

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Lucie Tichá**

Přichytávání trypanosomatid v hmyzím přenašeči  
Attachment of trypanosomatids in the insect vector

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jitka Myšková, Ph.D.

Praha, 2017

**Prohlášení:**

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

V Praze, dne .....

.....

**Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Jitce Myškové, Ph.D. za ochotu, vstřícnost a cenné rady při psaní této bakalářské práce. Dále pak děkuji Janě Hlaváčové a Kateřině Růžičkové za pomoc při prvních krůčcích v laboratoři a v neposlední řadě i své rodině a přátelům za veškerou podporu.

## Abstrakt

Trypanosomatida je řád parazitických prvoků, jehož zástupci jsou známí především pro svůj lékařský či hospodářský význam. Rody *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Endotrypanum* a *Phytomonas* využívají dvouhostitelský způsob života. Část jejich životního cyklu tedy probíhá v hmyzím přenašeči, kde také dochází k přichycení parazitů, a to pomocí bičíků. Suprapylární leishmanie se liší v přichycení v závislosti na tom, jakého vektora využívají pro svůj přenos. Ve specifickém vektorovi je přichycení závislé na lipofosfoglykanu (LPG), zatímco v permissivním je interakce založena na jiném mechanismu (LPG nezávislý). Přichycení *Trypanosomy cruzi* v zadní části trávicího traktu plošnice se zdá být nezbytné pro metacyklogenezi. Podobnou strategii využívá i *Trypanosoma brucei*, u které ale dochází k přichycení ve slinných žlázách. Rody *Endotrypanum* a *Phytomonas* nejsou medicínsky významnými patogeny a o jejich životním cyklu mnoho nevíme. *Endotrypanum* se vyvíjí v trávicím traktu flebotomů stejně jako leishmanie, a proto by i mechanismus přichycení mohl být podobný. *Phytomonas* se zase vyvíjí ve slinných žlázách plošnic, což naznačuje podobnost s *T. brucei*. Na základě sesbíraných dat lze obecně shrnout, že je mechanismus přichycení u trypanosomatid založen na interakci proteinu (pravděpodobně lektinového typu) se sacharidy (glykoproteiny, glykolipidy). Celkově ale tato problematika není prozkoumaná do detailů.

**Klíčová slova:** Trypanosomatida, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Endotrypanum*, *Phytomonas*, hmyzí přenašeč, vývoj, přichytávání

## Abstract

*Trypanosomatids* are protozoan parasites known for its medical and economical significance. *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Endotrypanum* and *Phytomonas* genera are dioxenous parasites. Part of the life cycle takes place in the insect vector, where the parasites are attached using their flagella. Supraplyarian *Leishmania* differs in the binding method depending on the type of vector it uses for its transmission. The attachment is dependent on lipophosphoglycan (LPG) in a specific vector while in a permissive vector, the interaction is based on a different mechanism (LPG-independent). Attachment of *T. cruzi* in the posterior part of a digestive system of a hemipterous bugs appears to be necessary for metacyclogenesis. Similar strategy seems to be used by *T. brucei* which is attached in the salivary glands. The genera *Endotrypanum* and *Phytomonas* are not medically significant pathogens, thus their life cycles have not been profoundly researched. *Endotrypanum*, as well as *Leishmania*, develops in the digestive system of sand flies, thus the binding mechanism could be analogous. *Phytomonas* develops in the salivary glands of hemipterous bugs which denotes similarity with *T. brucei*. Based on the collected data, it is assumed that the binding mechanism of the Trypanosomatids is generally based on the lectin-like protein interaction with carbohydrates (glycoproteins, glycolipids). However, this topic has not been researched thoroughly to this date.

**Key words:** Trypanosomatids, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Endotrypanum*, *Phytomonas*, insect vector, development, attachment

## Seznam zkratek

<b>fPPG</b>	vláknitý proteofosfoglykan
<b>LPG</b>	lipofosfoglykan
<b>PM</b>	peritrofická matrix
<b>PMM</b>	perimikrovilární membrána
<b>PSG</b>	sekreční gel promastigotů
<b>GIPLs</b>	glykoinositolfosfolipidy
<b>VSG</b>	variabilní povrchové glykoproteiny

## Obsah

Úvod.....	1
1. <i>Leishmania</i> .....	2
1.1. Klasifikace leishmanií .....	2
1.2. Trávicí trakt flebotoma.....	3
1.3. Vývoj v přenašeči.....	5
1.4. Molekulární podstata přichycení.....	6
1.5. Přichycení k stomodeální valvě.....	11
2. <i>Trypanosoma</i> .....	12
2.1. <i>Sterkorární trypanosomy</i> .....	12
2.1.1 Vývoj v přenašeči.....	12
2.1.2. Přichycení v přenašeči.....	14
2.2. <i>Salivární trypanosomy</i> .....	15
2.2.1. Vývoj v přenašeči.....	15
2.2.2. Přichycení v přenašeči.....	17
3. <i>Endotrypanum</i> .....	18
3.1. Vývoj v přenašeči.....	19
3.2. Přichycení v přenašeči.....	20
4. <i>Phytomonas</i> .....	21
4.1. Vývoj v přenašeči.....	21
4.2. Přichycení v přenašeči.....	23
Závěr .....	24
Seznam použité literatury .....	25

## Úvod

Trypanosomatida je řád parazitických prvoků, který je významný především v tropech a subtropích, kde způsobuje celou řadu velmi vážných onemocnění. Mezi ty nejvýznamnější pro člověka patří spavá nemoc, Chagasova choroba a leishmanióza. Původci spavé nemoci jsou africké trypanosomy, konkrétně poddruhy *Trypanosoma brucei gambiense* a *Trypanosoma brucei rhodesiense*, které jsou přenášeny krevsajícím dvoukřídlym hmyzem rodu *Glossina*. Naproti tomu *Trypanosoma cruzi*, která způsobuje Chagasovu chorobu, je přenášena plošticemi z podčeledi Triatominae. Rod *Leishmania* je zase původcem leishmaniózy a přenašečem jsou flebotomové, krevsající hmyz rodu *Phlebotomus*, *Lutzomyia* a *Sergentomyia*. Zástupci tohoto řádu parazitují u všech tříd obratlovců a najdeme mezi nimi dokonce i patogeny rostlin. Mimo svůj lékařský význam tedy mohou způsobovat i značné hospodářské potíže.

V bakalářské práci se zabývám vývojem jednotlivých rodů dvouhostitelských trypanosomatid v hmyzím přenašeči s důrazem na způsob, jakým se v něm přichytávají. Místo kde k přichycení dochází i samotný mechanismus se totiž liší nejen mezi jednotlivými rody, ale i mezi samotnými druhy těchto rodů. Cílem této práce je tedy hlavně shrnout dosavadní poznatky o vývoji dvouhostitelských trypanosomatid a porovnat mechanismus, který pro své přichycení v přenašeči využívají. Životní strategii a medicínský, veterinární či hospodářský význam zmiňuji stručně. Soustředím se především na tu fázi životního cyklu, která je vázána na hmyzího přenašeče, na což navazuje vždy další kapitola shrnující dosud známé poznatky o přichycení. Zároveň bych ráda poukázala na fakt, že tato problematika u některých rodů dosud nebyla dostatečně prozkoumaná a mnoho o ní tedy nevíme. Přitom objasnění mechanismu přichytávání v přenašeči a lepší pochopení interakce mezi parazitem a vektorem je důležité hlavně z hlediska epidemiologie a může pomoci v boji proti těmto parazitům a nemocem, které způsobují.

