jsou na řezech vidět vyvíjející se vajíčka (Va). U všech druhů je zřetelně vyvinuta PM (bílé šipky), která je v tomto čase u všech druhů tmavě hnědě zbarvená díky inkrustaci hemem. U *S. schweztzi* je na řezu viditelný i anteriorní plug (AP). Na obr. A) je znázorněno členění těla na hrud' a zadeček (stejně u všech druhů). Hlava všech flebotomů byla oddělena, stejně jako poslední články zadečku, kvůli pronikání fixáže do vnitřku tělčka. Fotografie nafoceny na mikroskopu Olympus (BX-51) s kamerou Olympus (DP-70).

5.1.3 Tloušťka a ultrastruktura peritrofické matrix

Tloušťka PM byla měřena na snímcích z elektronového mikroskopu (TEM) na příčných řezech těly flebotomů. Na základě výše popsané kinetiky PM byl vybrán pro měření čas 48 hod po sání u druhů *S. schwetzi*, *P. orientalis* a *P. papatasi* v a 24 hod po sání u druhu *P. argentipes* (u toho druhu probíhá trávení rychleji a v čase 48h po sání je již PM u značné části samic degradována). Od každého druhu flebotoma bylo naměřeno 400 měření (1 600 pro všechny druhy dohromady).

Z výsledků je zřejmé, že tloušťka PM značně kolísá nejen mezi jednotlivými jedinci v rámci jednoho druhu flebotoma, ale i v rámci jednoho jedince na různých místech měření. Přes tuto individuální a vnitrodruhovou variabilitu byl zjištěn prokazatelný mezidruhový rozdíl - druh *P. argentipes* měl signifikantně tenčí PM než ostatní tři druhy flebotomů ($P < 0,01$, $F = 8,08$, $df = 3$, nested ANOVA) (viz graf 4). To je v souladu s pozorováním během pitev flebotomů, kdy PM u druhu *P. argentipes* byla velice křehká a snadno byla během manipulace poškozena. Ostatní druhy flebotomů se mezi sebou v tloušťce PM nelišily (viz Tab. 1).

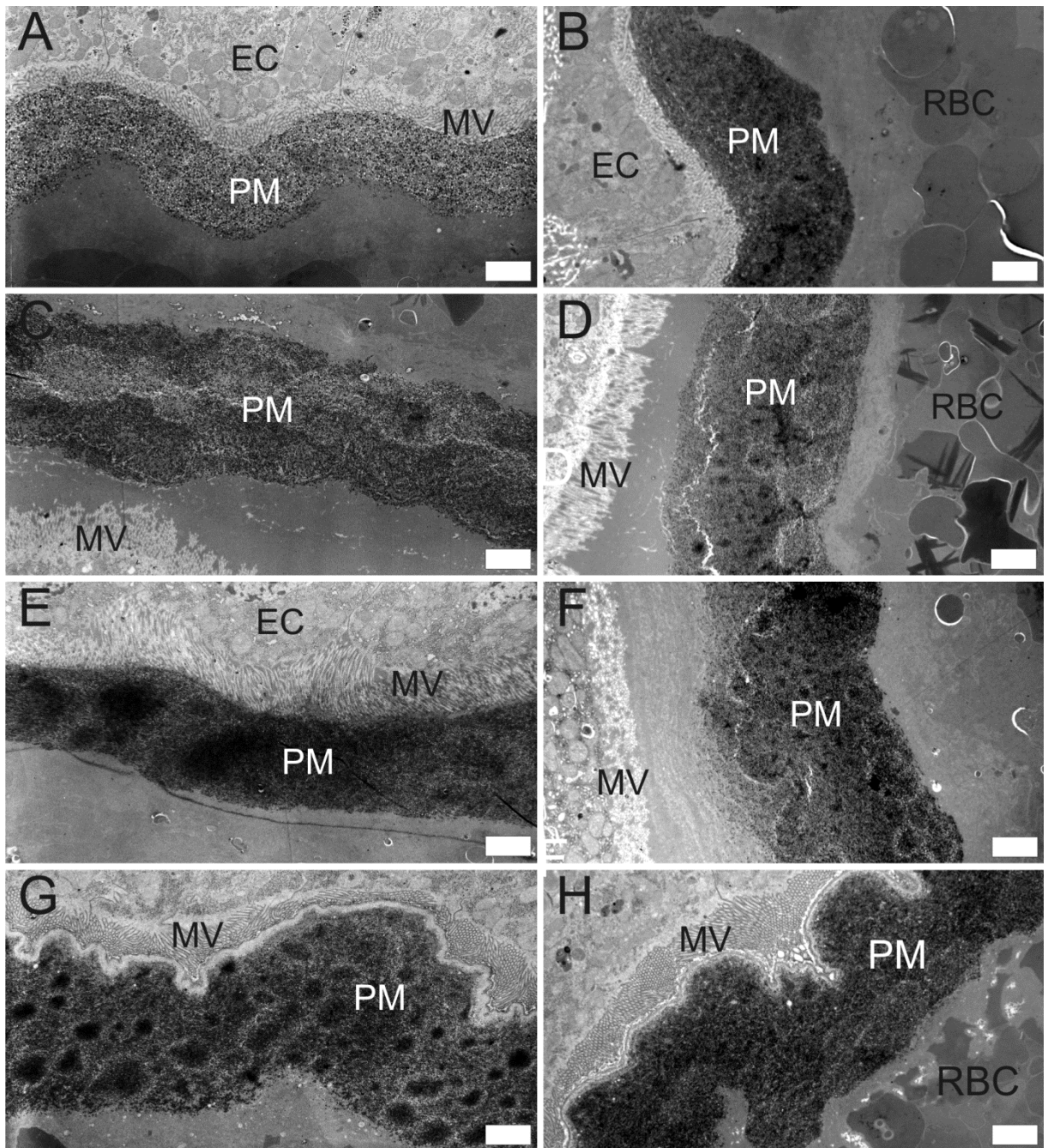
Také ultrastruktura PM druhu *P. argentipes* byla odlišná od PM zbývajících druhů (viz obr. 8). Byla v celé šíři homogenní bez patrných odlišných vrstev. V případě ostatních tří druhů bylo možno odlišit ohraničenou vnější laminární vrstvu a vnitřní amorfní vrstvu. Zatímco u druhu *S. schwetzi* byly tyto vrstvy patrné u všech jedinců a řezů, u *P. papatasi* a *P. orientalis* byla někdy vnější laminární vrstva méně viditelná – hlavně v situaci, kdy PM těsně přiléhala k mikrovilům střevního epitelu.



Graf 4 – Srovnání šířky PM mezi jednotlivými druhy flebotomů. Druhy *S. schwetzi*, *P. orientalis* a *P. papatasi* se mezi sebou statisticky neliší v šířce PM, zatímco druh *P. argentipes* má PM signifikantně tenčí než předchozí druhy ($P < 0,01$). Od každého druhu flebotoma bylo hodnoceno (N) 400 rozměrů.

| Druh flebotoma | No. | Šířka PM | | | Signifikance mezidruhových rozdílů | | | |
|----------------------|-----|----------|--------------------|--------------|------------------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| | | Medián | Průměr (S.D.) (μm) | Rozpětí (μm) | <i>P. argentipes</i> | <i>P. orientalis</i> | <i>S. schwetzi</i> | <i>P. papatasi</i> |
| <i>P. argentipes</i> | 400 | 3.74 | 3.87 (1.11) | 1.54 - 7.94 | - | | | |
| <i>P. orientalis</i> | 400 | 7.39 | 7.22 (1.73) | 3.41 - 13.76 | P = 0,007 | - | | |
| <i>S. schwetzi</i> | 400 | 6.49 | 6.68 (1.97) | 2.65 - 12.87 | P = 0,016 | P = 1,000 | - | |
| <i>P. papatasi</i> | 400 | 6.78 | 7.16 (2.11) | 2.58 - 15.19 | P = 0,007 | P = 1,000 | P = 1,000 | - |

Tab. 1 – Šířka PM čtyř druhů flebotomů. Signifikance mezidruhových rozdílů byla testována metodou nested ANOVA.



Obr. 8 – Ultrastruktura PM čtyř druhů flebotomů na elektron-mikroskopických snímcích příčnými řezy abdominálním mesenteronem. Pole (A a B) – *P. argentipes*; (C a D) – *P. orientalis*; (E a F) – *P. papatasi*; (G a H) – *S. schwetzi*. PM – peritrofická matrix; MV – mikrovily; EC – epitelální buňky střeva; RBC – červené krvinky. Měřítko 2 μ m.

5.2 Vliv chitinázy na přežití leishmanií *in vitro*

Cílem této části bylo ověřit, zda komerčně dostupné chitinázy neovlivňují životaschopnost leishmanií *in vitro*. Protože výsledky pokusů ukázaly, že komerčně dostupné chitinázy mají i ve velmi malých koncentracích (které již nedokážou rozrušit PM) na leishmanie letální efekt, začali jsme hledat alternativní zdroj chitinázy, kterým se nakonec stala entomofágní houba *Beauveria bassiana*. Chitináza z této houby neovlivňuje růst ani vitalitu leishmanií a byla tedy použita k experimentálnímu rozrušení PM flebotomů.

5.2.1 Vliv komerčně dostupných chitináz na přežití leishmanií *in vitro*

5.2.1.1 Vliv chitinázy ze *Streptomyces griseus* na *Leishmania major* *in vitro*

V tomto experimentu byla do 200 μ l kultury leishmanií v médiu (či krvi) s počáteční koncentrací 1×10^6 /ml přidána chitináza v níže uvedených finálních koncentracích a byl sledován její efekt po 24 hodinách kultivace.

Chitináza ze *S. griseus* měla vliv na přežití *L. major* ve všech zkoumaných koncentracích. U buněk v médiu došlo ve vyšších koncentracích (od 0,6 U/ml) k úhynu všech leishmanií a i v nejmenších koncentracích (0,07 U/ml) došlo k poklesu počtu buněk (99% pokles oproti kontrole). Množily se pouze leishmanie v kontrolních jamkách, kde bylo místo chitinázy přidáno čisté PBS. Efekt chitinázy na leishmanie v krvi je těžko hodnotitelný, protože došlo k poklesu počtu buněk i v příslušných kontrolních jamkách (krev s PBS). Samotná přítomnost krve tedy měla na množení leishmanií negativní vliv (viz tab. 2).

| Uspořádání pokusu | Koncentrace přidané chitinázy | Koncentrace kultury |
|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| Chitináza + médium | 2,50 U/ml | X |
| | 1,20 U/ml | X |
| | 0,60 U/ml | X |
| | 0,30 U/ml | $2,0 \times 10^5$ / ml |
| | 0,15 U/ml | $1,0 \times 10^5$ / ml |
| | 0,07 U/ml | $1,0 \times 10^5$ / ml |
| Chitináza + inaktivovaná krev | 2,50 U/ml | $1,0 \times 10^5$ / ml |
| | 1,20 U/ml | $1,0 \times 10^5$ / ml |
| | 0,60 U/ml | $1,0 \times 10^5$ / ml |
| | 0,30 U/ml | $3,0 \times 10^5$ / ml |
| | 0,15 U/ml | $5,0 \times 10^5$ / ml |
| | 0,07 U/ml | $2,0 \times 10^5$ / ml |

| | | |
|----------|----------------|---------------------------|
| | | |
| Kontrola | médium + PBS | 8,0 x10 ⁶ / ml |
| | | 9,3 x10 ⁶ / ml |
| | krev in. + PBS | 4,2 x10 ⁵ / ml |
| | | 4,0 x10 ⁵ / ml |

Tab. 2 – Vliv jednotlivých koncentrací chitinázy *S. griseus* na *L. major*. Krev in. – inaktivovaná králičí krev. Symbol „X“ označuje absenci leishmanií.

5.2.1.2 Vliv chitinázy z *Trichoderma viride* na *Leishmania major* in vitro

Také další komerčně dostupná chitináza z *T. viride* negativně ovlivňovala růst a přežití *L. major* ve všech zkoumaných koncentracích. V těch nejvyšších koncentracích (2.5 a 1.2 U/ml) měla letální efekt, v nižších koncentracích došlo k poklesu počtu buněk oproti kontrolám (až 87% pokles). K normálnímu růstu kultur docházelo opět pouze v kontrolních jamkách (viz tab. 3). Vzhledem k výsledkům pokusu s chitinázou ze *S. griseus* již nebyl vliv této chitinázy na leishmanie testován v krvi.

| Uspořádání pokusu | Koncentrace přidané chitinázy | Koncentrace kultury |
|--------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Chitináza + médium | 2,50 U/ml | X |
| | 1,20 U/ml | X |
| | 0,60 U/ml | 3,0 x10 ⁵ / ml |
| | 0,30 U/ml | 4,0 x10 ⁵ / ml |
| | 0,15 U/ml | 8,0 x10 ⁵ / ml |
| | | |
| Kontrola | médium + PBS | 7,0 x10 ⁶ / ml |
| | | 6,2 x10 ⁶ / ml |

Tab. 3 – Vliv jednotlivých koncentrací chitinázy *T. viride* na *L. major*. Symbol „X“ označuje absenci leishmanií.

5.2.1.3 Vliv komerčně dostupných chitináz na přežití jiných prvoků in vitro

Vzhledem k výsledkům pokusů vlivu komerčně dostupných chitináz na *L. major*, jsme se rozhodli jejich vliv otestovat i na jiných jednobuněčných organismech. Zajímalo nás, zda je chitináza letální pouze pro leishmanie a nebo i pro jiné prvoky.

Chitináza ze *S. griseus* ve všech zkoumaných koncentracích ovlivňovala růst kultury *T. vaginalis*. Nedošlo sice k úplnému zabití prvoků, ale k výraznému zpomalení jejich růstu oproti kontrole (až 95% pokles) (viz tab. 4).

| Uspořádání pokusu | Koncentrace přidané chitinázy | Koncentrace kultury |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Chitináza + médium | 1,00 U/ml | $2,0 \times 10^6$ / ml |
| | 0,50 U/ml | $1,2 \times 10^6$ / ml |
| | 0,25 U/ml | $2,4 \times 10^6$ / ml |
| | 0,12 U/ml | $8,9 \times 10^6$ / ml |
| | 0,06 U/ml | $7,5 \times 10^6$ / ml |
| Kontrola | médium + PBS | $4,12 \times 10^7$ / ml |
| | | $4,36 \times 10^7$ / ml |

Tab. 4 – Vliv jednotlivých koncentrací chitinázy *S. griseus* na *T. vaginalis*.

Chitináza z *T. viride* měla vliv na přežití *T. brucei brucei* ve všech zkoumaných koncentracích, kde v těch nejvyšších (2.5 a 1.2 U/ml) došlo k úhynu všech trypanosom a i v nejmenších koncentracích (0,15 U/ml) došlo k velkému vlivu na jejich růst oproti kontrolám (až 65% pokles) (viz tab. 5).

| Uspořádání pokusu | Koncentrace přidané chitinázy | Koncentrace kultury |
|--------------------|-------------------------------|------------------------|
| Chitináza + médium | 2,50 U/ml | X |
| | 1,20 U/ml | X |
| | 0,60 U/ml | $3,0 \times 10^5$ / ml |
| | 0,30 U/ml | $1,5 \times 10^6$ / ml |
| | 0,15 U/ml | $3,5 \times 10^6$ / ml |
| Kontrola | Médium + PBS | $1,0 \times 10^7$ / ml |
| | | $1,0 \times 10^7$ / ml |

Tab. 5 – Vliv jednotlivých koncentrací chitinázy *T. viride* na *T. brucei brucei*.
Symbol „X“ označuje absenci trypanosom.