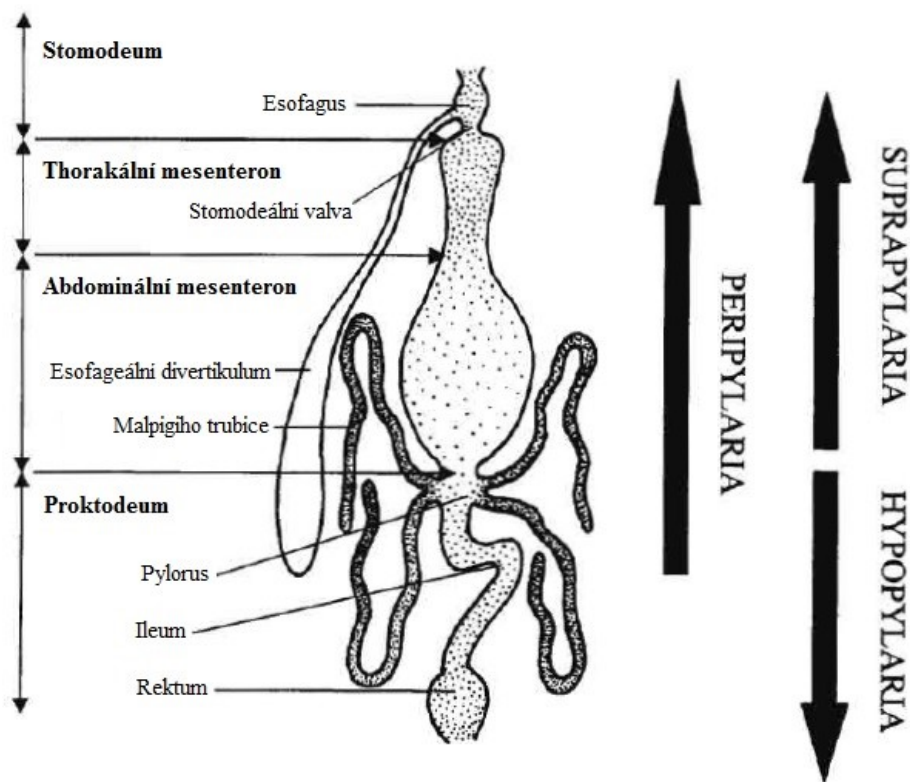
## 1. *Leishmania*

*Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) je rod parazitických prvoků, který je původcem leishmaniózy. Leishmanióza je vážné onemocnění, typické širokou škálou projevů, od méně závažné kožní formy až po smrtelnou viscerální. Oblastí jejího výskytu jsou tropy a subtropy. Přenašeči této nemoci jsou tzv. flebotomové, krevsající hmyz rodu *Phlebotomus*, *Lutzomyia* a *Sergentomyia* (Diptera: Psychodidae). Leishmanie kolonizují trávicí trakt flebotoma a právě vývoj a přichycení ve vektorovi je důležitou součástí jejich životního cyklu. Lepší pochopení vztahu patogen-vektor a objasnění mechanismu přichycení v přenašeči může hrát klíčovou roli v boji proti této nemoci.

### 1.1. Klasifikace leishmanií

Rod *Leishmania* můžeme z hlediska fylogeneze rozdělit do tří podrodů *Leishmania*, *Viannia* a *Sauroleishmania*. Podrod *Leishmania* je rozšířen jak v Novém tak ve Starém světě, podrod *Viannia* je rozšířen pouze v Novém světě a podrod *Sauroleishmania* ve Starém světě. Lékařsky nejvýznamnější jsou podrody *Leishmania* a *Viannia*, které jsou patogenní pro člověka, zatímco podrod *Sauroleishmania* napadá pouze plazy. Tyto podrody se mezi sebou mimo jiné liší odlišným způsobem vývoje v přenašeči (shrnutí v Lainson & Shaw, 1987).

V závislosti na místě přichycení ve střevě, směru migrace či způsobu přenosu lze tento rod rozdělit do tří skupin a to Hypopylaria, Peripylaria a Suprapylaria. Vývoj skupiny Hypopylaria je omezen pouze na zadní část střeva a způsob přenosu leishmanií je kontaminativní při defekaci. Skupina Peripylaria se taktéž nejprve vyvíjí v zadní části střeva, avšak poté leishmanie migrují anteriorně do přední části trávicího traktu. Suprapylaria se vyvíjejí pouze ve střední a přední části. Leishmanie ze skupin Suprapylaria a Hypopylaria jsou přenášeny inokulativně při sání flebotoma. Podrod *Leishmania* tedy odpovídá skupině Suprapylaria, podrod *Viannia* pak skupině Peripylaria a zástupci podrodu *Sauroleishmania* skupině s hypopylárním způsobem vývoje (shrnutí v Lainson & Shaw, 1987).

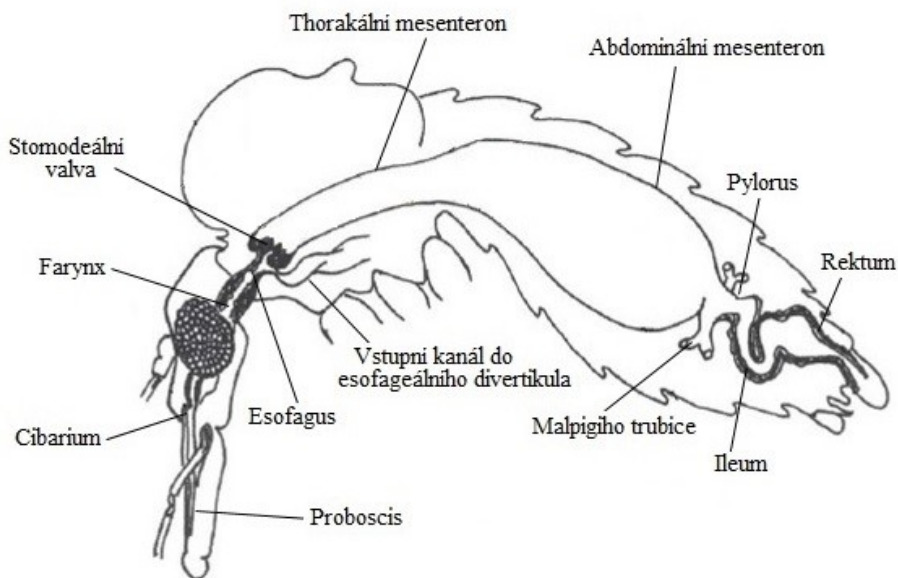


Obr. 1: Schématické znázornění vývoje skupin Suprapylaria, Peripylaria a Hypopylaria (podle Sádlová, 1999 – upraveno)

## 1.2. Trávicí trakt flebotoma

Po nasátí infikované krve se leishmanie dostávají do trávicího traktu flebotoma. Ten lze z morfoloického hlediska rozdělit na tři části a to stomodeum, mesenteron a proktodeum. Stomodeum je přední část traktu, kterou tvoří proboscis, cibarium, farynx, esofagus a esofageální divertikulum. Stomodeum je od mesenteronu odděleno stomodeální valvou, která pak hraje významnou roli při přenosu leishmanií. Mesenteron můžeme rozlišit na dvě části, užší thorakální a širší abdominální. Poslední částí trávicího traktu je proktodeum. Přejít mezi ním a mesenteronem tvoří pylorická valva, která je zároveň místem vyústění malpighických tubic. Proktodeum se skládá z pyloru, ilea, rektálních ampulí a rekta (shrnutí v Molyneux & Killick-Kendrick, 1987). Stomodeum i proktodeum jsou tvořeny chitinovou výstelkou, naproti tomu mesenteron je tvořen epitelem s mikrovily (shrnutí v Molyneux & Killick-Kendrick, 1987; Warburg, 2008).