5.2.2 Hledání alternativního zdroje chitinázy

Chitinázová aktivita byla testována u čtyř druhů hub. Houby byly kultivovány v tekutém médiu dle Suresh a Chandrasekaran (1999) (upraveno) za stálého třepání při pokojové teplotě po dobu 1 až 2 týdnů. Po této době byla změřena chitinázová aktivita v odebraném supernatantu (viz tab. 6).

| Druh houby | 1 týden kultivace | 2 týdny kultivace |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| <i>Beauveria bassiana</i> | 0,03 U/ml | 0,2 U/ml |
| <i>Lecanicillium muscarium</i> | 0,03 U/ml | 0,1 U/ml |
| <i>Isaria farinosa</i> | 0,03 U/ml | 0,03 U/ml |
| <i>Isaria fumosorosea</i> | 0,03 U/ml | 0,05 U/ml |

Tab 6 – Množství vyprodukované chitinázy u jednotlivých druhů zkoumaných hub.

Produkce chitinázy je také závislá na použitém médiu a proto byla chitinázová aktivita u druhu *B. bassiana* (druh s největší chitinázovou produkcí) změřena i v médiu SAB (viz kap. 4), ve kterém je běžně ve sbírkách hub pěstována. Již po prvním týdnu kultivace však došlo k výraznému rozdílu mezi tímto médiem a médiem dle Suresh a Chandrasekaran (1999) a to jen 5% produkce chitinázy v médiu SAB.

V prvním týdnu od začátku kultivace se naměřené hodnoty chitinázové aktivity v médiu dle Suresh a Chandrasekaran (1999) u jednotlivých druhů nelišily. Ve druhém týdnu však došlo k výraznému nárůstu chitinázové aktivity u druhu *L. muscarium* a ještě výraznějšímu u *B. bassiana*, která proto byla vybrána jako nejvhodnější druh pro produkci chitinázy.

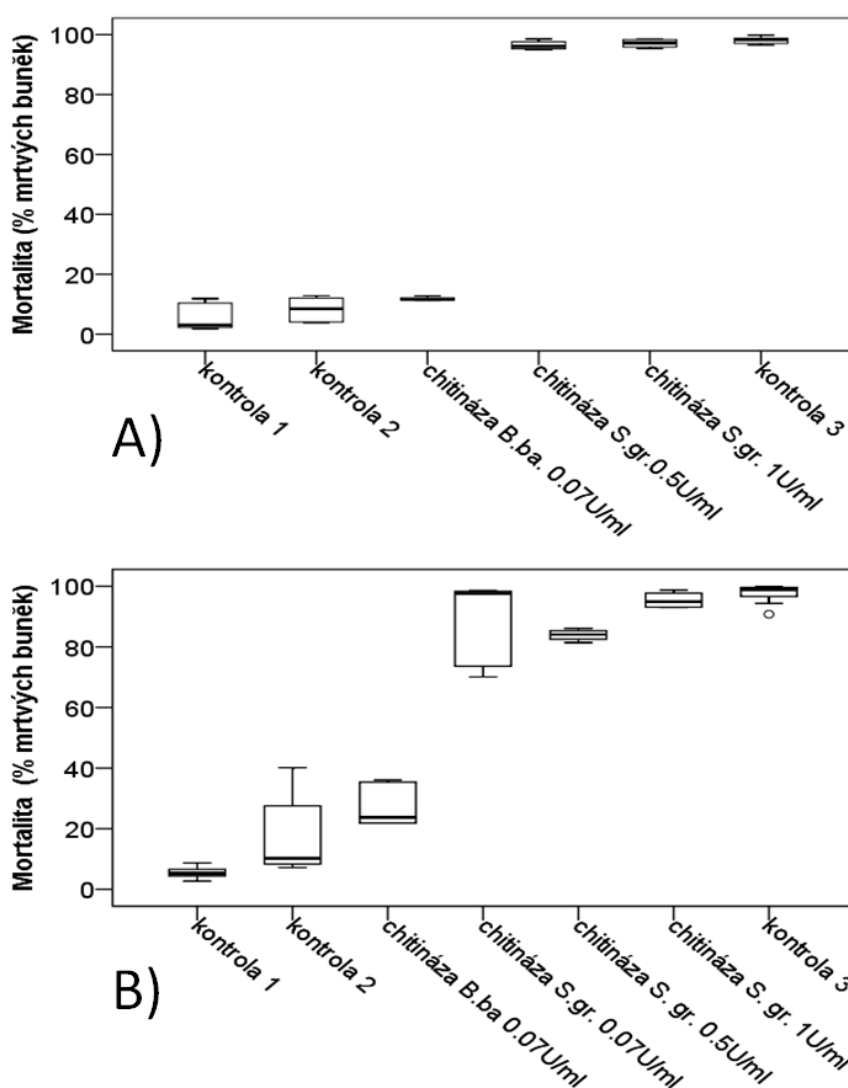
5.2.3 Vliv chitinázy *B. bassiana* na přežití leishmanií *in vitro* s využitím metody FACS

Hlavním cílem pokusů bylo ověřit, zda chitináza z *B. bassiana* nemá signifikantní vliv na mortalitu leishmanií a zároveň potvrdit letální vliv komerční chitinázy ze *S. griseus* na *leishmanie* mnohem citlivější a přesnější metodou.

Mortalita způsobená supernatantem z *B. bassiana* (výsledná konc. chitinázy 0,07 U/ml) se nelišila signifikantně od hodnot kontroly bez chitinázy ani u jedné z leishmanií (viz graf 5) ($P = 0.505$ pro *L. major* a $P = 0.559$ pro *L. donovani*, ANOVA, Tukey Post Hoc Test). Tato chitináza proto byla použita v této koncentraci pro následující infekční pokusy se *S. schwetzi*. Naopak komerčně dostupná chitináza ze *S. griseus* měla letální efekt na *leishmanie* stejně jako v kultivačních pokusech. Ve všech testovaných koncentracích způsobila mortalitu tak vysokou, že se statisticky nelišila od mortality způsobené 1% roztokem formaldehydu (negativní kontrola označená jako kontrola 3 v grafu 5 ($P > 0.05$)).

u obou druhů leishmanií a všech testovaných koncentracích (ANOVA, Tukey Post Hoc Test).

Vliv chitinázy z *B. bassiana* byl testován i v krvi, ovšem stejně jako v případě kultivačních pokusů (kapitola 5.2.1) i zde měla velký letální účinek na přežití obou druhů leishmanií i příslušná kontrola – samotná krev bez chitinázy (94% mortalita pro *L. donovani* a 98% mortalita pro *L. major*). V případě naředění krve jakoukoli jinou tekutinou byl tento letální efekt samotné krve oslaben. Pro sledovaný účel tedy tyto pokusy nejsou použitelné, protože nelze s jistotou odlišit efekt samotné chitinázy ředěné v krvi na přežití leishmanií od účinku letálního efektu samotné krve.



Graf 5 – Mortalita leishmanií při použití chitináz ze *S. griseus* (*S.gr.*) a *B. bassiana* (*B. ba.*) *in vitro*. Na poli A) *L. donovani* a na poli B) *L. major*. Výsledky získané metodou FACS. Pro každou kombinaci byl pokus opakován alespoň 3 krát. Kontrola 1 – médium pro kultivaci leishmanií; kontrola 2 – médium pro kultivaci leishmanií s médiem pro kultivaci *B. bassiana* (poměr 1:1); kontrola 3 – leishmanie usmrcené v 1% roztoku formaldehydu.

5.3 Experimentální rozrušení peritrofické matrix *S. schwetzi*

V následujících experimentech jsme se pokusili porušit integritu PM uvnitř střeva flebotoma a to nejprve mechanicky, poté pomocí chitinázy aplikované v cukerném roztoku. Takto by došlo zpočátku k normální tvorbě PM, její integrita by byla narušena až několik dní po sání krve. Tento postup by simuloval fyziologický proces rozpadu PM uvnitř střeva flebotoma. Jelikož tyto metody v praxi nefungovaly, přešli jsme na jediný zbývající možný způsob rozrušení PM – podání chitinázy spolu se sátou krví.

5.3.1 Mechanické rozrušení PM

Narušení PM jsme nejprve zkoušeli jemným stlačením zadečku nasátých samic 24 – 48 hod po sání krve. Ovšem i jemné stlačení způsobilo velkou mortalitu samic (~90 %). Proto jsme od této metody upustili.

5.3.2 Rozrušení PM chitinázou podanou v cukerném roztoku

Další použitou metodou bylo podání chitinázy pomocí cukerného roztoku, kterým se dospělci flebotomů běžně živí. Abychom zjistili, zda jsou samice ochotny sát cukr do 48h po nasátí krve, podali jsme jim cukr značený modrým barvivem.

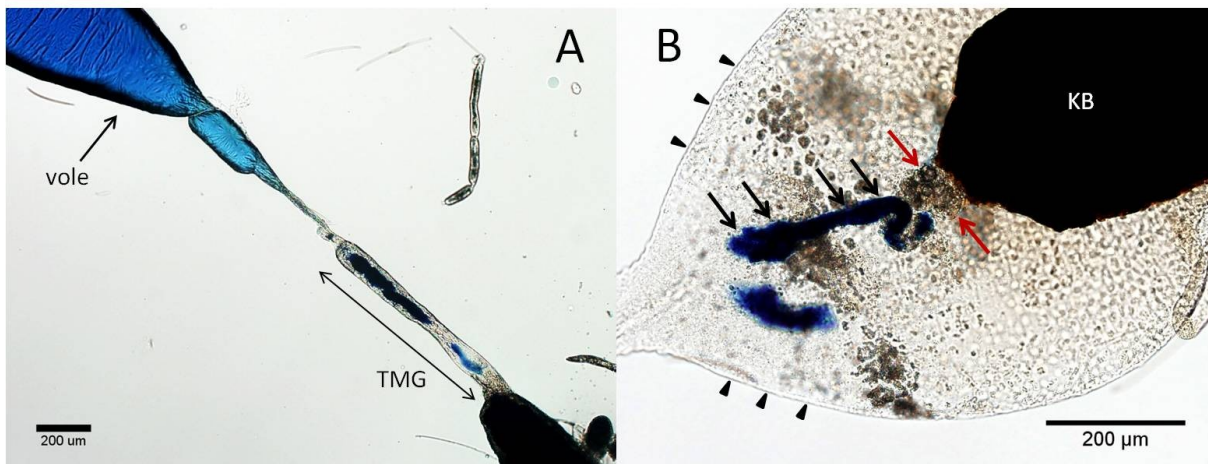
Z výsledků tohoto pokusu je zřejmé, že samice flebotomů jsou ochotny sát cukr 24 hod i 48 hod po nasátí krve jen ve velmi malém procentu (1 – 8 %) (viz tab. 7). Pokud samice cukr nasály, bylo modré barvivo pozorováno nejen ve voleti, ale i v thorakálním mesenteronu (až po oblast přechodu thorakálního a abdominálního mesenteronu uzavřenou anteriorním plugem) (viz obr. 9).

Přesto jsme se pokusili samicím podat touto cestou chitinázu, naředěnou v cukerném roztoku do koncentrace 1 U/ml. Bohužel, cukr přijala pouze jediná samice (1 %) (viz tab. 7), u které nebyl vidět žádný vliv chitinázy na PM. Proto ani tato metoda podání chitinázy nebyla dále používána.

| Cukr | Cukr přidán | Kontrolní pítva | Samice s cukrem* | N |
|-------------------------------|--------------------|------------------------|-------------------------|----------|
| bez chitinázy (pouze cukr) | 24 hod po sání | 48 hod po sání | 8 % | 112 |
| | 48 hod po sání | 72 hod po sání | 1 % | 100 |
| | | | | |
| s chitinázou | 24 hod PBM | 48 hod PBM | 1 % | 100 |

*procento nevydefekovaných samic, které měly ve voleti nasátý značený cukr

Tab. 7 – Procento samic, které nasály značený cukr (s chitinázou či bez chitinázy) ve výše uvedených časech po sání krve.



Obr. 9 – Flebotomové, kteří nasáli modře značený cukr, byli vypitváni 48 hodin po sání. Na obrázku A) je vidět vole naplněné značeným cukrem a zakonzentrované barvivo v thorakálním mesenteronu (TMG) v přirozeném stavu. Na poli B) je detail nahromaděného barviva (černé šipky), které doputovalo až k anteriornímu plugu (červené šipky), přes který neprošlo dál do střeva. Uvnitř střeva (černé trojúhelníky) je krevní bolus (KB) obalený tmavou PM (nevyznačeno). Tento preparát byl ponechán několik minut ve fyziologickém roztoku, proto se střevní epitel roztáhl a AP již nevyplňuje přechod mezi abdominální a thorakální částí mesenteronu.

5.3.3 Rozrušení PM chitinázou podanou v krvi

V následujících pokusech byl vyzkoušen vliv všech dostupných chitináz na tvorbu PM u *S. schwetzi*. Kontrolní pitvy byly provedeny 24 hod po sání a porušení PM bylo sledováno optickým mikroskopem.

Komerční chitinázy ze *S. griseus* a *T. viride* byly ze zásobního roztoku (25 U/ml) naředěny do inaktivované krve do finální koncentrace 1,25 U/ml (koncentrace používaná pro porušení integrity PM jinými autory) (Pimenta et al. 1997, Filho et al. 2002) a 0,125 U/ml (koncentrace, která neměla zcela letální vliv na leishmanie v našich předchozích pokusech)

U chitinázy z *B. bassiana* bylo nutno použít co nejmenší ředění v krvi, protože už její výchozí koncentrace získaná kultivací hub byla poměrně nízká (0,14 U/ml). Zakonzentrovaný supernatant z *B. bassiana* byl smíchán s inaktivovanou krví v poměru 1:1 a v poměru 9:1 pro ověření, zda jsou samice *S. schwetzi* ochotny tuto směs nasát (bylo popsáno, že samice *P. duboscqi* jsou ochotny sát 5% krev ve fyziologickém roztoku (Pruzinova et al. 2013)). Pro ověření, zda vliv na PM by nebyl způsoben jen naředěním nasáté krve, byla v poslední sérii pokusů inaktivovaná krev smíchána v poměru 1:1 s fyziologickým roztokem.

| Zdroj a koncentrace chitinázy | N samic s poškozenou PM (%) | N nasátých samic |
|-------------------------------|-----------------------------|------------------|
| <i>S. griseus</i> | | |
| Chit. 1,25 U/ml | 6 (50) | 12 |
| Chit. 0,125 U/ml | 0 | 13 |
| Kontrola (krev) | 0 | 10 |
| <i>T. viride</i> | | |
| Chit. 1,25 U/ml | 0 | 13 |
| Chit. 0,125 U/ml | 0 | 12 |
| Kontrola (krev) | 0 | 10 |
| <i>B. bassiana</i> | | |
| Chit 9 : 1 krev | 0 | 0 |
| Chit 1 : 1 krev | 23 (88) | 26 |
| Kontrola (krev) | 0 | 15 |
| <i>B. bassiana</i> | | |
| Fyz. roz. 1 : 1 krev | 1(5) | 22 |
| Chit 1 : 1 krev | 23 (100) | 23 |
| Kontrola (krev) | 0 | 20 |

Tab. 8 – Počet samic s porušenou PM po použití všech dostupných druhů chitináz. Chit – chitináza, Fyz. roz. – fyziologický roztok.