Obr. 2: Schématické znázornění trávicího traktu flebotoma (podle Kamhawi, 2006 – upraveno)

Důležitou součástí trávicího traktu je peritrofická matrix (PM), která je tvořena z chitinových mikrofibril, proteinů a proteoglykanů (shrnutí v Peters, 1992). Peritrofická matrix flebotomů je syntetizována epiteliálními buňkami střeva již během několika hodin po sání flebotoma a funguje jako štít, který obklopuje krevní tráveninu (Gemetchu, 1974). Jejím úkolem je především ochrana mikrovilárního epitelu mesenteronu před mechanickým poškozením, ale také před patogeny a toxiny. Funguje jako polopropustná bariéra pro trávicí enzymy a napomáhá i k efektivnějšímu trávení krve (shrnutí v Lehane, 1997; Secundino a kol., 2005). Přítomnost peritrofické matrix totiž vede ke vzniku tzv. trávicích proudů. Díky nim dochází ke vstřebávání živin v přední části mesenteronu a v zadní části pak dochází k recyklaci trávicích enzymů (shrnutí v Terra, 1990). Dalším důležitým úkolem je detoxikace. Pascoa a kol. (2002) došli k závěru, že peritrofická matrix hraje roli při sekvestraci toxického hemu, kdy se hem naváže k matrix a spolu se zbytky potravy je pak vyloučen při defekaci. Pimenta a kol. (1997) se domnívají, že peritrofická matrix chrání leishmanie před hydrolytickou aktivitou trávicích enzymů během časně fáze infekce, kdy jsou nejvíce náchylní k proteolýze. Potlačení formace peritrofické matrix ve střevě *Phlebotomus papatasi* vedlo ke ztrátě infekce a *Leishmania major* zde nebyla schopna dokončit svůj vývoj. Zatím se ale zdá, že některé novější experimenty tuto teorii vyvrací (Růžičková, ústní sdělení).

### 1.3. Vývoj v přenašeči

Rod *Leishmania* se řadí mezi dvouhostitelská trypanosomatida, tudíž je jejich vývoj a přenos zcela závislý na vektorovi. Nejvíce studií týkajících se interakce mezi parazitem a vektorem, bylo zaměřeno na výzkum leishmanií se suprapylárním způsobem vývoje. Proto i níže shrnutý životní cyklus bude popisovat právě vývoj skupiny Suprapylaria.

Infekce je iniciována nasátím krve s fagocyty infikovanými amastigoty. Nasátá krev putuje až do oblasti abdominálního mesenteronu a již během několika hodin po sání je obalena peritrofickou matrix, která je syntetizována epiteliálními buňkami střeva (Gemetchu, 1974; Walters a kol., 1993). Zde se parazité vyvíjejí a během několika dní po sání dochází k diferenciaci a replikaci. Kulovitá až lehce oválná bezbičíkatá amastigotní stádia se již během několika hodin po sání transformují v procyklické promastigoty. Jedná se o drobné, pomalé stádium s krátkým bičíkem, které slouží především ke zmnožení počtu parazitů ve střevě (shrnuto v Bates & Rogers, 2004). Po objevení chitinolytické aktivity leishmanií byli Schlein a kol. (1991) přesvědčeni, že k porušení peritrofické matrix využívají tyto parazité právě své chitinázy. Novější studie ale ukázala, že k úniku z endoperitrofického prostoru dochází díky chitinázám ve střevě flebotoma a leishmanie pouze pasivně vyčkávají na tento moment (Sádlová & Volf, 2009). Aby nedošlo po rozpadu peritrofické matrix k vyloučení parazitů spolu se zbytky nestrávené potravy, musí se procykličtí promastigoti transformovat v nektomonády (Rogers a kol., 2002; shrnuto ve Volf a kol., 2008). Toto dlouhé, štíhlé stádium, které se velmi rychle pohybuje, se poté přichycuje pomocí bičíku mezi mikrovily střevního epitelu (Killick-Kendrick a kol., 1974; Warburg a kol. 1989; shrnuto v Bates, 2008). Později se opět uvolňují a migrují do thorakální části mesenteronu, kde se nektomonády vyvíjejí v krátké leptomonády (shrnuto v Bates & Rogers, 2004). Ty produkují tzv. PSG, sekreční gel promastigotů (Rogers a kol., 2002), jehož hlavní složkou je fPPG, vláknitý proteofosfolykan (Stierhof a kol., 1999). V thorakální části mesenteronu působí PSG jako rezervoár pro leptomonády a dochází zde k jejich diferenciaci v metacyklické promastigoty (Rogers a kol., 2002). Za normálních okolností je stomodeální valva mimo sání uzavřena, PSG však jejímu uzavření brání, což znemožňuje flebotomovi úplné a efektivní nasátí. Místo toho dochází k opakovanému sání a regurgitaci parazitů spolu s již nasátou krví do těla hostitele

(Stierhof a kol., 1999; Rogers a kol., 2002). V novější studii prokázali Rogers a kol., (2004) vliv fPPG na průběh infekce a zajištění přenosu parazitů. Současná inokulace metacyklických promastigotů spolu s PSG do těla obratlovčího hostitele výrazně zhoršuje průběh infekce oproti inokulaci samotných leishmanií.

V oblasti stomodeální valvy můžeme najít dvě stádia a to haptomonády a metacyklické promastigoty. Haptomonády se přichytávají k epitelu stomodeální valvy a narušují její funkci (viz kapitola 1.5.). Stádium metacyklických promastigotů je infekční pro obratlovčího hostitele. Mají poměrně krátké a štíhlé tělo a jsou velmi pohybliví (shrnuto v Bates & Rogers, 2004).

#### 1.4. Molekulární podstata přichycení

Rozpad peritrofické matrix a následná defekace samice flebotoma jsou důležitými momenty, které určují, zda budou leishmanie schopny svůj vývoj v těle přenašeče úspěšně dokončit (Walters a kol., 1992). Aby nedošlo k vyloučení leishmanií spolu se zbytky nestrávené potravy, musí se leishmanie přichytit ke střevnímu epitelu (Pimenta a kol., 1992). K tomu využívají své bičíky, které vkládají mezi mikrovily (Killick-Kendrick a kol., 1974; Warburg a kol., 1989). Ukázalo se však, že molekulární mechanismus přichycení v přenašeči je u různých druhů flebotomů odlišný a souvisí se specifitou flebotoma vůči jednotlivým druhům leishmanií. Podle míry specifity flebotomů k leishmaniím lze rozdělit vektory na specifické a permissivní. Specifický vektor umožňuje úspěšný vývoj a přenos pouze jednoho druhu leishmanií, zatímco v permissivním vektorovi se dokáže vyvíjet hned několik druhů (shrnuto ve Volf & Myšková, 2007).

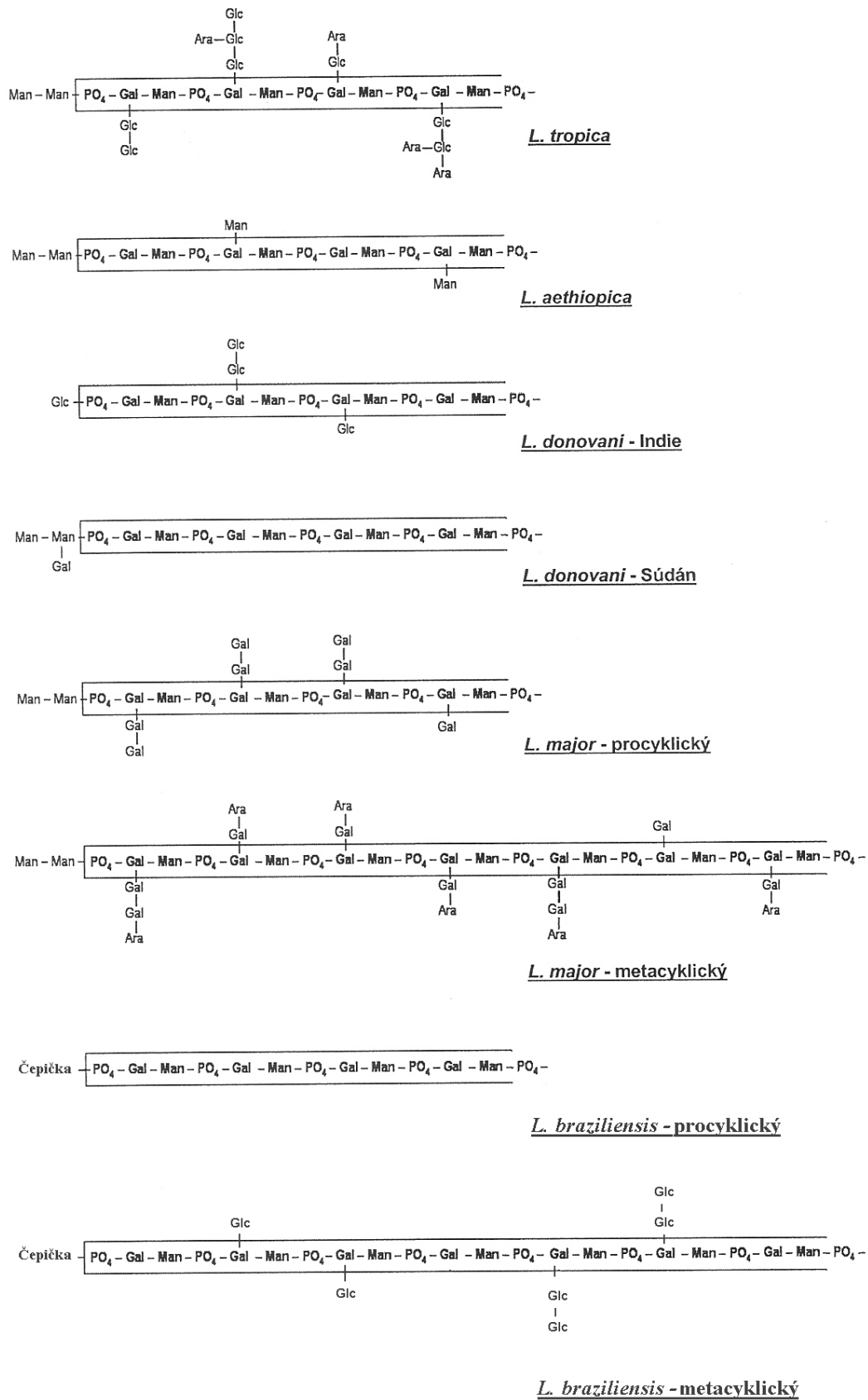
Vůbec nejprobádanější skupinou jsou leishmanie se suprapylárním způsobem vývoje, a proto se i v této kapitole budu zabývat pouze mechanismem, který pro své přichycení využívají právě ony. Přesto bych nyní ráda krátce zmínila i leishmanie ze skupiny Peripylaria. U této skupiny leishmanií dochází po rozpadu peritrofické matrix k migraci do zadní části trávicího traktu. Zde se výrazně zkráceným bičíkem přichytávají ke kutikulární výstelce pyloru a rekta pomocí hemidesmosomů. Poté leishmanie migrují do přední části trávicího traktu a od této fáze již vývoj probíhá podobně jako u leishmanií se suprapylárním způsobem vývoje (Walters a kol., 1989; Walters, 1993).

### *Přichycení závislé na LPG*

Jak již bylo zmíněno výše, některé druhy flebotomů jsou schopny přenášet pouze jeden určitý druh leishmanií. Asi nejvíce prozkoumaným příkladem této vysoce specifické interakce mezi vektorem a parazitem je *Phlebotomus papatasi* a *Leishmania major* (Pimenta a kol., 1994). Dále můžeme zmínit *P. sergenti*, který vykazuje vysokou specifitu vůči *L. tropica* (Kamhawi a kol., 2000) a *P. duboscqi*, který přenáší *L. major* (Svárovská a kol., 2010).

Leishmanie pro své přichycení k epitelu mesenteronu specifického vektora využívají LPG, povrchový lipofosfoglykan (shrnutí v Kamhawi, 2006). LPG je jednou z hlavních molekul syntetizovaných leishmaniemi a pravděpodobně se podílí na celé řadě interakcí. Turco & Descoteaux (1992) se ve své práci zabývají detailním popisem struktury a funkce lipofosfoglykanu. LPG se nachází na celém povrchu promastigotních forem včetně bičíku a skládá se ze čtyř domén. Fosfodisacharidová kostra tvořená z opakujících se jednotek (-Gal-Man-PO<sub>4</sub>) je spolu s fosfatidylinositolovou kotvou spojena fosforylovaným hexasacharidem a tvoří konzervovanou část. Variabilní část je pak tvořena postranními sacharidovými řetězci a oligosacharidovou čepičkou. Boční sacharidové řetězce jsou jak stadiálně tak druhově velmi specifické a pravděpodobně určují míru specifity vektora k leishmaniím.

McConville a kol. (1990) popsali ve struktuře substituovaného LPG u *L. major* terminální galaktózové zbytky. O něco později se McConville a kol. (1995) zaměřili na složení těchto bočních sacharidových řetězců i u několika dalších druhů leishmanií. U *L. tropica* je většina opakujících se jednotek LPG substituována více než 19 různými glykanovými řetězci, které jsou většinou zakončeny buď arabinózou, nebo glukózou. LPG je vysoce mezidruhově polymorfní a značný polymorfismus byl potvrzen i v rámci různých kmenů samotného druhu. Analýza LPG u různých kmenů *L. major* ukázala, že zatímco některé z nich mají lipofosfoglykan vysoce substituovaný galaktózou a ty se dále liší i v délce bočních řetězců, jiné kmeny nemají téměř žádné substituce (McConville a kol., 1995, Dobson a kol., 2010). Odlišná struktura LPG u různých kmenů leishmanií byla popsána i u *L. donovani* (Mahoney a kol., 1999), *L. tropica* (Soares a kol., 2004; Svobodová a kol., 2006) či *L. infantum* (= *chagasi*) (Soares a kol., 2002; Coelho-Finamore a kol., 2011).