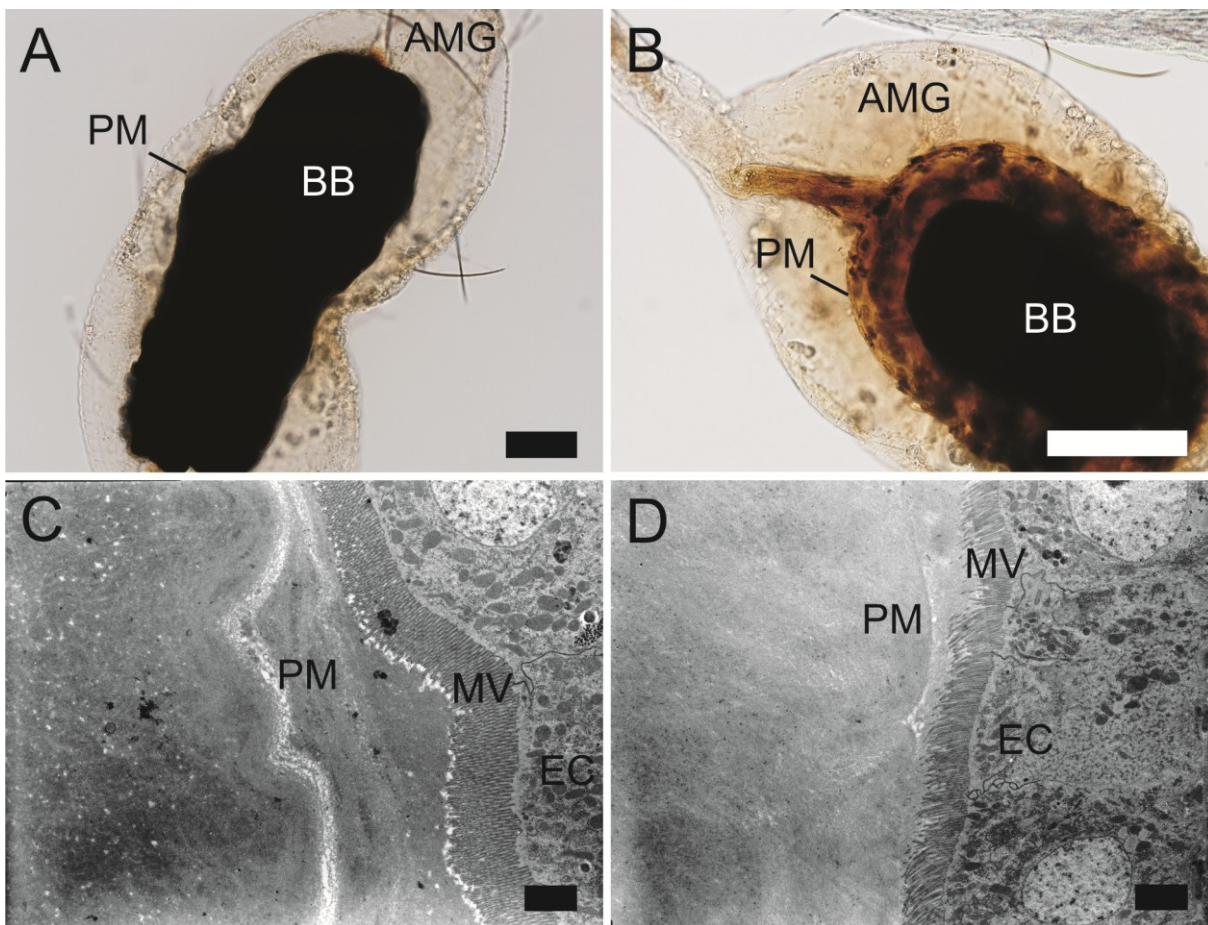
Obě dvě komerčně dostupné chitinázy bohužel v koncentracích, které působily nižší mortalitu leishmanií v *in vitro* pokusech (0,125 U/ml), nedokázaly degradovat PM flebotomů (viz tab. 8). Chitináza z *T. viride* neměla vliv na PM ani ve vyšší použité koncentraci (1,25 U/ml). Naproti tomu u chitinázy *S. griseus* došlo v této vyšší koncentraci k porušení PM u 50 % samic.

Při použití chitinázy z *B. bassiana* došlo k porušení PM u téměř 90% jedinců, přestože koncentrace byla jen 0,07 U/ml (viz tab. 8). Tato koncentrace vznikla smícháním zásobního roztoku (koncentrovaný supernatant z kultury hub o koncentraci 0,14U/ml) v poměru 1:1 s krví. Vyšší koncentrace chitinázy nebylo možné dosáhnout, protože při vyšším ředění krve samice *S. schwetzi* odmítaly z krmítka sát.

Chitináza z *B. bassiana* způsobila změny vzhledu i funkčnosti PM. Ta byla oproti kontrolní skupině slabší a více transparentní, ačkoliv i zde byly přítomny tmavé oblasti zbarvené inkrustací hemem (viz obr. 10). V abdominálním mesenteronu byly u samic

s aplikací chitinázy viditelné erythrocyty, které byly znakem porušení celistvosti PM. Ačkoliv byla PM slabá a více propustná, byla ve střevě flebotomů přítomna po delší čas (často až do 10. dne po sání), což korelovalo s prodlouženou defekací v této skupině (podrobněji rozvedeno v následující kapitole).

Na poškození PM nemělo přitom vliv samotné ředění krve, protože u skupiny, která sála krev ředěnou fyziologickým roztokem ve stejném poměru 1:1, nedošlo téměř k žádnému viditelnému efektu na PM.



Obr. 10 – Odlišnosti v morfologii a ultrastruktuře PM u flebotoma *S. schwetzi* u kontrolní skupiny (A a C) a skupiny ošetřené chitinázou (B a D) na nativních snímcích (3 dny po sání) (A a B) a elektron-mikroskopických snímcích příčnými řezy abdominálním mesenteronem flebotomů (2 dny po sání) (C a D). U kontrolní skupiny sáté na směsi krve a média pro kultivaci *B. bassiana* (1:1) je PM přítomna, na poli A) viditelně inkrustována hemem a na poli C) je PM zřetelně viditelná a v její ultrastruktuře jsou patrné jednotlivé vrstvy. U skupiny sáté na směsi krve a supernatantu s chitinázou *B. bassiana* (0,07 U/ml) je na poli B) zřetelně vidět slabší inkrustace hemem oproti kontrolní skupině a na poli D) je patrný pouze náznak PM bez zřetelné vnitřní ultrastrukтуры. AMG – abdominální mesenteron; BB – krevní bolus; PM – peritrofická matrix; MV – mikrovily; EC – epitelální buňky střeva. Měřítka (A a B) 100 μ m; (B a D) 2 μ m.

5.4 Vliv experimentálního rozrušení PM na vývoj leishmaniových infekcí v *S. schwetzi*

V následujících pokusech jsme za pomoci experimentálního sání nejenom rozrušili PM jako v předchozí kapitole, ale zároveň infikovali flebotomy leishmaniami. V průběhu následujících pítév jsme pozorovali, jaký vliv bude mít toto porušení PM na vývoj leishmanií ve střevě flebotoma *S. schwetzi*.

5.4.1 Experimentální infekce flebotomů leishmanií *L. major* s přidáním chitinázy ze *S. griseus*

I přes výsledky *in vitro* pokusů, kdy chitináza ze *S. griseus* v koncentracích porušujících PM zabíjela leishmanie v kultuře, jsme tuto chitinázu zkusili použít u samic flebotomů experimentálně nakažených leishmaniami s nadějí, že *in vivo* bude letální efekt chitinázy slabší.

Již druhý den po nasátí docházelo u skupin, které sály krev s chitinázou, k úhynu téměř všech leishmanií. Pátý den po infekčním sání byly téměř všichni flebotomové vydefekovány a v žádné samici, která sála krev s chitinázou, nebyly leishmanie přítomny. V kontrolní skupině byly leishmanie uvnitř krevního bolu u jedné nevydefekované samice (viz tab. 9). Z výsledků je tedy patrné, že v *in vivo* podmínkách byl efekt této chitinázy na leishmanie stejně letální, jako v pokusech *in vitro*.

| 2. den po sání | N defekovaných samic(%) | N infikovaných samic (%) | N nasátých samic |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Chit. 1U/ml | 0 | 1(8) | 12 |
| Chit. 2U/ml | 0 | 0 | 12 |
| Kontrola | 0 | 12 (92) | 13 |
| 5. den po sání | | | |
| Chit. 1U/ml | 19 (95) | 0 | 20 |
| Chit. 2U/ml | 20 (100) | 0 | 20 |
| Kontrola | 19 (95) | 1 | 20 |

Tab 9 – Počet infikovaných samic den 2 a den 5 po experimentálním nakažení *L. major* s různou koncentrací chitinázy *S. griseus*. Chit. – chitináza.

5.4.2 Experimentální infekce flebotomů leishmanií *L. major* a *L. donovani* s přidáním chitinázy *B. bassiana*

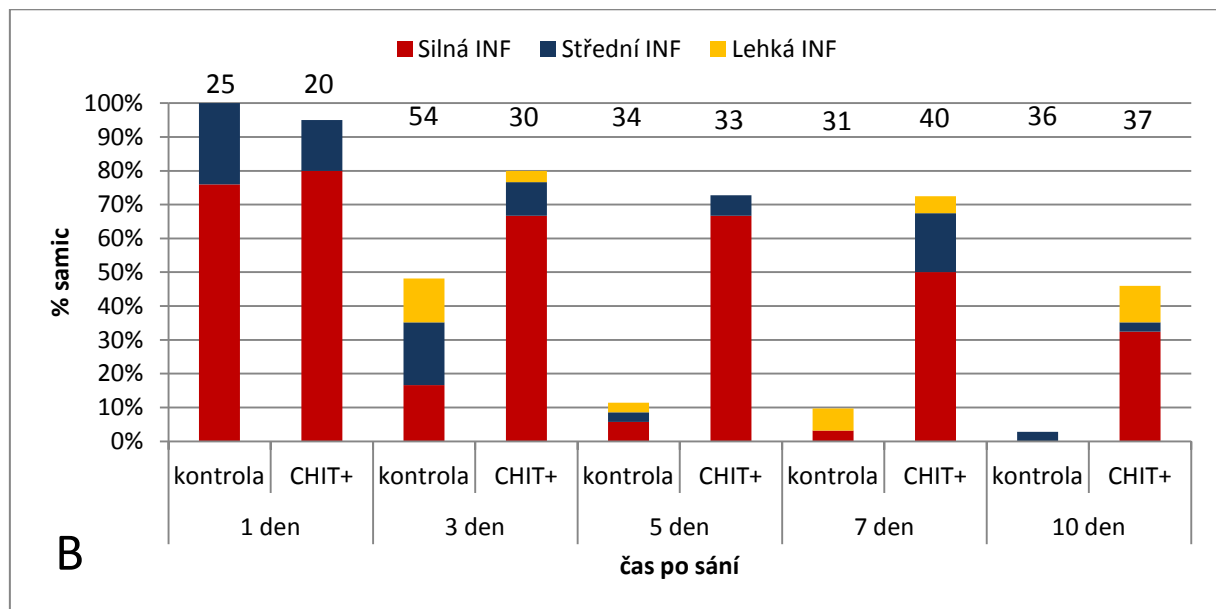
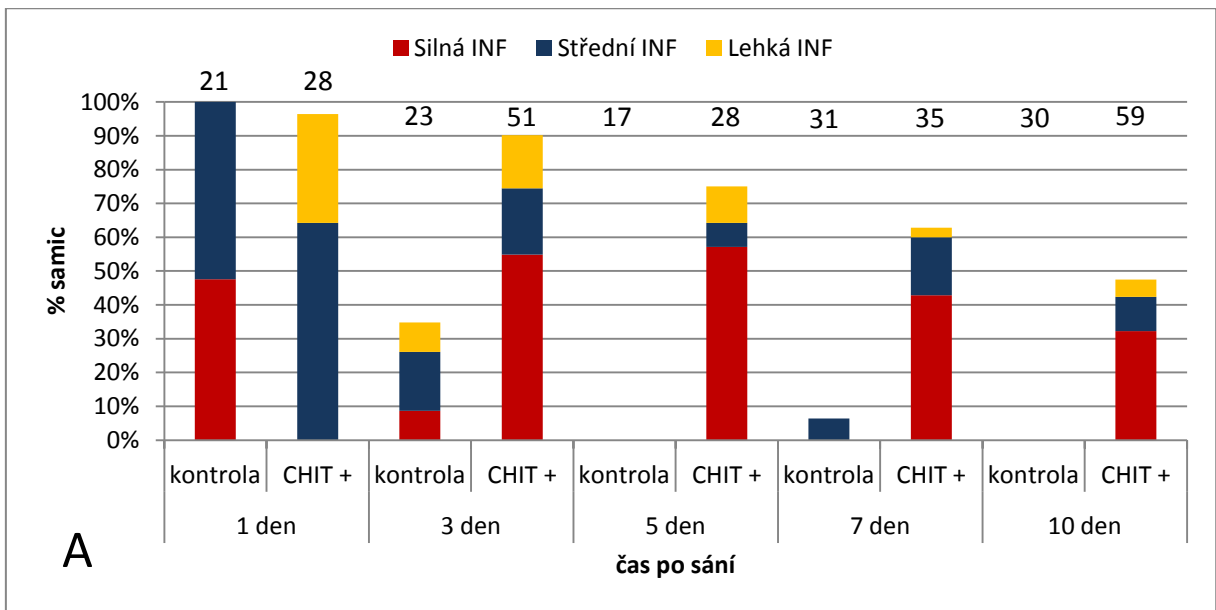
Samice flebotomů *S. schwetzi* byly nakaženy leishmaniemi (*L. major* a *L. donovani*) v krvi smíchané v poměru 1:1 se zakoncentrovaným supernatantem z kultury *B. bassiana* obsahujícím 0.07 U/ml chitinázy. Intenzita infekce, lokalizace infekce a defekace flebotomů byly zjišťovány v různých časových intervalech až do dne 10 po sání.

Přidání chitinázy mělo jednoznačně pozitivní vliv na vývoj obou druhů leishmanií, které byly díky narušení PM schopny vymigrovat z endoperitrofického prostoru a kolonizovat střevo fleboma. Leishmanie migrovaly z abdominálního mesenteronu do thorakálního mesenteronu a byly dokonce schopny kolonizovat stomodeální valvu ve 12 % samic nakažených *L. donovani* a ve 36 % nakažených *L. major* v den 10 po sání (viz graf 6 a 7 a obr. 11 a 12).