Obr. 3: Schématické znázornění druhově a stadiálně variabilních částí LPG (podle Myšková, 2007 – upraveno)

LPG se podílí na celé řadě interakcí. Dříve se předpokládalo, že jeho hlavní funkcí je ochrana parazita před hydrolytickými proteázami uvnitř přenašeče během časné fáze infekce (Schlein a kol., 1990). Změna složení a struktury LPG je nezbytná pro opětovné uvolnění leishmanií z epitelu střeva, aby mohlo následně dojít k jejich migraci do přední části trávicího traktu (Pimenta a kol., 1992). LPG se také liší u různých stádií leishmanií. Při metacyklogenezi dochází ke změně struktury LPG, kdy se výrazně prodlužují repetitivní sekvence disacharidové kostry a taktéž dochází ke změnám v terminálních sacharidech. Při metacyklogenezi *L. major* dochází k nahrazení postranních řetězců zakončených galaktózou za řetězce zakončené arabinózou (McConville a kol., 1992). Prodlužování repetitivních sekvencí disacharidové kostry při metacyklogenezi bylo pozorováno i u *L. donovani* (Sacks a kol., 1995). Modifikace LPG u metacyklických stádií se uplatňuje především po proniknutí do obratlovčího hostitele, kdy LPG zřejmě zvyšuje odolnost leishmanií vůči komplementu (McConville a kol., 1992).

Přežití *L. major* a nikoliv jiných druhů leishmanií v *P. papatasi* je umožněno díky druhově specifickým modifikacím povrchového LPG (Pimenta a kol., 1992; Pimenta a kol., 1994; shrnuto v Kamhawi, 2006). Střevním receptorem *P. papatasi* pro LPG *L. major* je 25 kDa galektin, PpGalec. Nachází se v celé oblasti mesenteronu na lumenálnímu povrchu střevních buněk. PpGalec je exprimován již během larválních stádií a jeho exprese je podstatně zvýšena u dospělých samic. Role tohoto galektinu při vazbě *L. major* k epitelu střeva byla potvrzena přidáním protilátek proti PpGalec do krve sítě flebotomy, kdy došlo k výraznému snížení počtu promastigotních stádií ve střevě *P. papatasi* (Kamhawi a kol., 2004). Ukazuje se však, že správně modifikovaný LPG není sám o sobě dostačující pro úspěšný vývoj leishmanií ve vektorovi. Speciálně upravená linie *L. donovani* exprimující LPG totožný s LPG *L. major* se totiž nebyla schopná v *P. papatasi* vyvíjet (Dobson a kol., 2010). Ve specifickém přenašeči *P. papatasi* se patrně uplatňuje při vazbě leishmanií ještě další molekula, bičíkový protein FLAG1/SMP1. Protilátky proti FLAG1/SMP1 zamezily vývoji *L. major* ve střevě *P. papatasi*, avšak u *L. infantum* v permisivním vektorovi *Lutzomyia longipalpis* k žádnému potlačení nedošlo. FLAG1/SMP1 sám o sobě pravděpodobně neumožňuje přežití *L. major* v *P. papatasi*, ale v kombinaci s LPG je tento protein pro přichycení nezbytný a může ještě zvýšit specifitu vektora vůči leishmaniím (Di-Blasi a kol., 2015).

## *LPG nezávislé přichycení*

Přestože se většina studií zabývajících se molekulární podstatou přichycení leishmanií v přenašeči zabývala pouze specifickými vektory, většinu druhů flebotomů ale řadíme mezi vektory permisivní, kteří jsou schopni podporovat vývoj více druhů leishmanií. Mezi takové flebotomy patří např. *Lutzomyia longipalpis*, *P. arabicus*, *P. argentipes* či *P. perniciosus* (shrnutí v Dostálová & Volf, 2012).

Zatím není zcela zřejmé, jaký mechanismus stojí za schopností leishmanií přichytit se ve střevě permisivních vektorů. V minulosti bylo navrženo hned několik potenciálních molekul, které mohou vazbu k epitelu střeva zprostředkovávat. Jednalo se o membránové proteiny bičíku (Warburg a kol., 1989) nebo konzervovanou část LPG leishmanií (Pimenta a kol., 1994; Sacks a kol., 2000). Na druhou stranu se ale ukázalo, že leishmanie deficientní v povrchovém LPG se v permisivních přenašečích úspěšně vyvíjejí (Rogers a kol., 2004; Myšková a kol., 2007; Svárovská a kol., 2010). Je tedy zřejmé, že přichycení a vývoj leishmanií v permisivních vektorech jsou na LPG nezávislé (shrnutí ve Volf a Myšková, 2007).

Některé studie našly souvislost mezi typem glykosylace střevních proteinů a permisivitou vektora (Svobodová a kol., 2006; Myšková a kol., 2007). O-glykosylované proteiny nacházející se na mikrovilárním epitelu střeva permisivních vektorů se specificky vážou k povrchu promastigotních stádií a tato vazba je pravděpodobně umožněna díky lektinovým receptorům leishmanií (Myšková a kol., 2007, 2016). Nově objevený O-glykoprotein ve střevě *Lu. longipalpis* popsali Myšková a kol. (2016) jako LuloG. Jeho struktura je podobná mucinu a nachází se na lumenální straně epitelálních buněk střeva. Rekombinantní protein rLuloG se silně vázal k povrchu promastigotních stádií *in vitro*. Avšak protilátky proti rekombinantnímu LuloG neměly na potlačení infekce *in vivo* žádný vliv. Přesto se autoři domnívají, že právě tato molekula může hrát důležitou roli při vazbě leishmanií ve střevě *Lu. longipalpis*.

Receptor na povrchu leishmanií, který by se interakce s permisivním vektorem účastnil, není dosud znám. Mohl by jím být protein se specifitou k heparinu, nebo jiný typ lektinového receptoru. Molekuly lektinového typu byly již dříve popsány na povrchu promastigotů a amastigotů (Mukhopadhyay a kol., 1989; Svobodová a kol., 1997). Přítomnost heparin vázajících proteinů na povrchu *L. (V.) braziliensis* a jejich

podíl na vazbě k buněčným liniím *Lu. longipalpis in vitro* potvrdili i de Castro Côrtes a kol. (2012). Jako další molekuly, které by mohly přichycení leishmanií v permisivních vektorech zprostředkovávat, byly navrženy povrchové peptidázy leishmanií (gp63) spolu s fosfoglykany. Jejich role při přichycení k epitelu střeva byla zatím prokázána pouze *in vitro* (Soares a kol., 2017).

Interakce leishmanií s různými přenašeči byla dobře popsána u *Leishmania tropica*. Typickým a zároveň specifickým přenašečem tohoto druhu je *Phlebotomus sergenti* (Al-Zahrani a kol., 1988), v Izraeli byl však jako přenašeč identifikován také *P. arabicus*. (Jacobson a kol., 2003; Svobodová a kol. 2006). Způsob přenosu a příčinu rozdílných vektorů tohoto druhu leishmanie zkoumali Svobodová a kol. (2006) ve dvou různých ohniscích v Izraeli. V severní části byla *L. tropica* přenášena permisivním vektorem *P. arabicus*, zatímco v jižním ohnisku byla přenášena specifickým *P. sergenti*. Ukázalo se, že kmen izolovaný ze severní části se mohl vyvíjet pouze v *P. arabicus* a nikoliv i v *P. sergenti*, jak by se dalo předpokládat. Tento kmen měl totiž pozměněné LPG, jehož postranní sacharidové řetězce byly terminálně zakončené galaktosou, zatímco ostatní kmene *L. tropica* mají tyto řetězce zakončeny glukosou.

### 1.5. Přichycení k stomodeální valvě

Dalším důležitým momentem vývoje leishmanií uvnitř přenašeče je vazba haptomonádních forem k epitelu stomodeální valvy. Haptomonády mají tělo hruškovitého tvaru s krátkým bičíkem a jsou nepohyblivé (shrnutí v Bates & Rogers, 2004). Přichytávají se k povrchu stomodeální valvy pomocí hemidesmosomů a narušují tak její funkci (Killick-Kendrick a kol., 1974). Na modelu *Phlebotomus papatasi* a *Leishmania major* Schlein a kol. (1992) poprvé popsali chitinolytickou aktivitu leishmanií. Díky produkci chitinolytických enzymů pak dochází k ještě závažnějšímu poškození stomodeální valvy, přičemž její blokáce a porušení epitelu usnadňuje přenos parazitů do hostitele (Volf a kol., 2004). Podobnou strategii využívají i některé trypanosomy, proto se Volf a kol. (2004) domnívají, že je tento trend rozšířen i u některých dalších trypanosomatid.



## 2. *Trypanosoma*

Zástupci rodu *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) parazitují u všech tříd obratlovců a kromě toho, že způsobují řadu onemocnění, mají i ekonomický význam. Podle způsobu vývoje v přenašeči je lze rozdělit do několika skupin. První skupinou jsou Salivaria, které se během pozdní fáze infekce vyvíjejí v přední části trávicího traktu přenašeče, kterým je nejčastěji dvoukřídlý hmyz. Pro trypanosomy ze skupiny Sterkoraria je naopak typické soustředění vývoje v zadní části traktu a přenášeny jsou plošticemi. Jak již bylo řečeno, tento rod parazituje na nejrůznějších obratlovcích, výjimku netvoří ani ryby a obojživelníci. V tomto prostředí jsou přenášeny nejčastěji pijavkami, nebo mechanicky pozřením vektora.

### 2.1. *Sterkorární trypanosomy*

Do skupiny Sterkoraria patří *Trypanosoma cruzi*, která je původcem americké trypanozomiázy, neboli Chagasovy choroby. Akutní fáze této nemoci je poměrně mírná, trvá několik týdnů, až postupně přechází do fáze chronické. Během ní dochází k nenávratnému poškození některých orgánů, jako jsou srdce, jícen či střeva (shrnuto v Moncayo & Ortiz Yanine, 2006). Místem jejího rozšíření je Střední a Jižní Amerika, kde je přenášena plošticemi z podčeledi *Triatominae*. Mezi nejvýznamnější vektory této nemoci patří rody *Triatoma*, *Panstrongylus* a *Rhodnius* (shrnuto v Brener, 1973).

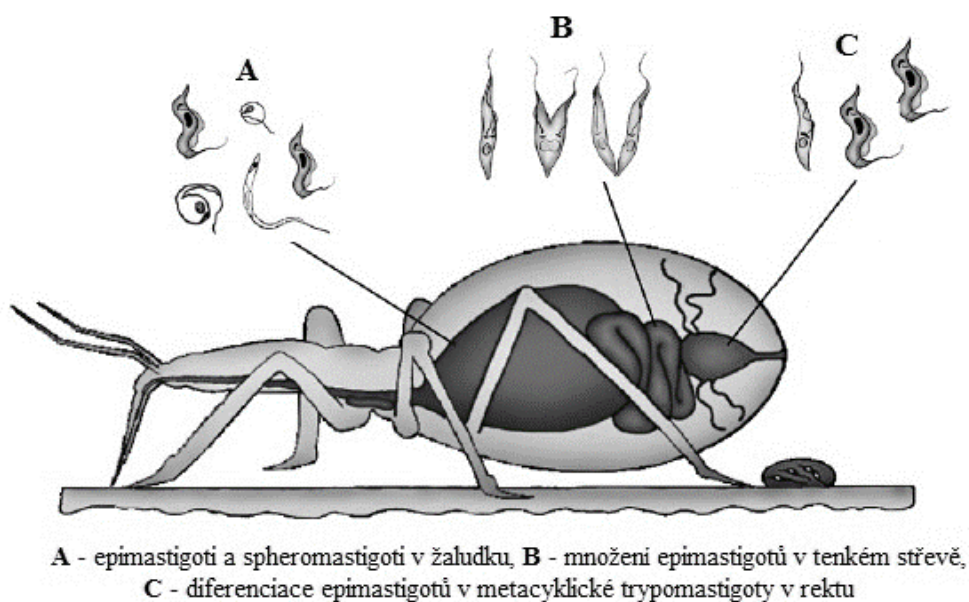
Pro tento druh je typických několik morfologických forem, které jsou definovány pozicí kinetoplastu a flagelární kapsy vůči jádru. Trypomastigoti mají kinetoplast a flagelární kapsu na posteriorním konci buňky a jsou podlouhlí. Poté co proniknou do buněk obratlovčího hostitele se vyvíjejí v amastigoty, což jsou menší, kulaté či oválné formy bez viditelného vnějšího bičíku. Spheromastigoti jsou podobní amastigotům, ale mají dlouhý bičík. Epimastigoti mají tělo většinou vřetenovitého tvaru, kinetoplast a flagelární kapsa jsou na anteriorním konci buňky (shrnuto v Garcia a kol., 2010).

#### 2.1.1 Vývoj v přenašeči

Trávicí trakt ploštice lze rozdělit do tří částí. Přední část tvoří cibarium, farynx a esofagus. Dále následuje střední část, která začíná oblastí cardie, za kterou se nachází

silně roztažitelný žaludek a tenké střevo. Poslední částí trávicího traktu je ileum, což je místo vyústění malpighických trubic, a rektum (shrnutí v Garcia a kol., 2010).

Vývoj v přenašeči je iniciován nasátím infikované krve s trypomastigoty (shrnutí v Garcia & Azambuja, 1991). Krev je nasávána do žaludku, kde se hromadí a zároveň zde dochází k lýze erytrocytů (Azambuja a kol., 1983). Poté prochází po menších částech do tenkého střeva, které je místem vlastního trávení a vstřebávání živin (shrnutí v Garcia a kol., 2010). U krevsajících ploštic nedochází k tvorbě peritrofické matrix v přímém slova smyslu. Po nasátí krve se vytváří tzv. perimikrovilární membrána (PMM). Ta podobně jako peritrofická matrix chrání epitel střeva, na rozdíl od ní ale neobsahuje chitin (Lane & Harrison, 1979; Billingsley & Downe, 1983; Silva a kol., 2004). Perimikrovilární membrána je nejvíce patrná asi 10 dní po nasátí (Billingsley & Downe, 1983; Nogueira a kol., 1997) a její formace je regulována pomocí neuroendokrinního systému ploštice (Nogueira a kol., 1997; Gonzalez a kol., 1999).



Obr. 4: Schématické znázornění vývoje *T. cruzi* v trávicím traktu ploštice (podle Garcia, 2007 – upraveno)

V počátku infekce trypomastigoti diferencují v některá další stádia a to nejčastěji epimastigoty, kteří se v trávicím traktu množí. Mimo ně ale v menší míře můžeme pozorovat i amastigotní a hlavně spheromastigotní stádia (shrnutí v Garcia a kol., 2010). Parazité se v přenašeči nejprve množí a poté se shromažďují v zadní části

trávicího traktu. Během pozdějších fází infekce dochází k přichycení epimastigotních stádií jak k PMM, tak i k epitelu tenkého střeva a rektu (viz kapitola 2.1.2.). Rektum je zároveň místem metacyklogeneze, což je proces, při kterém dochází k diferenciaci parazitů v infekční metacyklické trypomastigoty (shrnuto v Kollien & Schaub, 2000). Zdá se, že přichycení epimastigotů je nezbytné k tomu, aby mohlo dojít k jejich metacyklogenezi. *In vitro* experimenty ukázaly, že se parazité před metacyklogenezí nejprve přichytili k substrátu a až poté diferencovali v metacyklická stadia (Bonaldo a kol., 1988). Způsob přenosu infekčních stádií do obratlovčího hostitele je kontaminativní (shrnuto v Garcia & Azambuja, 1991).