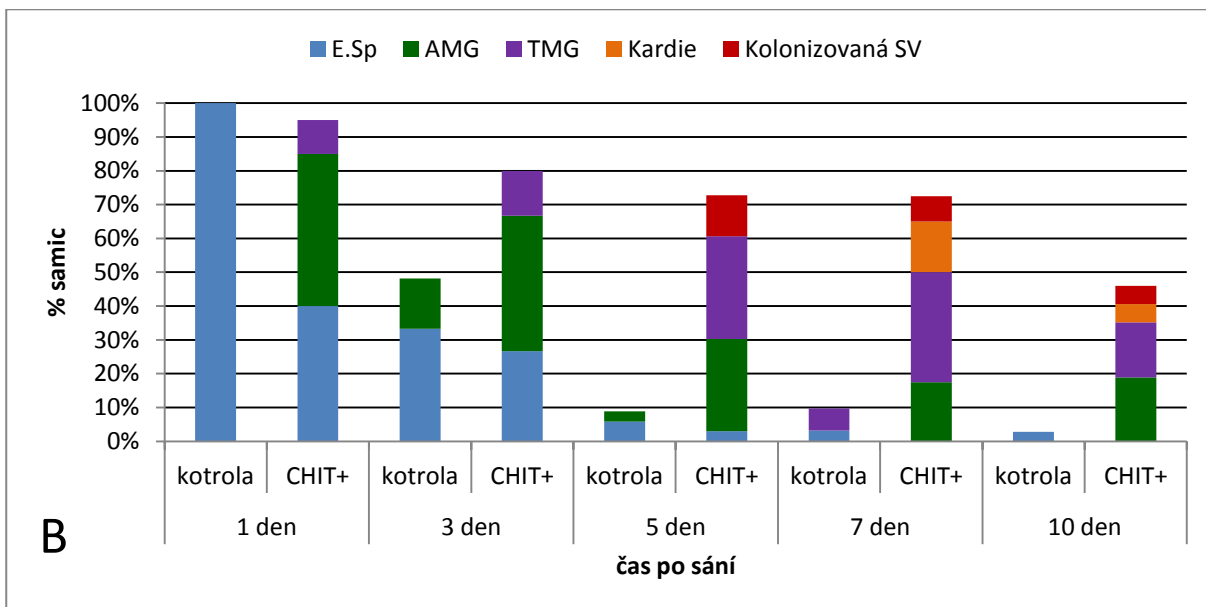
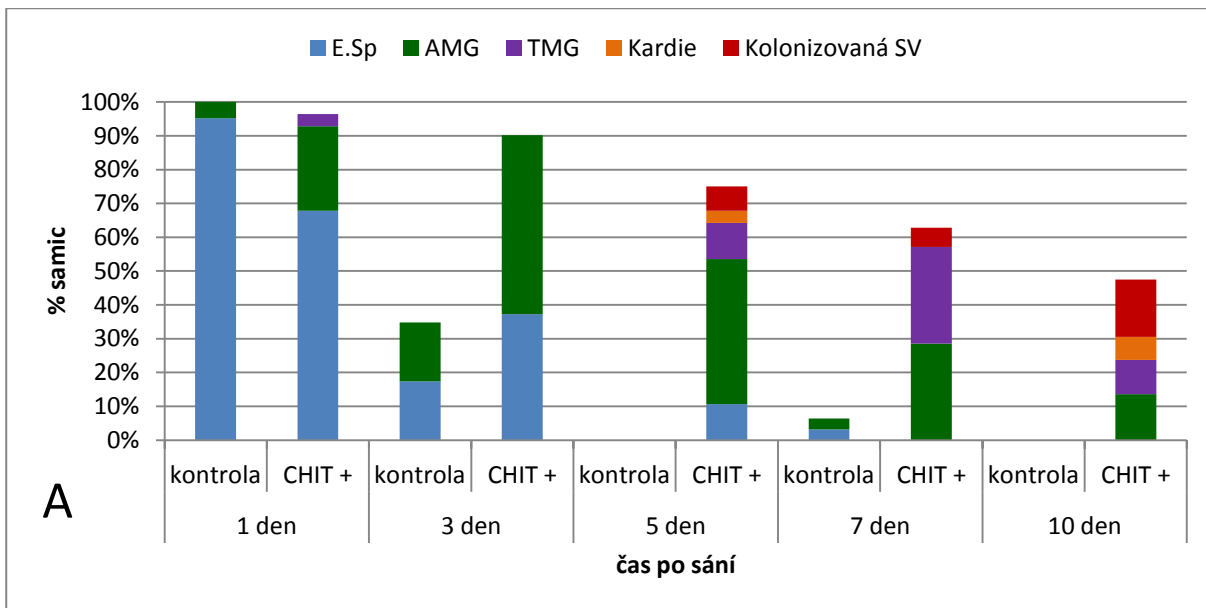
S postupujícím časem po sání však klesalo procento infikovaných samic a to z více než 90 % první den po sání až na 46 % u skupiny nakažené *L. donovani* a 47 % u skupiny nakažené *L. major* 10. den po sání.

Leishmanie byly schopny přežít uvnitř střeva i po defekaci flebotoma a to až v 58% u samic nakažených *L. donovani* (den 7 po sání) a až v 56 % u samic nakažených *L. major* (den 5 po sání) (viz graf 8). Ovšem i u vydefekovaných samic jsme pozorovali trend poklesu procenta infikovaných samic, tento trend tedy nebyl způsoben pouhou defekací flebotoma.

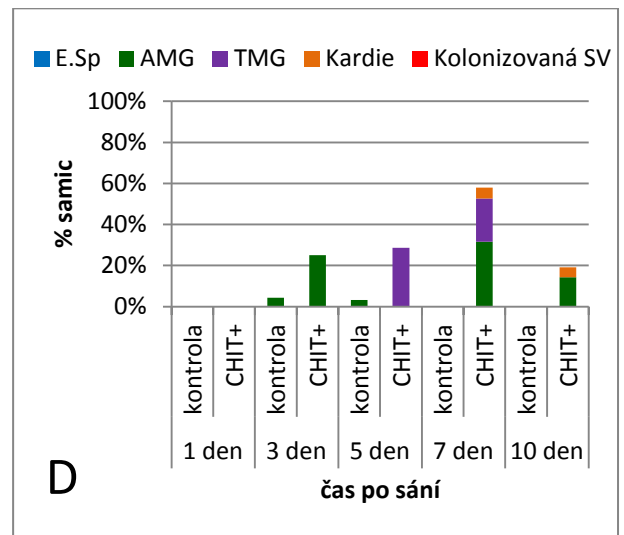
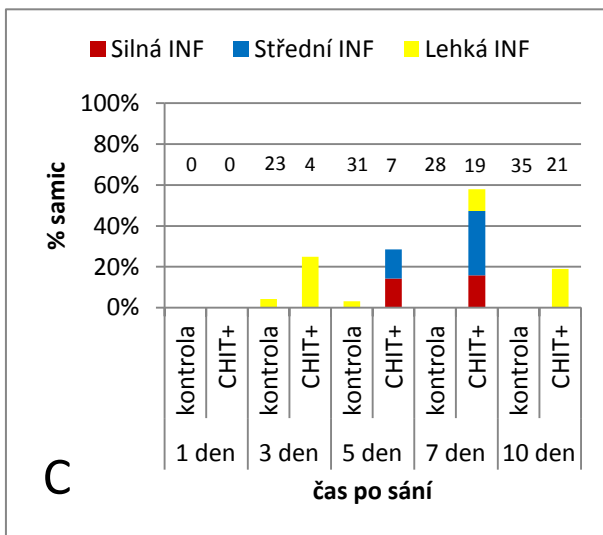
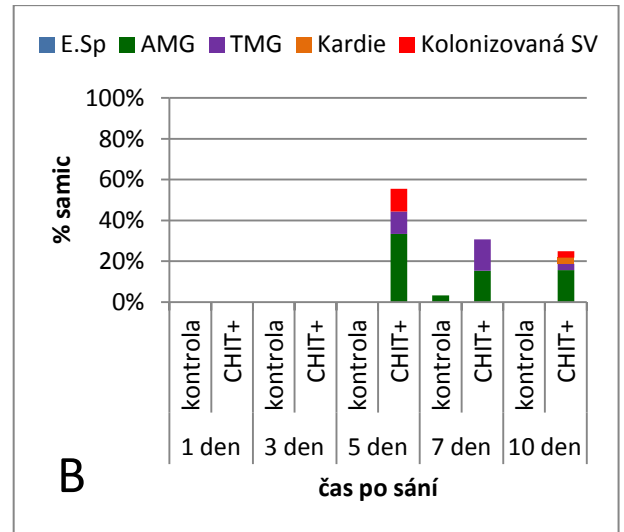
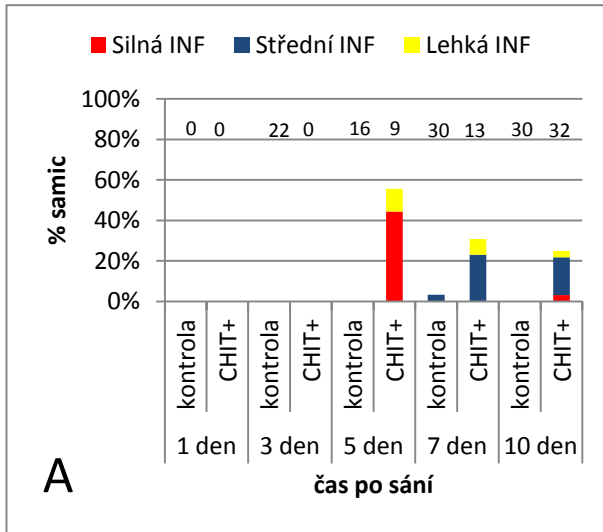
Samotná defekace samic flebotomů s přidanou chitinázou byla oproti kontrole opožděna a i v den 10 bylo v chitinázových skupinách stále nevydefekovaných 57 % samic u skupiny infikované *L. donovani* a 43 % samic u skupiny infikované *L. major* (viz graf 9).



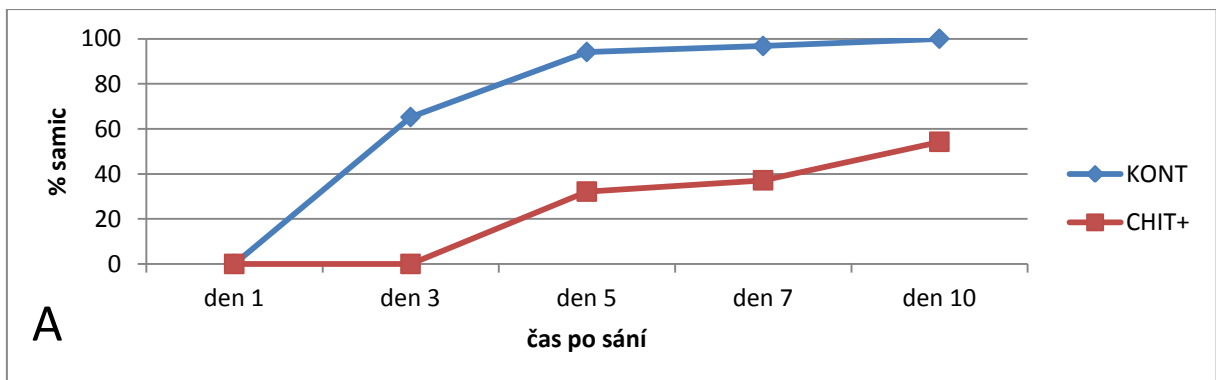
Graf 6 – Intenzita infekcí (INF) samic flebotomů *S. schwetzi* experimentálně nakažených leishmanií *L. major* (graf A) a *L. donovani* (graf B) v jednotlivých časových intervalech po sání. Ve dvojici vždy kontrolní skupina a skupina s přidanou chitinázou *B. bassiana* (CHIT +). Nad každým sloupcem uvedeno N vypitvaných samic.

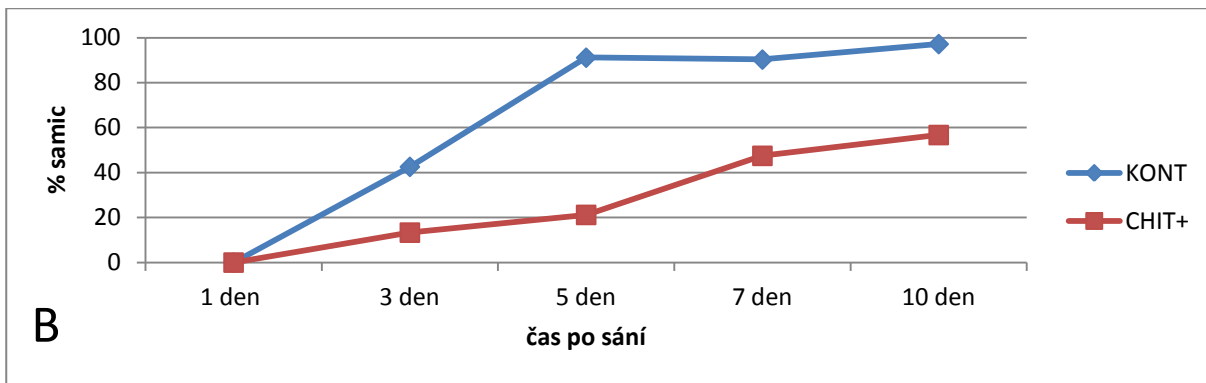


Graf 7 – Lokalizace infekcí samic flebotomů *S. schwetzi* experimentálně nakažených leishmanií *L. major* (graf A) a *L. donovani* (graf B) v jednotlivých časových intervalech po sání. Ve dvojici vždy kontrolní skupina a skupina s chitinázou *B. bassiana* (CHIT+). Počty vypitvaných samic jsou stejné jako v příslušném oddílu v grafu 6. E. Sp.= endoperitrofický prostor, AMG = anteriorní mesenteron, TMG = thorakální mesenteron, SV = stomodeální valva.

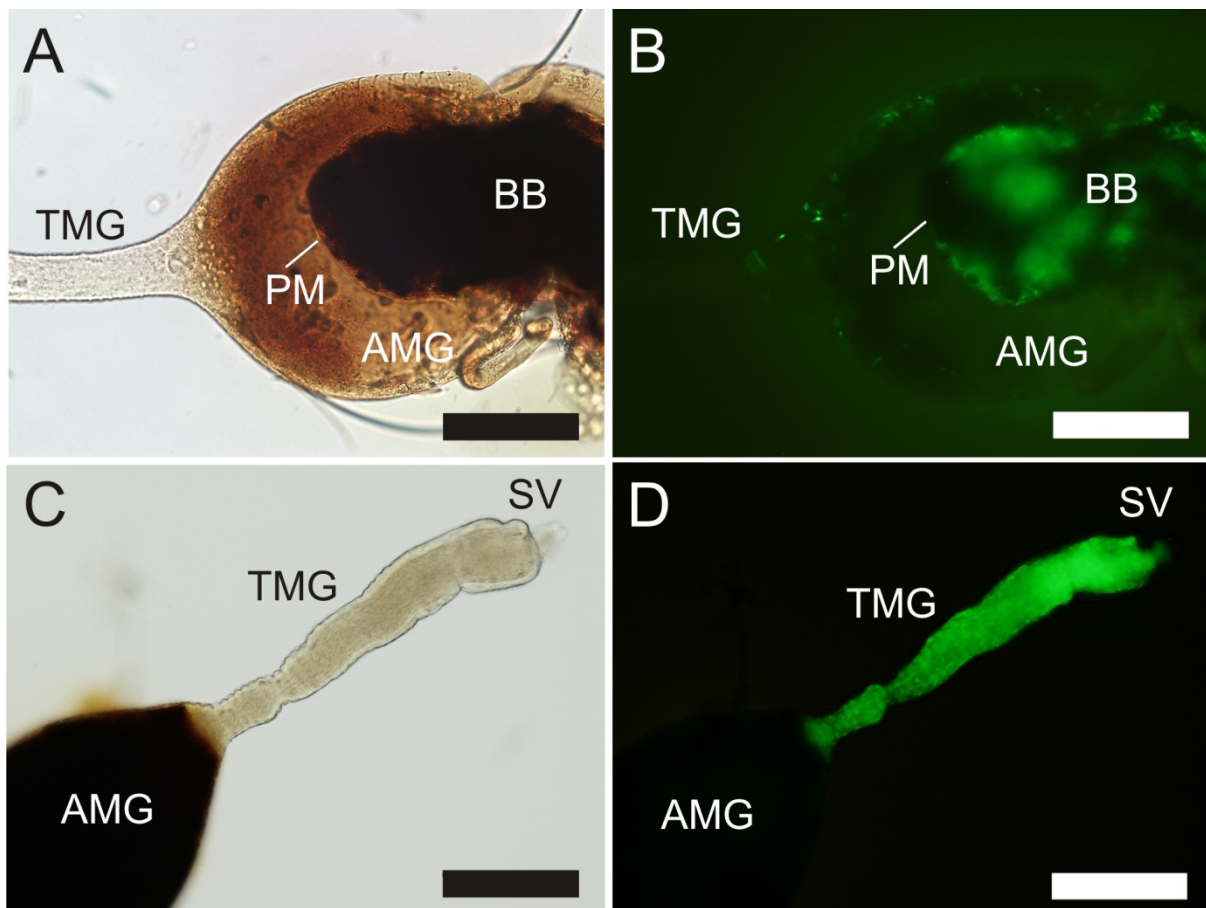


Graf 8) Grafy intenzity (A+C) a lokalizací (B+D) infekcí (INF) vydefekovaných samic flebotomů *S. schwetzi* nakažených leishmanií *L. major* (grafy A a B) a *L. donovani* (grafy C a D) v jednotlivých časových intervalech po sání. Ve dvojici vždy kontrolní skupina a skupina s přidáním chitinázy *B. bassiana* (CHIT+). Celkové (N) vydefekovaných samic, uvedené v grafech (A a C) je stejné i pro grafy (B a D).

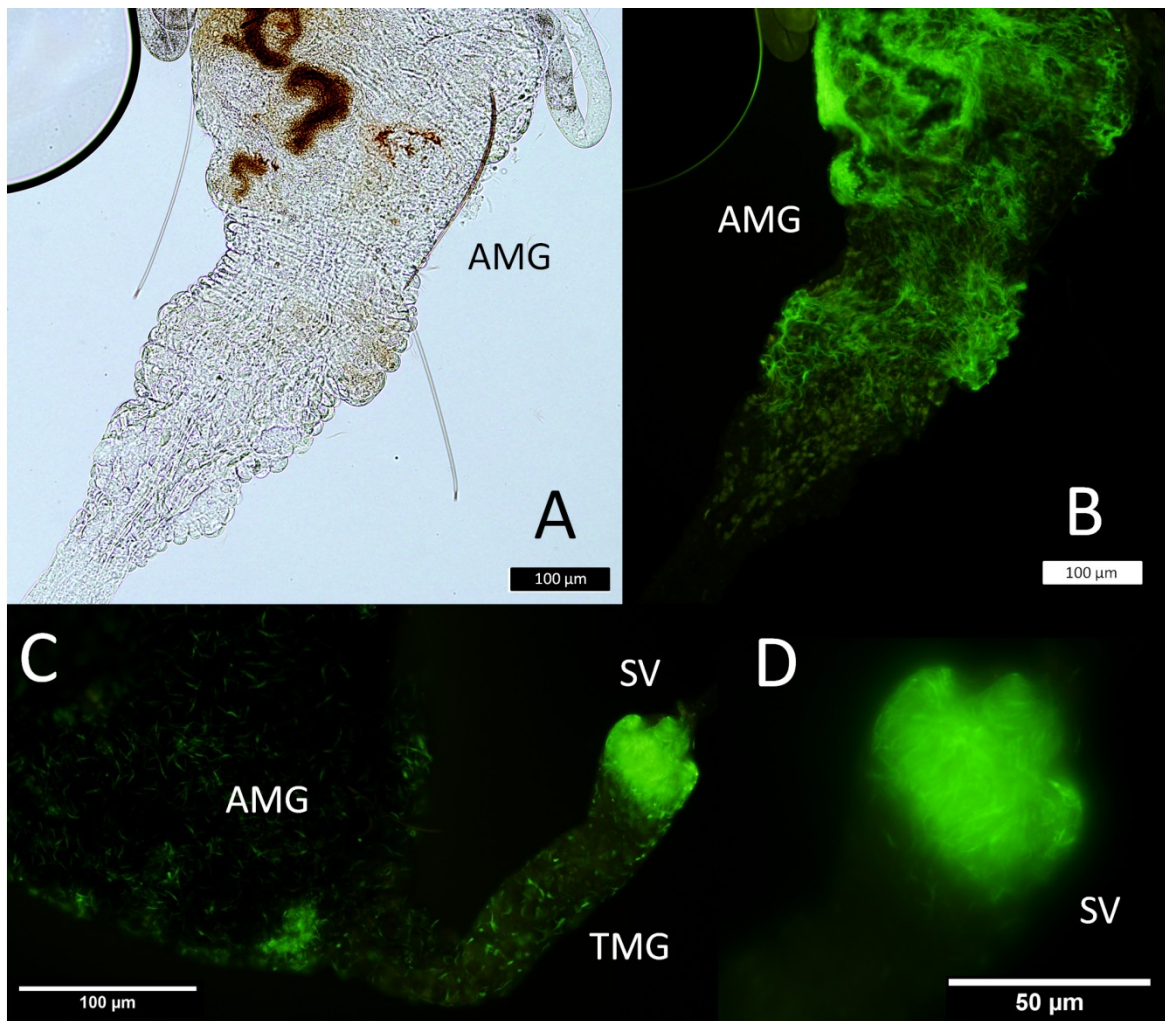




Graf 9) Průběh defekace samic flebotomů *S. schwetzi* nakažených leishmanií *L. major* (graf A) a *L. donovani* (graf B) v jednotlivých časových intervalech po sání. Ve dvojici vždy kontrolní skupina (KONT) a skupina s chitinázou *B. bassiana* (CHIT+). Počty vypitvaných samic jsou stejné jako v grafu 6.



Obr. 11 – Fotografie mesenteronů samic *S. schwetzi* infikovaných GFP transfekovanými leishmaniemi. Pole (A a B) – fotografie ve světelném a fluorescenčním režimu mesenteronu samice z chitinázové skupiny. Na snímcích je zřetelně vidět únik leishmanií *L. donovani* do abdominálního mesenteronu. Pole (C a D) – fotografie ve světelném a fluorescenčním režimu mesenteronu samice z chitinázové skupiny, na kterých je zřetelně vidět kolonizace thorakálního mesenteronu (TMG) a stomodeální valvy (SV) leishmanií *L. major*. BB = krevní bolus, PM = peritrofičká matrix, AMG = abdominální mesenteron. Měřítka 100 μ m.



Obr. 12 – Fotografie mesenteronů samic *S. schwetzi* infikovaných GFP transfekovanými leishmanii *L. major*. Pole (A a B) – fotografie ve světelném a fluorescenčním režimu mesenteronu samice z chitinázové skupiny po její defekaci. Na snímku jasně patrná kolonizace střeva leishmanii i po vydefekování nestrávené potravy. Na poli C) je vidět kolonizace abdominálního (AMG) a thorakálního (TMG) mesenteronu včetně stomodeální valvy (SV), která je v detailu na poli D).

5.4.3 Morfometrie vývojových stádií leishmanií

Vývojová stádia promastigotů byla hodnocena u flebotomů se zralou infekcí leishmanií 7-10 dní po sání, a to z roztlaků střev barvených Giemsou.

Většina promastigotů však byla ve stádiu dlouhých nektomonád (80 % *L. major* a 60 % *L. donovani*). Důležité je, že oba zkoumané druhy leishmanií byly schopny vytvořit také infekční metacyklická stádia (3,5 % u *L. major* a 5 % u *L. donovani*) (viz tab. 10).

| Druh leishmanie | Promastigotní forma | N (%) | Délka těla (μm) | Šířka těla (μm) | Délka bičíku (μm) |
|--------------------|---------------------------|------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | | Průměr (S.D.) [Rozptyl] | Průměr (S.D.) [Rozptyl] | Průměr (S.D.) [Rozptyl] |
| <i>L. major</i> | Dlouhé nektomonády | 161(80.5) | 19.2 (2.9) [14.4-27.2] | 1.4 (0.4) [0.7-3.4] | 19.2 (3,9) [6.7-33.9] |
| | Leptomonády | 32 (16.0) | 11.7 (1.8) [6.3-13.6] | 1.9 (0.7) [1.0-3.7] | 14.3 (4.2) [2.7-23.2] |
| | Metacykličtí promastigoti | 7 (3.5) | 8.0 (1.6) [5.9-10.0] | 2.3 (0.7) [1.1-3.0] | 17.1 (2.5) [13.0-20.0] |
| | Dohromady | 200 (100) | 17.6 (4.3) [5.9-27.2] | 1.5 (0.6) [0.7-3.7] | 18.3 (4.3) [2.7-33.9] |
| <i>L. donovani</i> | Dlouhé nektomonády | 117 (58.5) | 17.5 (2.4) [14.0-24.6] | 1.6 (0.5) [0.7-4.7] | 17.8 (3,1) [11.3-26.5] |
| | Leptomonády | 73 (36.5) | 11.2 (1.8) [5.5-13.8] | 1.6 (0.5) [0.9-3.3] | 14.9 (3.9) [2.9-22.4] |
| | Metacykličtí promastigoti | 10 (5.0) | 8.4 (2.0) [5.2-10.6] | 1.6 (0.3) [1.1-2.1] | 18.4 (3.4) [12.9-22.7] |
| | Dohromady | 200 (100) | 14.8 (4.0) [5.2-24.6] | 1.6 (0.5) [0.7-4.7] | 16.8 (3.7) [2.9-26.5] |

Tab. 10 – Rozměry a četnost výskytu jednotlivých vývojových promastigotních stádií *L. major* a *L. donovani* ze střev *S. schwetzi* 7-10 dní po sání. *S. schwetzi* byla experimentálně nasáta na krvi s leishmaniemi a s chitinázou z *B. bassiana* (0,07 U/ml), která rozrušila integritu PM.

5.4.4 Experimentální infekce flebotomů leishmanií *L. mexicana*

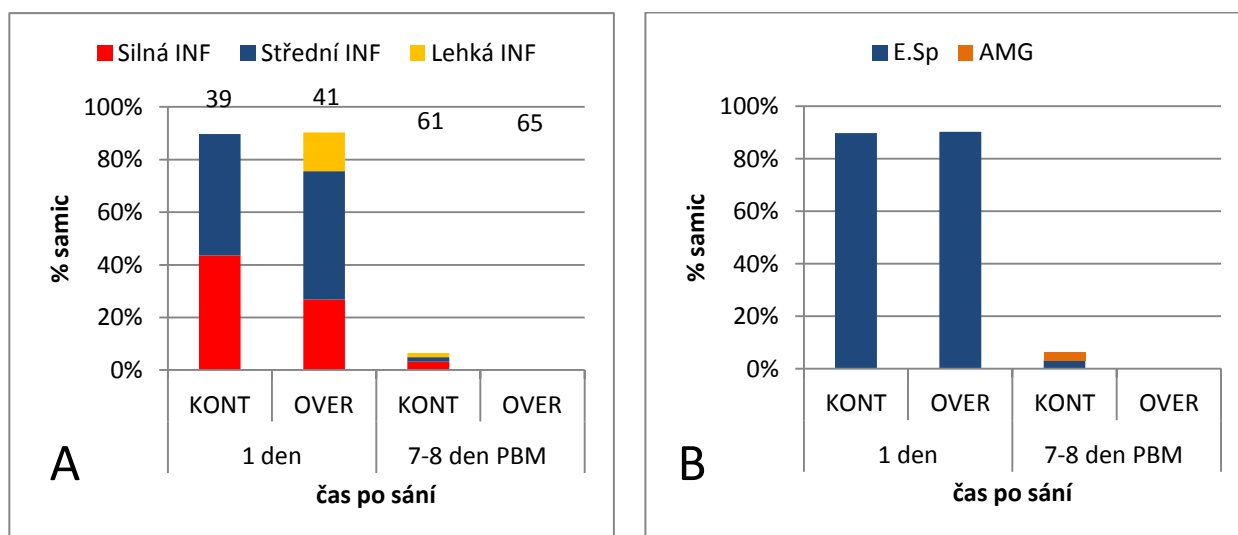
Roli PM ve vektorové kompetenci *S. schwetzi* jsme chtěli ověřit také alternativním způsobem, použitím leishmanií druhu *L. mexicana* geneticky upravených pro nadprodukcí chitinázy. U použitých kmenů (overexpresor a kontrola, kde byl vnesen pouze plasmid bez genu pro chitinázu) byla nejprve otestována chitinázová aktivita v kultuře (viz tab. 11)

Mezi oběma kmeny je sice v obou pokusech patrný jistý rozdíl v chitinázové aktivitě, ale absolutní hodnoty této aktivity jsou z natolik nízké, že rozrušení PM flebotomů (a s tím spojený pozitivní efekt na vývoj infekce leishmanií) bylo spíše nepravděpodobné.

Přesto jsme oběma kmeny experimentálně nakazili samice flebotomů. Nejistili jsme žádný pozitivní vliv nadprodukce chitinázy na průběh infekce v *S. schwetzi* – všechny leishmanie byly vydefekovány spolu s nestrávenými zbytky potravy (viz graf 10). Ze 4 infikovaných samic v kontrolní skupině (7 %) měly 2 samice leishmanie uvnitř PM (nevydefekované samice) a dvě zbylé samice měly slabě infikovaný pouze abdominální mesenteron.

| | Chit. aktivita overexpresoru | Chit. aktivita kontroly |
|---------|------------------------------|-------------------------|
| Pokus 1 | 0,011 U/ml | 0,010 U/ml |
| Pokus 2 | 0,0036 U/ml | 0,0021 U/ml |

Tab. 11 – Chitinázová aktivita overexpresoru chitinázy *L. mexicana* a jeho plasmidové kontroly po 24 hod kultivace.

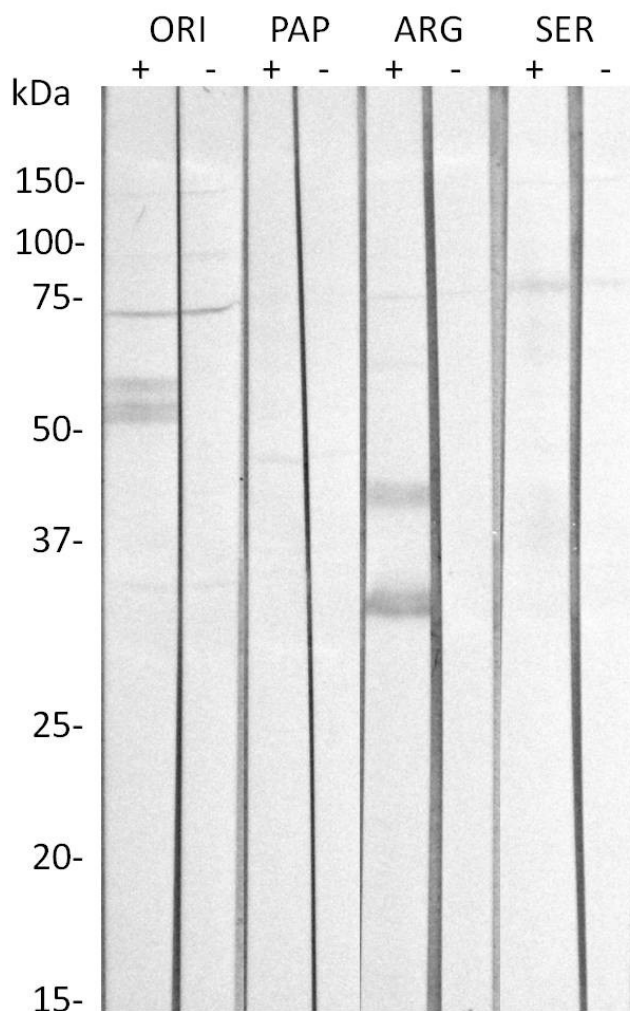


Graf 10 Grafy intenzity (graf A) a lokalizace (graf B) infekcí ve střevě samic nakažených *L. mexicana* s overexpresí chitinázy a její kontroly. Ve dvojici vždy vektorová kontrola (KONT) s overexpresorovým kmenem (OVER). Celkový počet vypitvaných samic (N) uvedený v grafu A) je stejný pro graf B). E.sp = endoperitrofický prostor, AMG = anteriorní mesenteron.