### 2.1.2. Přichycení v přenašeči

U *Trypanosomy cruzi* je konečná fáze vývoje soustředěna do zadní části trávicího traktu přenašeče. K přichycení epimastigotů dochází především v posteriorní části tenkého střeva a v rektu. Vzhledem k tomu, že se parazité přichytávají v částech trávicího traktu, které mají odlišnou strukturu, využívají i rozdílné mechanismy pro své přichycení. Tenké střevo je entodermálního původu a je pokryto mikrovily. Ty před poškozením chrání perimikrovilární membrána, ke které se epimastigotní stadia přichytávají pomocí bičíku (shrnuto v Kollien & Schaub, 2000). Pokud v některých místech PMM chybí, nebo je špatně vyvinutá, dochází k přímému kontaktu epimastigotů s mikrovily. V tomto případě epimastigoti vmezeří své bičíky, případně i samotná těla, přímo mezi mikrovily (Kollien a kol., 1998). Přichycení parazitů k perimikrovilární membráně se zdá být nezbytné, jelikož protilátky proti PMM a střevním tkáním *Rhodnius prolixus* výrazně potlačili vývoj *T. cruzi* v přenašeči (Gonzalez a kol., 1999, 2006). Vazba parazitů k PMM je pravděpodobně umožněna díky hydrofobním proteinům na povrchu epimastigotních stádií a glykoproteinům perimikrovilární membrány (Alves a kol., 2007). Roli povrchových molekul při interakci parazita s vektorem potvrdili již dřívější studie. Delece v genu kódující povrchové glykoproteiny u *T. cruzi* ovlivnila morfologii parazitů a znemožnila tak jejich přichycení v přenašeči (de Jesus a kol., 1993). Mezi hlavní povrchové molekuly *T. cruzi* patří glykoinositolfosfolipidy (GIPLs) (shrnuto v Colli & Alves, 1999), které jsou patrně další z komponent, které se na přichycení parazitů v tenkém střevě podílejí. Ukázalo se totiž, že nízké koncentrace GIPLs znemožnili epimastigotům jejich přichycení *in vitro* a zároveň čisté GIPLs se silně vázaly k epitelu tenkého střeva.

Nicméně domnělý receptor vázající GIPLs zatím nebyl objeven (Nogueira a kol., 2007). Rektum je naopak ektodermálního původu a je tedy vystláno vrstvou kutikuly. Epimastigoti se zde přichytávají pomocí speciálně modifikovaného bičíku na principu hemidesmosomů (shrnuto v Kollien & Schaub, 2000). Ukázalo se, že přichycení epimastigotů ke kutikulární výstelce rekta je pravděpodobně umožněno díky nespecifické hydrofobní interakci s vrstvou vosku, kterou je kutikula kryta (Schaub a kol., 1998; Kleffmann a kol., 1998).

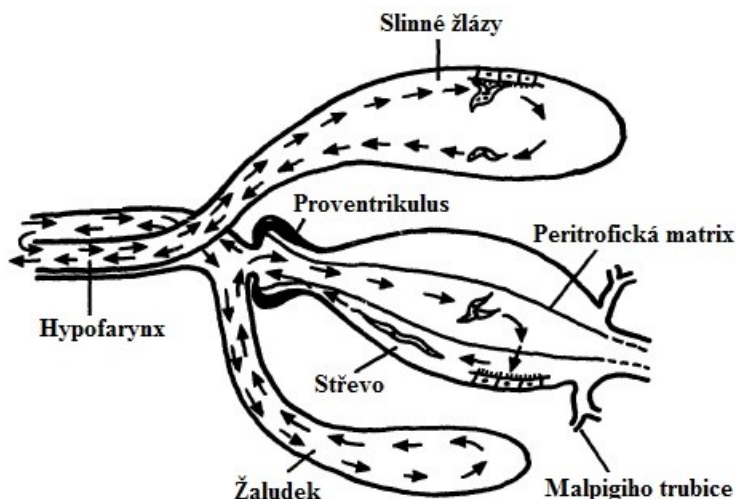
## **2.2. Salivární trypanosomy**

Mezi nejvýznamnější zástupce skupiny Salivaria řadíme trypanosomy z komplexu *Trypanosoma brucei*, které jsou původcem tzv. africké trypanozomiázy, též známé jako spavá nemoc. Tato nemoc má dvě formy, chronickou a akutní. Ve většině případů spavé nemoci se jedná o formu chronickou, kterou způsobuje poddruh *T. brucei gambiense*. Její rozšíření je především v západní a střední Africe. Akutní forma spavé nemoci je způsobena poddruhem *T. brucei rhodesiense* a místem jejího rozšíření je hlavně východní a jižní Afrika. Oba tyto poddruhy jsou přenášeny krevsajícím dvoukřídłym hmyzem rodu *Glossina*, neboli mouchami tse-tse (shrnuto v Welburn a kol., 2001; Malvy & Chappuis, 2011).

Trypanosomy patřící do komplexu *T. brucei* během svého vývoje vytvářejí pouze dvě morfologické formy a to trypomastigoty a epimastigoty. Tyto morfotypy jsou společné pro celý rod *Trypanosoma* a jejich definice byla detailně popsána v kapitole týkající se *Trypanosomy cruzi*. U tohoto druhu ale na rozdíl od *T. cruzi* nenajdeme stádium amastigotů (Bruce a kol., 1911; shrnuto v Sharma a kol., 2009).

### **2.2.1. Vývoj v přenašeči**

Přední část trávicího traktu přenašeče tvoří proboscis, hypofarynx, farynx a esofagus. Přes proventrikulus je krev nasávána do oblasti žaludku, odkud se pak postupně uvolňuje do střeva, kde dochází k vlastnímu trávení. Zadní část střeva je místem vyústění malpigických trubic a zakončuje ji rektum. Důležitou částí trávicího traktu pro vývoj *T. brucei* jsou párové slinné žlázy (shrnuto v Minchin, 1905).