5.5 Zjištění přítomnosti O-glykosylovaných proteinů ve střevě čtyř druhů flebotomů

Glykosylace střevních proteinů všech čtyř zkoumaných druhů byly zkoumány s použitím metody Western-blot SDS-PAGE, kde jako marker GalNAc cukerných zbytků (typických pro O-glykosylace) byl použit HPA lektin.

Díky dříve publikovaným výsledkům naší laboratoře byl druh *P. papatasi* použit jako negativní kontrola (bez reakce s HPA lektinem) a druh *P. argentipes* byl použit jako pozitivní kontrola (pozitivní reakce s HPA lektinem) (Myskova et al. 2007). Nově zkoumané byly druhy *P. orientalis* a *S. schwetzi*. U *P. orientalis* reagovali s HPA lektinem pozitivně proteiny v rozmezí 50-60 kDa a u druhu *S. schwetzi* proteiny okolo molekulové hmotnosti 35-40 kDa. U druhu *S. schwetzi* však byla tato reakce velice slabá oproti *P. argentipes* a *P. orientalis* a jasně viditelná pouze ihned po vyvolání reakce.



Obr. 13 – Glykosylace střevních proteinů u všech čtyř zkoumaných druhů flebotomů, které byly zjišťovány pomocí HPA-lektinu, který se typicky váže na cukerné zbytky typické pro O-glykosylace. Druhy *P. papatasi* a *P. argentipes* jeví silnou reaktivitu s lektinem, zatímco druh *S. schwetzi* jeví jen velmi nízkou reaktivitu v rozmezí 35 – 40 kDa. Druh *P. papatasi* byl použit jako negativní kontrola.

6 DISKUZE

Peritrofická matrix tvořená okolo přijaté potravy ve střevě flebotoma představuje jednu z několika nejvýznamnějších překážek pro vývoj leishmanií. Přitom nejdůležitější je zřejmě délka intervalu mezi degradací PM a defekací nestrávených zbytků potravy. Tato hypotéza byla postulována autory studujícími vektorovou kompetenci *S. schwetzi* k lidským leishmaniím (Sádlová et al. 2013) a cílem této diplomové práce bylo tuto hypotézu potvrdit a vysvětlit. Srovnáním průběhu trávení krve u čtyř druhů flebotomů bylo zjištěno, že interval mezi degradací PM a defekací byl skutečně mnohem kratší (průměrně jen 3 hod) u *S. schwetzi* oproti ostatním druhům flebotomů (21-48 hodin).

Přidání exogenní chitinázy z *B. bassiana* do suspenze krve s leishmaniemi během experimentálního sání vedlo k rozrušení celistvosti PM a skutečně byl pozorován pozitivní vliv porušení PM na vývoj leishmanií (*L. major*, *L. donovani*). Oba druhy leishmanií byly schopny opustit endoperitrofický prostor a migrovat anteriorně přes thorakální mesenteron ke stomodeální valvě. Tu byly schopny kolonizovat ve 12 % u *L. donovani* a ve 36 % u *L. major*. Kolonizace stomodeální valvy je základním předpokladem pro další přenos leishmanií, stejně jako tvorba infekčních metacyklických stádií. Tato stadia infekční pro obratlovce byla také u obou druhů leishmanií detekována, a to v 5 % u *L. donovani* a 3,5 % u *L. major*. Přirozené procento metacyklických promastigotů u zralých infekcí s kolonizovanou stomodeální valvou u kompatibilních druhů leishmanií a flebotomů se pohybuje mezi 5 % a 20 %, někdy i 30 % (Volf et al. 2007, Sádlová et al. 2016, Doehl et al. 2017).

Pozitivní efekt rozrušení PM na vývoj leishmanií v našich pokusech byl zřejmě umožněn několika simultánně působícími mechanismy. Za prvé to byla natolik malá koncentrace chitinázy (0,07 U/ml), že byla porušena celistvost PM, ale ta nebyla zcela degradována a mohla tedy do jisté míry stále plnit své biologické funkce v trávení flebotoma. Pro vývoj leishmanií je důležitá zejména schopnost PM vázat na sebe toxický hem uvolňující se při trávení krve (Pascoa et al. 2002). Peritrofická matrix chitinázou ošetřených samic možná vázala tuto toxickou substanci méně, ale stále ještě v takové míře, že leishmanie ve střevě mohly přežívat.

Pozitivní vliv na vývoj leishmanií v *S. schwetzi* s rozrušenou PM pomocí chitinázy obsažené v supernatantu kultury *B. bassiana* mělo i oddálení defekace flebotoma. Nemuselo se v tomto případě jednat o efekt samotné chitinázy. Při použití komerční chitinázy *S. griseus* v koncentraci 1 U/ml v našich pokusech k žádnému oddálení defekace oproti kontrolní skupině nedošlo. Ani Pimenta et al. (1997) při pokusech s chitinázou *S. griseus*, ani Robles-Murguia et al. (2014) při zablokování PpChit1 pomocí protilátek nepozorují oddálenou

defekaci flebotomů. Pravděpodobnější je, že na průběh defekace měl vliv některý z produktů metabolismu houby přítomných v supernatantu kultury *B. bassiana*. Další příčinou oddálení defekace mohl být produkt samotných leishmanií, který v prostředí porušené PM mohl ovlivnit metabolismus flebotomů. Například myoinhibitory produkované leishmaniemi ovlivňují přirozenou peristaltiku střeva přenašečů. Tyto inhibitory jsou však dosti druhově specifické a jejich vliv na nepřirozené přenašeče je pravděpodobně zanedbatelný (Vaidyanathan 2004, 2005). Ačkoliv nemůžeme s jistotou určit, co přesně způsobilo oddálenou defekaci flebotomů, tento efekt příznivě ovlivnil vývoj leishmanií, které byly schopny kolonizovat střevo flebotoma i bez nutnosti přichycení na střevní epitel. U třetiny až poloviny jedinců byly leishmanie přítomny ve střevě i po oddálené defekaci (až 58 % *L. donovani* a až 56 % *L. major*). Leishmanie v době defekace již pravděpodobně kolonizovaly thorakální mesenteron či stomodeální valvu a pravděpodobnost ztráty infekcí s defekací byla již minimální.

Zajímavá je otázka, zda leishmanie po opuštění PM byly schopné přichytit se k epitelu střeva *S. schwetzi*. Při sledování experimentálních infekcí nebylo přichycení přímo mikroskopicky pozorováno, to ovšem nevylučuje, že k němu přesto mohlo docházet. Metodou Western-blot (vazbou HPA lektinu na GalNAc cukerná rezidua) bylo v této práci prokázáno, že ve střevě *S. schwetzi* se nacházejí O-glykosylované proteiny klíčové pro přichycení leishmanií v permissivních druzích (Myskova et al. 2007), ale jen v malém množství. Pokles procenta infikovaných samic s rostoucí dobou po sání může znamenat, že množství O-glykosylovaných proteinů není pro přichycení leishmanií v *S. schwetzi* dostatečné.

Přestože někteří autoři používali při experimentálních infekcích flebotomů k rozrušení PM a sledování infekce leishmanií chitinázu získanou ze *S. griseus* (Pimenta et al. 1997), ta v našich *in vitro* pokusech působila v takových koncentracích, které rozrušily PM, stoprocentní mortalitu leishmanií. Stejně se chovala i druhá komerčně dostupná chitináza z *T. viride* (též dodávaná firmou Sigma, a.s.). Proto jsme volili výrobu vlastní chitinázy kultivací houby *Beauveria bassiana*. Pimenta et al. (1997) provedli *in vitro* experimenty testující vliv chitinázy na leishmanie, kultivace ale prováděli v krvi. Z našich výsledků je ale zřejmé, že samotná krev má na vývoj leishmanií letální vliv a proto není vhodným prostředím pro zkoumání vlivu ostatních látek na vývoj leishmanií. Nelze totiž s jistotou odlišit, co je efekt samotné krve a jaký vliv má testovaná látka. Mimoto leishmanie v krvi vytvářejí při růstu agregáty (téměř bez volných stádií, která jsou přítomna v médiu) a může docházet k chybám při jejich počítání. Letální efekt trávené krve na leishmanie je aktuálně testován v naší laboratoři (Pružinová, ústní sdělení).

Na dvojici *P. papatasi* – *L. major* bylo popsáno, že v časných fázích infekce může PM pozitivně ovlivnit vývoj leishmanií tím, že tvoří ochrannou vrstvu, která brání rychlému průniku trávicích enzymů do endoperitrofického prostoru (Pimenta et al. 1997). Výsledky našich pokusů však neprokázaly, že by druhy flebotomů podporující vývoj *L. donovani* tvořily PM rychleji. Naopak, nejrychleji PM tvořily druhy *S. schwetzi* a *P. papatasi*, u nichž byla PM detekovatelná již 1 hod a 4 hod po sání. Naproti tomu druhy *P. argentipes* a *P. orientalis*, tedy přirození přenašeči *L. donovani*, tvořili PM až 24 hod po sání. Rychlost tvorby PM tedy neovlivňuje časný průběh infekce *L. donovani* u námi zkoumaných druhů flebotomů, respektive vývoj *L. donovani* v prvních hodinách po nasátí do střeva flebotomů *P. orientalis* a *P. argentipes* je úspěšný i bez ochranné role PM (Sádlová, Myšková, ústní sdělení). U druhu *P. argentipes* byla PM ve střevě přítomna velice krátkou dobu a přesto je *L. donovani* schopna se v tomto druhu flebotoma velmi dobře vyvíjet. Protože má *P. argentipes* velice rychlé trávení i kinetiku PM, je vývojový cyklus *L. donovani* v tomto druhu flebotoma urychlen a to cca o 48 hod oproti *P. orientalis* (Pruzinova et al. 2015).

U druhu *P. papatasi* jsou popsány hned dva možné mechanismy jeho rezistence k *L. donovani*. Jednak to může být aktivita trávicích enzymů, které mají letální vliv na nekompetentní druhy leishmanií (Borovsky & Schlein 1987, Schlein & Jacobson 1998) a nebo charakter střevního epitelu, který neumožňuje promastigotům druhu *L. donovani* uchytit se na stěnu střeva, což vede k jejich defekaci (Pimenta et al. 1994). Experimentální infekce provedené v naší laboratoři podporují spíše druhou možnost - promastigoti *L. donovani* byli schopni přežít ve střevě *P. papatasi* působení trávicích enzymů a vymigrovat ven z endoperitrofického prostoru, infekce se ztrácely až v okamžiku defekace flebotomů (Sádlová, Myšková, ústní sdělení).

Laboratorní experimenty Lawyer et al. (1990) Sádlová et al. (2013) včetně výsledků této práce, svědčí o tom, že *S. schwetzi* není vektorem lidských leishmanióz. Ovšem recentní terénní práce (Senghor et al. 2016) popisuje nálezy samic *S. schwetzi* infikovaných *L. infantum* v oblasti Mont-Rolland v Senegalu. Kromě detekce DNA leishmanií *L. infantum* ve 4,19 % samic autoři této práce také pozorovali mikroskopicky ve vydefekované samici *S. schwetzi* kolonizaci anteriorní části střeva a přítomnost metacyklických stádií. Výsledky předchozích laboratorních pokusů považují autoři za nerelevantní kvůli použití leishmanií a flebotomů z různých lokalit. Lawyer et al. (1990) však použili flebotomy a kmen *L. major* pocházející z téže oblasti Keni a Sádlová et al. (2013) studovali *S. schwetzi* a *L. donovani* z téže oblasti Etiopie. Pouze další studované druhy leishmanií (*L. infantum* a *L. major*), které se v severní Etiopii nevyskytují, pocházely z jiných oblastí (Turecko, Izrael). Ani jeden z těchto druhů se v *S. schwetzi* nevyvíjel.

Pravděpodobnějším vysvětlením rozporných výsledků laboratorních studií a terénního nálezu ze Senegalu je tedy regionální odlišnost ve vnímavosti flebotomů druhu *S. schwetzi*. V této souvislosti je třeba zmínit velikou morfologickou variabilitu tohoto druhu. Morfotyp odlišný od typické formy *S. schwetzi* (Adler 1929) popsáný v Senegalu (Abonnenc 1959) má areál rozšíření od Súdánu po Západní Afriku (Lewis et al. 1969). Další atypická forma byla popsána v Ugandě, ta se vyskytuje ve Východní Africe (Lewis et al. 1969). Dvě morfologické varianty *S. schwetzi* popsané v Keni (Wijers & Minter 1962) se dokonce liší i svým antropofilním chováním (Minter 1963). Více morfologických forem *S. schwetzi* se vyskytuje také v Etiopii (Dvořák a Hlavačková, ústní sdělení). Je tedy pravděpodobné, že po důkladné revizi taxonomie druhu *S. schwetzi* by mohlo dojít k jeho rozdělení na více druhů, které se mohou lišit ve vnímavosti k leishmaniím.

Výsledky této diplomové práce přispívají i ke stále otevřené otázce použití vlastních chitináz leishmanií při úniku z PM. Někteří autoři se kloní k názoru, že leishmanie při úniku z PM, stejně jako při poškození stomodeální valvy, produkují chitinázu, kterou PM aktivně rozrušují (Schlein et al. 1991; Rogers et al. 2008). Rogers et al. (2008) pozorovali u linie *L. mexicana* nadprodukcující chitinázu dřívější kolonizaci stomodeální valvy *L. longipalpis* oproti kontrole, z čehož vyvozují, že leishmanie používají svou chitinázu pro opuštění PM. Jiní autoři se však přiklánějí k názoru, že leishmanie chitinázu v této fázi neprodukují a pouze čekají uvnitř střeva flebotoma na degradaci PM jeho chitinázami a teprve poté migrují dále do střeva (Sádlová a Volf 2009; Ramalho-Ortigao et al. 2010). Naše experimenty podporují spíše druhou variantu. Linie *L. mexicana* nadprodukcující chitinázu nedokázaly opustit PM *S. schwetzi* a byly vydefekovány stejně, jako kontrolní linie. Také výsledky pokusů s *L. donovani* a *L. major* při použití exogenní chitinázy *B. bassiana* svědčí spíše pro variantu, že leishmanie pasivně čekají v endoperitrofickém prostoru na degradaci PM chitinázami flebotoma a poté z ní teprve uniknou. Jen v případě experimentálního porušení PM jsou schopny vymigrovat z endoperitrofického prostoru i v takové druhu flebotoma, který přirozeně PM nerozrušuje, nebo rozrušuje až těsně před defekací.

Při zkoumání hrubé morfologie PM na nativních preparátech a za pomoci histologických metod bylo zjištěno, že základní rysy morfologie PM jsou u všech čtyř druhů flebotomů velice podobné. PM ve všech čtyřech druzích obklopuje kontinuálně trávenou krev a postupně tmavne z důvodu inkrustace hemem, což bylo u všech druhů pozorováno zhruba 24 hod po sání. To je v souladu např. s postupem inkrustace u *P. dubosqi* (Sádlová & Volf 2009). Všechny druhy mají v přední části PM vyvinutý anteriorní plug, kteří je zřejmě obligátní součástí PM komárů (Freyvogel & Staubli 1965, Richardson & Romoser 1972) i flebotomů (Walters et al. 1993, 1995, Guzman et al. 1994, Sádlová & Volf 2009). Na

posteriorním konci PM byl u všech druhů flebotomů vyvinutý posteriorní tail. Na rozdíl např. od *P. perniciosus*, který ho postrádá (Walters et al. 1993) a nebo např. od *L. spiracrassa*, u které je vyvinutý, ale na konci otevřený (Walters et al. 1995), byl u všech námi zkoumaných flebotomů PT uzavřený, jako např. v případě *P. dubosqi* či *P. papatasi* (Sádlová a Volf 2009; Warburg 2008). Obě dvě tyto struktury (AP, PT) nejsou v přímém styku s trávenou krví a proto také nejsou inkrustovány hemem, stejně jako u komárů (Freyvogel & Staubli 1965) a jiných flebotomů (Sádlová & Volf 2009).

Šířka PM, která byla měřena na snímcích z elektronového mikroskopu, se signifikantně nelišila mezi druhy *P. orientalis*, *P. papatasi* a *S. schwetzi*, u druhu *P. argentipes* však byla PM signifikantně tenčí, než u ostatních druhů flebotomů. To je v souladu s pozorováním během pitev flebotomů, kdy PM *P. argentipes* byla velice křehká a snadno poškoditelná. Slabší PM u tohoto druhu flebotoma zřejmě souvisí s jeho rychlým trávením, kdy PM je přítomna během mnohem kratšího časového úseku než u ostatních druhů flebotomů. Také ultrastruktura PM byla u *P. argentipes* jednodušší, než u ostatních tří druhů flebotomů. Tyto výsledky naznačují, že pro vývoj leishmanií u těchto zkoumaných druhů flebotomů není šířka a ultrastruktura PM rozhodující a že oddálený rozpad PM u *S. schwetzi*, který je zásadní pro rezistenci vůči leishmaniím, není dán specifickými vlastnostmi PM tohoto druhu, ale spíše slabší či oddálenou tvorbou chitináz. Tuto hypotézu bychom chtěli v blízké době ověřit.

7 ZÁVĚR

7.1 Shrnutí výsledků:

- 1) Tvorba PM u druhu *S. schwetzi* byla velice rychlá, rychlejší než u obou přenašečů *L. donovani* (*P. orientalis* a *P. argentipes*) což vylučuje možnost, že ztráta infekcí leishmanií by byla dána absencí ochranné role PM v časně fáze infekce (dle hypotézy Pimenta et al. (1997)).
- 2) Kinetika defekace *S. schwetzi* byla obdobná, jako u druhu *P. orientalis* (tedy přirozeného přenašeče *L. donovani*). Stejně tak se významně nelišila hrubá morfologie, ultrastruktura ani tloušťka PM *S. schwetzi* od PM ostatních druhů flebotomů s výjimkou druhu *P. argentipes*, u něhož je tenká a ultrastrukturou jednodušší PM zřejmě spojena s extrémně rychlým trávením potravy.
- 3) Zásadně odlišná oproti všem ostatním druhům flebotomů však byla u *S. schwetzi* průměrná doba mezi degradací PM a defekací zbytků potravy. Ta byla signifikantně kratší (3 hod vs 21-48 hodin), což potvrzuje hypotézu autorů Sádlová et al. (2013). Leishmanie tedy v tomto druhu flebotoma nemají dostatek času z PM uniknout a přichytit se k epitelu střeva a jsou vydefekovány spolu se zbytky potravy a PM.
- 4) Komerčně dostupné chitinázy (produkované *T. viride* a *S. griseus*) měly na leishmanie jednoznačně letální efekt, ač je publikováno jejich využití pro rozrušení PM flebotomů a sledování infekcí leishmanií (Pimenta et al. 1997).
- 5) Jako alternativní zdroj chitinázy se osvědčila chitináza produkovaná do kultivačního média houbou *B. bassiana*. Používán byl superntant média zahuštěný přes 30kDa molekulární filtr, který neovlivňoval růst a vitalitu leishmanií *in vitro* ani *in vivo*.
- 6) Tato chitináza podaná flebotomům *S. schwetzi* spolu se sátou krví působila porušení celistvosti a ultrastruktury PM a umožnila tak únik leishmanií z endoperitrofického prostoru. Dalším efektem bylo oddálení defekace samic, tento efekt lze přičítat spíše jiným produktům hub uvolňovaným do média než samotné chitináze.

- 7) Při umělém narušení PM byly leishmanie druhů *L. donovani* i *L. major* schopny po úniku do ektoperitrofického prostoru vytvořit v *S. schwetzi* zralé infekce včetně kolonizace stomodeální valvy a přítomnosti metacyklických stádií.
- 8) S postupujícím časem po sání však klesalo procento infikovaných samic a mezi vydefekovanými samicemi se podíl nakažených pohyboval jen okolo 20 – 50 %. To může souviset s nižším zastoupením O-glykosylovaných proteinů u *S. schwetzi* (tyto proteiny jsou u permisivních vektorů klíčové pro přichycení na leishanií na střevní epitel).

7.2 Závěr:

Naše výsledky tedy potvrzují, že hlavní důvod rezistence *S. schwetzi* vůči leishmaniové infekci je dlouhé přetrvání PM až do doby defekace flebotoma. Kromě toho má tento druh i nižší zastoupení O-glykosylovaných proteinů na střevním epitelu, takže i po případném opuštění PM by leishmanie měly ztížené přichycení na stěnu střeva.

Oddálení rozpadu PM není dáno specifickými vlastnostmi PM *S. schwetzi* - ultrastruktura, hrubá morfologie ani tloušťka PM *S. schwetzi* se výrazně neliší od druhů, u nichž je rozpad PM oddálen od defekace. Rozdíl je tedy třeba hledat spíše v rozdílné produkci chitináz flebotoma, které PM s koncem trávení potravy přirozeně rozrušují. Na tuto hypotézu bude zaměřen další výzkum.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abonnenc E. (1959): Sur *Phlebotomus schwetzi* Adler, Theodor et Parrot. *Revue de zoologie et de botanique Africaines*. 37: 591–593.
- Abraham E. G. & Jacobs-Lorena M. (2004): Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. *Insect biochemistry and molecular biology*. 34: 667–671.
- Adler S. (1929): Phlebotomes du Congo belge. *Revue de zoologie et de botanique Africaines*. 18: 72–89
- Adler S. (1938): Factors determining the behaviour of *Leishmania sp.* in sandflies. *Harefuah*. 14: 4–8.
- Arakane Y., Hogenkamp D. G., Zhu Y. C., Kramer K. J., Specht C. A., Beeman R. W., Kanost M. R., & Muthukrishnan S. (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*. 34: 291–304.
- Araújo A. P. O., Telleria E. L., Dutra J. da M. F., Júlio R. M., & Traub-Csekö Y. M. (2012): Disruption of the peritrophic matrix by exogenous chitinase feeding reduces fecundity in *Lutzomyia longipalpis* females. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 107: 543–545.
- Barros V. C., Oliveira J. S., Melo M. N., & Gontijo N. F. (2006): *Leishmania amazonensis*: Chemotactic and osmotactic responses in promastigotes and their probable role in development in the phlebotomine gut. *Experimental parasitology*. 112: 152–157.
- Bates P. A. (2007): Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International journal for parasitology*. 37: 1097–1106.
- Bates P. A. (2008): *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Current opinion in microbiology*. 11: 340–344.
- Bates P. A. & Rogers M. E. (2004): New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Current molecular medicine*. 4: 601–609.
- Besteiro S., Coombs G. H., & Mottram J. C. (2004): A potential role for ICP, a leishmanial inhibitor of cysteine peptidases, in the interaction between host and parasite. *Molecular microbiology*. 54: 1224–1236.
- Billingsley P. F. & Rudin W. (1992): The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of *Plasmodium* species. *Journal of parasitology*. 78: 430–440.
- Borovsky D. & Schlein Y. (1987): Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Medical and veterinary entomology*. 1: 235–242.

- Coutinho-Abreu I. V., Sharma N. K., Robles-Murguía M., & Ramalho-Ortigao M. (2010): Targeting the midgut secreted PpChit1 reduces *Leishmania major* development in its natural vector, the sand fly *Phlebotomus papatasi*. *PLoS neglected tropical diseases*. 4: 1–8.
- Coutinho-Abreu I. V., Sharma N. K., Robles-Murguía M., & Ramalho-Ortigao M. (2013): Characterization of *Phlebotomus papatasi* peritrophins, and the role of PpPer1 in *Leishmania major* survival in its natural vector. *PLoS neglected tropical diseases*. 7: 1–16.
- Croft S. L., Sundar S., & Fairlamb A. H. (2006): Drug resistance in Leishmaniasis. *American society for microbiology*. 19: 111–126.
- Davies C. R., Cooper A. M., Peacock C., Lane R. P., & Blackwell J. M. (1990): Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*. 101: 337–343.
- Devenport M., Alvarenga P. H., Shao L., Fujioka H., Bianconi M. L., Oliveira P. L., & Jacobs-lorena M. (2006): Identification of the *Aedes aegypti* peritrophic matrix protein AeIMUCI as a heme-binding protein. *Biochemistry*. 45: 9540–9549.
- Dillon R. J. & Lane R. P. (1993a): Bloodmeal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. *Medical and veterinary entomology*. 7: 225–232.
- Dillon R. J. & Lane R. P. (1993b): Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni*. *Parasitology research*. 79: 492–496.
- Dinglasan R. R., Devenport M., Florens L., Johnson J. R., McHugh C. A., Donnelly-Doman M., Carucci D. J., Yates J. R., & Jacobs-Lorena M. (2009): The *Anopheles gambiae* adult midgut peritrophic matrix proteome. *Insect biochemistry and molecular biology*. 39: 125–134.
- Doehl J. S. P., Sádlová J., Aslan H., Pružinová K., Metangmo S., Votýpka J., Kamhawi S., Volf P., & Smith D. F. (2017): *Leishmania* HASP and SHERP genes are required for *in vivo* differentiation, parasite transmission and virulence attenuation in the host. *PLOS pathogens*. 13: 1–35.
- Dorlo T. P. C., Balasegaram M., Beijnen J. H., & Vries P. J. de. (2012): Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 67: 2576–2597.
- Dostálová A. & Volf P. (2012): *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors*. 5: 276.
- Dostálová A., Votýpka J., Favreau A. J., Barbian K. D., Volf P., Valenzuela J. G., & Jochim R. C. (2011): The midgut transcriptome of *Phlebotomus* (Larroussius) *perniciosus*, a vector of *Leishmania infantum*: Comparison of sugar fed and blood fed sand flies. *BMC genomics*. 12: 1–21.

- Elnaiem D. E. A. (2011): Ecology and control of the sand fly vectors of *Leishmania donovani* in East Africa, with special emphasis on *Phlebotomus orientalis*. *Journal of vector ecology*. 36: 23–31.
- Elnaiem D., Hassan H., & Ward R. (1997): Phlebotomine sandflies in a focus of visceral leishmaniasis in a border area of eastern Sudan. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 91: 307–318.
- Eschenlauer S. C. P., Faria M. S., Morrison L. S., Bland N., Ribeiro-Gomes F. L., Dosreis G. A., Coombs G. H., Lima A. P. C. A., & Mottram J. C. (2009): Influence of parasite encoded inhibitors of serine peptidases in early infection of macrophages with *Leishmania major*. *Cellular microbiology*. 11: 106–120.
- Espinosa O. A., Serrano M. G., Camargo E. P., Teixeira M. M. G., & Shaw J. J. (2016): An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*. 1–13.
- Fang W., Leng B., Xiao Y., Jin K., Fan Y., Feng J., Yang X., Zhang Y., & Pei Y. (2005): Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and environmental microbiology*. 71: 363–370.
- Feng L. C. (1951): The role of the peritrophic membrane in *Leishmania* and *Trypanosome* infection of sandflies. *Peking natural history bulletin*. 19: 327–334.
- Filho B. P. D., Lemos F. J. a, Secundino N. F. C., Páscoa V., Pereira S. T., & Pimenta P. F. P. (2002): Presence of chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase in the *Aedes aegypti* a chitinolytic system involving peritrophic matrix formation and degradation. *Insect biochemistry and molecular biology*. 32: 1723–1729.
- Freyvogel T. A. & Jaquet C. (1965): The prerequisites for the formation of a peritrophic membrane in Culicidae females. *Acta Tropica*. 22: 148–154.
- Freyvogel T. & Staubli W. (1965): The formation of the peritrophic membrane in Culicidae. *Acta tropica*. 22: 118–147.
- Gebremichael T. & Lane R. P. (1996): The roles of *Phlebotomus martini* and *P. celiae* (Diptera: Phlebotominae) as vectors of visceral leishmaniasis in the Aba Roba focus, southern Ethiopia. *Medical and veterinary entomology*. 10: 53–62.
- Gemetchu T. (1974): Morphology and fine structure of midgut and peritrophic membrane of adult female, *Phlebotomus longipes* Parrot and Martin (Diptera-Psychodidae). *Annals of tropical medicine and parasitology*. 68: 111–124.
- Gooding R. H., Cheung A. C., & Rolseth B. M. (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*. 105: 433–436.

- Guzman H., Walters L., & Tesh R. (1994): Histologic detection of multiple blood meals in *Phlebotomus duboscqi*. *Journal of medical entomology*. 31: 890–897.
- Houk E. J., Obie F., & Hardy J. L. (1979): Peritrophic membrane formation and the midgut barrier to arboviral infection in the mosquito, *Culex tarsalis* Coquillett (Insecta, Diptera). *Acta tropica*. 36: 39–45.
- Chapman R. F. (1998): Alimentary canal, digestion and absorption. The insects structure and function (Edit. Simpson S. J. & Douglas A. E.). *Cambridge university press*. Vol. 4: 38–51. ISBN: 978-0-521-57048
- Ilg T. (2000): Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitology today*. 16: 489–497.
- Ilg T., Stierhof Y. D., Craik D., Simpson R., Handman E., & Bacic A. (1996): Purification and structural characterization of a filamentous, mucin-like proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* parasites. *Journal of biological chemistry*. 271: 21583–21596.
- Ivens A. C., Peacock C. S., Worthey E. A., Murphy L., Aggarwal G., Berriman M., Sisk E., A R. M., Adlem E., Aert R. et al. (2005): The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 309: 436–442.
- Jecna L., Svarovska A., Besteiro S., Mottram J. C., Coombs G. H., & Volf P. (2009): Inhibitor of cysteine peptidase does not influence the development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia longipalpis*. *Journal of medical entomology*. 46: 605–609.
- Jochim R. C., Teixeira C. R., Laughinghouse A., Mu J., Oliveira F., Gomes R. B., Elnaiem D.-E., & Valenzuela J. G. (2008): The midgut transcriptome of *Lutzomyia longipalpis*: Comparative analysis of cDNA libraries from sugar-fed, blood-fed, post-digested and *Leishmania infantum chagasi*-infected sand flies. *BMC genomics*. 9: 1–24.
- Joshi M. B., Rogers M. E., Shakarian A. M., Yamage M., Al-Harthi S. A., Bates P. A., & Dwyer D. M. (2005): Molecular characterization, expression, and *in vivo* analysis of LmexCht1. *Journal of biological chemistry*. 280: 3847–3861.
- Kamhawi S. (2006): Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in parasitology*. 22: 439–445.
- Kamhawi S., Ramalho-Ortigao M., Van M. P., Kumar S., Lawyer P. G., Turco S. J., Barillas-Mury C., Sacks D. L., & Valenzuela J. G. (2004): A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*. 119: 329–341.
- Karnovsky M. J. (1965): A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *The Journal of cell biology*. 27: 137–149.

- Lainson R. & Shaw J. J. (1987): Evolution, classification and geographical distribution. The Leishmaniases in biology and medicine (Edit. Peters W. & Killick-Kendrick R.). *Academic Press London*. Vol.1: 2–104. ISBN: 0-12-552101-4
- Lambert M., Dereure J., El-Safi S., Bucheton B., Dessein A., Boni M., Feugier E., & Dedet J. (2002): The sandfly fauna in the visceral-leishmaniasis focus of Gedaref, in the Atbara-River area of eastern Sudan. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 96: 631–636.
- Lawyer P. G., Ngumbi P. M., Anjili C. O., Odongo S. O., Mebrahtu Y. B., Githure J. I., Koech D. K., & Roberts C. R. (1990): Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *American journal of tropical medicine and hygiene*. 43: 31–34.
- Lehane M. J. (1997): Peritrophic matrix structure and function. *Annual review of entomology*. 42: 525–550.
- Lewis D., Barnley G., & Minter D. (1969): On *Sergentomyia ruttledgei* (Lewis and Kirk) and *S. schwetzi* (Adler, Theodor and Parrot) (Diptera: Psychodidae). *Systematic entomology*. 38: 53–60.
- Maia C. & Depaquit J. (2016): Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? *Parasite*. 23: 1–8.
- Maltezou H. C. (2009): Drug resistance in visceral leishmaniasis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010: 1–8.
- Maroli M., Feliciangeli M. D., Bichaud L., Charrel R. N., & Gradoni L. (2012): Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. *Medical and veterinary entomology*. 27: 1–25.
- McConville M. J., Turco S. J., Ferguson M. A. J., & Sacks D. L. J. (1992): Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO Journal*. 11: 3593–3600.
- Minter D. (1963): Three new sandflies (Diptera: Psychodidae) from East Africa, with notes on other species. *Bulletin of entomological research*. 54: 483–495.
- Morrison L. S., Goundry A., Faria M. S., Tetley L., Eschenlauer S. C., Westrop G. D., Dostalova A., Volf P., Coombs G. H., Lima A. P. C. A., & Mottram J. C. (2012): Ecotin-like serine peptidase inhibitor ISP1 of *Leishmania major* plays a role in flagellar pocket dynamics and promastigote differentiation. *Cellular microbiology*. 14: 1271–1286.
- Moskalyk L. A., Oo M. M., & Jacobs-Lorena M. (1996): Peritrophic matrix proteins of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect molecular biology*. 5: 261–268.
- Myskova J., Svobodova M., Beverley S. M., & Volf P. (2007): A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes and infection*. 9: 317–324.

- Paperna I., Boulard Y., Hering-Hagenbeck S. H., & Landau I. (2001): Description and ultrastructure of *Leishmania zuckermani* sp. amastigotes detected within the erythrocytes of the South African gecko *Pachydactylus turneri* Gray, 1864. *Parasite*. 8: 349–353.
- Pascoa V., Oliveira P. L., Dansa-Petretski M., Silva J. R., Alvarenga P. H., Jacobs-Lorena M., & Lemos F. J. (2002): *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect biochemistry and molecular biology*. 32: 517–523.
- Peters W. (1992): Peritrophic membranes. *Springer-Verlag Press*. Vol.2: 1–238. ISBN: 3-540-53635-3
- Pimenta P. F., Modi G. B., Pereira S. T., Shahabuddin M., & Sacks D. L. (1997): A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*. 115: 359–369.
- Pimenta P. F. P., Saraiva E. M. B., Rowton E., Modi G. B., Garraway L. A., Beverley S. M., Turco S. J., & Sacks D. L. (1994): Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Medical sciences*. 91: 9155–9159.
- Pimenta P., Turco S., McConville M., Lawyer P., Perkins P., & Sacks D. (1992): Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*. 256: 1812–1815.
- Pruzinova K., Sadlova J., Seblova V., Homola M., Votycka J., & Volf P. (2015): Comparison of bloodmeal digestion and the peritrophic matrix in four sand fly species differing in susceptibility to *Leishmania donovani*. *Plos One*. 10: 1–15.
- Pruzinova K., Votycka J., & Volf P. (2013): The effect of avian blood on *Leishmania* development in *Phlebotomus duboscqi*. *Parasites & vectors*. 6: 254.
- Ramalho-Ortigão M., Jochim R. C., Anderson J. M., Lawyer P. G., Pham V.-M., Kamhawi S., & Valenzuela J. G. (2007): Exploring the midgut transcriptome of *Phlebotomus papatasi*: comparative analysis of expression profiles of sugar-fed, blood-fed and *Leishmania major*-infected sandflies. *BMC genomics*. 8: 300.
- Ramalho-Ortigao J. M., Kamhawi S., Joshi M. B., Reynoso D., Lawyer P. G., Dwyer D. M., Sacks D. L., & Valenzuela J. G. (2005): Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect molecular biology*. 14: 703–712.
- Ramalho-Ortigao M., Saraiva E. M., & Traub-Csekö Y. M. (2010): Sand fly - *Leishmania* interactions: Long relationships are not necessarily easy. *The open parasitology journal*. 4: 195–204.
- Ramalho-Ortigao J. M. & Traub-Cseko Y. M. (2003): Molecular characterization of Llchit1, a midgut chitinase cDNA from the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. *Insect biochemistry and molecular biology*. 33: 279–287.

- Reynolds E. S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology*. 17: 208–212.
- Richards G. A. & Richards P. A. (1977): The peritrophic membranes of insects. *Annual review of entomology*. 22: 219–240.
- Richardson M. W. & Romoser W. S. (1972): The formation of the peritrophic membrane in adult *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*. 9: 495–500.
- Robles-Murguía M., Bloedow N., Murray L., & Ramalho-Ortigão M. (2014): Effect of mouse antisera targeting the *Phlebotomus papatasi* midgut chitinase PpChit1 on sandfly physiology and fitness. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 109: 1064–1069.
- Rogers M. E., Hajmová M., Joshi M. B., Sadlova J., Dwyer D. M., Volf P., & Bates P. A. (2008): *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cellular microbiology*. 10: 1363–1372.
- Rogers M. E., Chance M. L., & Bates P. a. (2002): The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*. 124: 495–507.
- Rohoušová I. & Volf P. (2006): Sand fly saliva: Effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia parasitologica*. 53: 161–171.
- Sacks D. & Kamhawi S. (2001): Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual review of microbiology*. 55: 453–483.
- Sacks D. L., Pimenta P. F., McConville M. J., Schneider P., & Turco S. J. (1995): Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *The journal of experimental medicine*. 181: 685–697.
- Sádlová J., Dvořák V., Šeblová V., Warburg A., Votypka J., & Volf P. (2013): *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to humans. *Parasites & vectors*. 6: 186–196.
- Sádlová J., Myšková J., Leštinová T., Votypka J., Matthew Y., & Volf P. (2016): *Leishmania donovani* development in *Phlebotomus argentipes*: comparison of promastigote- and amastigote-initiated infections. *Parasitology*. 1–8.
- Sádlová J., Reishig J., & Volf P. (1998): Prediuresis in female *Phlebotomus* sandflies (Diptera:Psychodidae). *European journal of entomology*. 95: 643–647.
- Sádlová J. & Volf P. (2009): Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. *Cell and tissue research*. 337: 313–325.

- Sádlová J., Yeo M., Šeblová V., Lewis M. D., Mauricio I., Volf P., & Miles M. (2011): Visualisation of *Leishmania donovani* fluorescent hybrids during early stage development in the sand fly vector. *PloS one*. 6: 1–9.
- Saraiva E. M., Pimenta P. F., Brodin T. N., Rowton E., Modi G. B., & Sacks D. L. (1995): Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*. 111: 275–287.
- Secundino N., Kimblin N., Peters N. C., Lawyer P., Capul A. A., Beverley S. M., Turco S. J., & Sacks D. (2010): Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. *Cell microbiology*. 12: 906–918.
- Senghor M., Faye M., Faye B., Diarra K., Elguero E., Gaye O., Banuls A., & Niang A. (2011): Ecology of phlebotomine sand flies in the rural community of Mont Rolland (Thies region, Senegal): area of transmission of canine leishmaniasis. *Plos One*. 6: 1–8.
- Senghor M. W., Niang A. A., Depaquit J., Ferté H., Faye M. N., Elguero E., Gaye O., Alten B., Perktas U., Cassan C., Faye B., & Bañuls A.-L. (2016): Transmission of *Leishmania infantum* in the canine leishmaniasis focus of Mont-Rolland, Senegal: Ecological, parasitological and molecular evidence for a possible role of *Sergentomyia* sand flies. *PLoS neglected tropical diseases*. 10: 1–17.
- Shahabuddin M., Toyoshima T., Aikawa M., & Kaslow D. C. (1993): Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Microbiology*. 90: 4266–4270.
- Shatova S. M. & Saf'ianova, V.M. Ovezmukhammedov A. (1991): An experimental study of the interrelations of *Leishmania* (Sauroleishmania) *gymnodactyli* and the sandfly *Sergentomyia arpaklensis* (Diptera: Phlebotominae). *Parazitologiya*. 25: 110–115.
- Shen Z. & Jacobs-lorena M. (1997): Characterization of a novel gut-specific chitinase gene from the human malaria vector *Anopheles gambiae*. *Journal of biological chemistry*. 272: 28895–28900.
- Shen Z. & Jacobs-Lorena M. (1998): A type I peritrophic matrix protein from the malaria vector *Anopheles gambiae* binds to chitin. *Journal of biological chemistry*. 273: 17665–17670.
- Schlein Y. & Jacobson R. L. (1994): Haemoglobin inhibits the development of infective promastigotes and chitinase secretion in *Leishmania major* cultures. *Parasitology*. 109: 1–6.
- Schlein Y. & Jacobson R. L. (1998): Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal. *Parasitology*. 117: 467–473.
- Schlein Y., Jacobson R. L., & Shlomai J. (1991): Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proceedings: Biological sciences*. 245: 121–126.

- Schlein Y. & Romano H. (1986): *Leishmania major* and *L. donovani*: Effects on proteolytic *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae). *Experimental parasitology*. 62: 376–380.
- Soares R. P. P., Macedo M. E., Ropert C., Gontijo N. F., Almeida I. C., Gazzinelli R. T., Pimenta P. F. P., & Turco S. J. (2002): *Leishmania chagasi*: Lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 121: 213–224.
- Stierhof Y. D., Bates P. a, Jacobson R. L., Rogers M. E., Schlein Y., Handman E., & Ilg T. (1999): Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *European journal of cell biology*. 78: 675–689.
- Sudha P. M. & Muthu P. (1988): Damage to the midgut epithelium caused by food in the absence of peritrophic membrane. *Current science*. 57: 624–625.
- Suresh P. V. & Chandrasekaran M. (1999): Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation. *Process biochemistry*. 34: 257–267.
- Tellam R. L. & Eisemann C. (2000): Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. *Insect biochemistry and molecular biology*. 30: 1189–1201.
- Terra W. R. (1988): Physiology and biochemistry of insect digestion: An evolutionary perspective. *Brazilian journal of medical and biological research*. 21: 675–734.
- Terra W. R. (1990): Evolution of digestive systems of insects. *Annual review of entomology*. 35: 181–200.
- Terra W. R. (2001): The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of insect biochemistry and physiology*. 47: 47–61.
- Terra W. R., Ferreira C., & Bianchi A. G. de. (1979): Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *Journal of insect physiology*. 25: 487–494.
- Vaidyanathan R. (2004): *Leishmania* parasites (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) reversibly inhibit visceral muscle contractions in Hemimetabolous and Holometabolous insects. *Journal of invertebrate pathology*. 87: 123–128.
- Vaidyanathan R. (2005): Isolation of a myoinhibitory peptide from *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and its function in the vector sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*. 42: 142–152.

- Villalon J. M., Ghosh A., & Jacobs-Lorena M. (2003): The peritrophic matrix limits the rate of digestion in adult *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of insect physiology*. 49: 891–895.
- Volf P., Benková I., Myšková J., Sádlová J., Campino L., & Ravel C. (2007): Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. *International journal for parasitology*. 37: 589–593.
- Volf P., Hajmová M., Sádlová J., & Votypka J. (2004): Blocked stomodeal valve of the insect vector: Similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International journal for parasitology*. 34: 1221–1227.
- Volf P. & Myskova J. (2007): Sand flies and *Leishmania*: Specific versus permissive vectors. *Trends in parasitology*. 23: 91–92.
- Volf P., Svobodová M., & Dvořáková E. (2001): Bloodmeal digestion and *Leishmania major* infections in *Phlebotomus duboscqi*: Effect of carbohydrates inhibiting midgut lectin activity. *Medical and veterinary entomology*. 15: 281–286.
- Volf P. & Volfova V. (2011): Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of vector ecology*. 36: 1–9.
- Wakid M. H. & Bates P. A. (2004): Flagellar attachment of *Leishmania* promastigotes to plastic film *in vitro*. *Experimental parasitology*. 106: 173–178.
- Walters L. L., Irons K. P., Guzman H., & Tesh R. B. (1993): Formation and composition of the peritrophic membrane in the sand fly *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*. 30: 179–198.
- Walters L. L., Irons K. P., Guzman H., & Tesh R. B. (1995): Peritrophic envelopes of *Lutzomyia spinicrassa* (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*. 32: 711–725.
- Walters L., Irons K., Modi G., & Tesh R. (1992): Refractory barriers in the sandfly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to infection with *Leishmania panamensis*. *American journal of tropical medicine and hygiene*. 46: 211–228.
- Warburg A. (2008): The structure of the female sand fly (*Phlebotomus papatasi*) alimentary canal. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*. 102: 161–166.
- WHO. (2014): Leishmaniasis home. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
- Wijers D. & Minter D. (1962): Studies on the vector of kala-azar in Kenya. I. - Entomological evidence. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 56: 462–472.
- Williams J. C., Hagedorn H. H., & Beyenbach K. W. (1983): Dynamic changes in flow rate and composition of urine during the post-bloodmeal diuresis in *Aedes aegypti*. *Journal of comparative physiology*. 153: 257–256.

Wilson V. C. L. C. & Southgate B. A. (1979): The lizard *Leishmania*. Biology of the kinetoplastida (Edit. Lumsden W. H. R. & Evans D. A). *Academic Press London*. Vol. 2: 241–268. ISBN: 0124602029

Zhang L. M. & Leng Y. J. (1997): Eighty-year research of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in China (1915-1995). II. Phlebotomine vectors of leishmaniasis in China. *Parasite*. 4: 299–306.