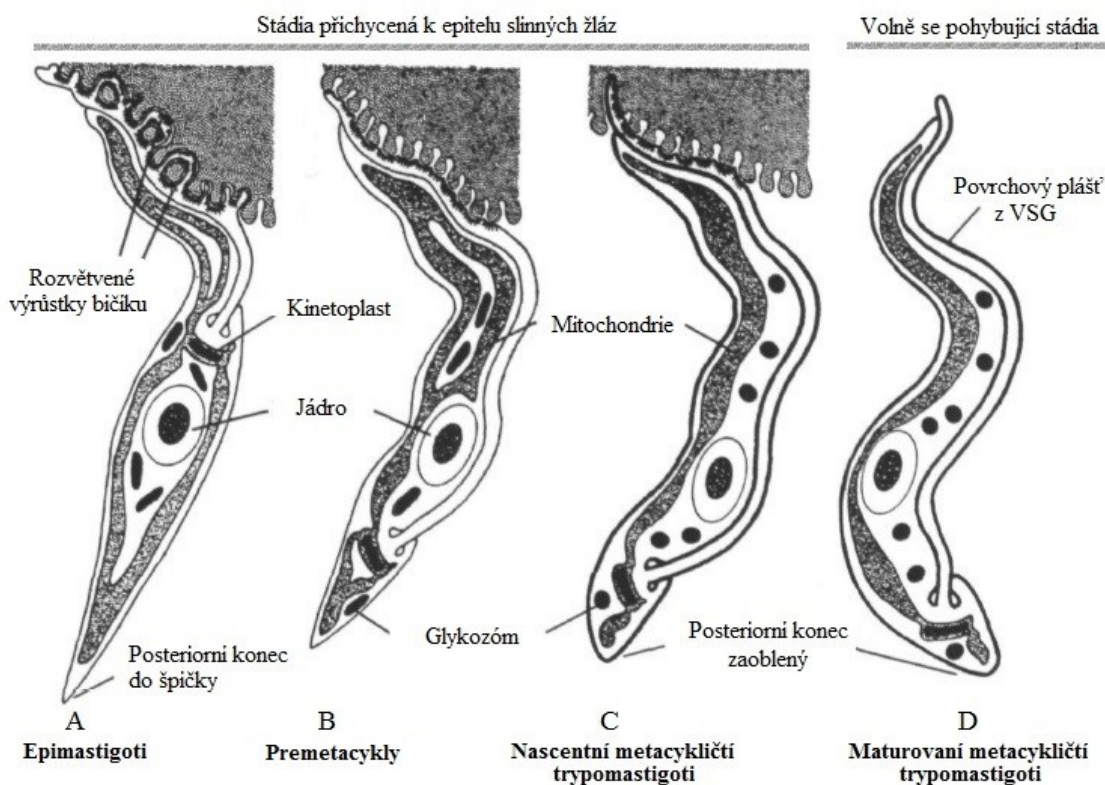
Obr. 5: Schématické znázornění vývoje *T. brucei* v trávicím traktu mouchy tse-tse (podle Evans & Ellis, 1983; převzato z Vickerman a kol., 1988 – upraveno)

V obratlovčím hostiteli se trypanomastigoti vyskytují ve dvou formách. Dělicí se štíhlé formy dávají vzniknout tlustším formám, které se již nedělí. Pouze tlustší formy jsou schopné přežít v trávicím traktu přenašeče (Robertson, 1913; Vickerman, 1969). Po nasátí infikované krve glossinou se parazité dostávají nejprve do žaludku a později do střeva, kde jsou krátce poté spolu s krevní tráveninou obklopeni peritrofickou matrix, která je sekretována z proventrikula jako PM typu II (shrnuto v Welburn & Maudlin, 1999). V této oblasti dochází k diferenciaci v procyklické trypanomastigoty, kteří ve střevě zmnožují svůj počet (shrnuto ve Vickerman a kol., 1988). Po narušení PM pronikají parazité do ektoperitrofického prostoru, a poté migrují do oblasti proventrikula (Robertson, 1913). Při úniku z endoperitrofického prostoru dochází buď k přímé penetraci matrix ve střední části střeva, a nebo parazité migrují do části posteriorní, kde bývá peritrofická matrix často narušená a unikají pasivně (Ellis, 1977; Gibson & Bailey, 2003). Již v ektoperitrofickém prostoru dochází k prvním morfologickým změnám. Pozorovaná stádia jsou zde výrazně delší a tenčí. S blízkostí proventrikula se těla čím dál více prodlužují a diferencují zde do stádia mesocyklických trypanomastigotů (Sharma a kol., 2008). Toto stádium má výrazně prodloužené tělo, dochází u něj k replikaci DNA (4N) a v této fázi se buněčné dělení zastavuje (Van Den Abbeele a kol., 1999). Mesocyklické trypanomastigoti se pak přes hypofarynx dostávají do slinných žláz (Robertson, 1913), kde se vyvíjejí v epimastigoty (4N), u kterých dochází k meiotickému dělení (2N), které je navíc asymetrické. Delší epimastigoti zde většinou

zahynou, zatímco menší epimastigoti kolonizují slinné žlázy a přichytávají se k jejich epitelu (viz kapitola 2.2.2.) (Van Den Abbeele a kol., 1999). Epimastigoti se z epitelu žláz opětovně uvolňují jako metacykličtí trypomastigoti, kteří tvoří infekční stádium pro obratlovčího hostitele (shrnutí v Sharma a kol., 2009).

### 2.2.2. Přichycení v přenašeči

Při vývoji *Trypanosomy brucei* ve slinných žlázách *Glossina morsitans* pozorovali Tetley & Vickerman (1985) čtyři odlišná stádia: epimastigoty, premetacykly, nascentní metacykly a maturované metacykly. První tři stádia jsou přichycená k epitelu slinných žláz, zatímco plně vyvinutí metacykličtí trypomastigoti se již pohybují volně.



Obr. 6: Schématické znázornění metacyklogeneze *T. brucei* ve slinných žlázách přenašeče (podle Tetley & Vickerman, 1985 – upraveno)

Ve slinných žlázách přenašeče nejprve dochází k přichycení epimastigotních stádií k epitelu žláz. Tato stádia mají speciálně modifikovaný bičík, na jehož konci se nachází velké množství výrůstků, které se rozvětvují mezi mikrovily epiteliálních buněk. Tyto membránové výrůstky zprostředkovávají vazbu k epitelu žláz a vytvářejí

spojovací komplex, který je založen na podobném principu jako spojení pomocí hemidesmosomů. Během procesu metacyklogeneze postupně dochází k redukci rozvětvených výrůstků. Epimastigoti nejprve diferencují v premetacyklická stádia, která se později vyvíjejí v nascentní metacyklické trypomastigoty. U těchto stádií již žádné výrůstky nejsou, ale spojovací komplex zůstává zachován (Tetley & Vickerman, 1985). U nascentních metacyklů začíná docházet k tvorbě tzv. variabilních povrchových glykoproteinů (VSG), která je doprovázena několika morfologickými změnami, díky čemuž dojde ke vzniku maturovaných metacyklických stádií (Tetley & Vickerman, 1985; Tetley a kol., 1987). VSG tvoří asi 12-15nm široký plášť, který pokrývá celé tělo parazita včetně bičíku a jehož úkolem je chránit metacyklická stádia před imunitním systémem obratlovčího hostitele (Vickerman, 1969; Cross, 1975; Fruit a kol., 1977). K narušení spojovacího komplexu dochází tehdy, když je celý povrch metacyklů pokrytý pláštěm z VSG. Maturovaní metacyklickí trypomastigoti se po opětovném uvolnění z epitelu již pohybují volně (Tetley & Vickerman, 1985).

Mezi další významné salivární trypanosomy patří i ty z komplexů *T. congolense* a *T. vivax*. Vývojový cyklus *T. congolense* je velmi podobný tomu, který v přenašeči využívá *Trypanosoma brucei*. Na rozdíl od ní ale epimastigoti kolonizují přímo proboscis, kde se přichytávají k chitinové výstelce epitelu pomocí hemidesmosomů. Odtud premetacyklická stádia migrují k hypofarynxu, kde dále diferencují v metacyklické trypomastigoty. *Trypanosoma vivax* zase vynechává vývojovou fázi ve střevě. Tyto trypanosomy kolonizují pouze přední část trávicího traktu, kde se velmi brzy diferencují v epimastigoty, jejichž další vývoj pak pokračuje podobně jako u *T. congolense* (shrnutí ve Vickerman a kol., 1988).

### **3. Endotrypanum**

*Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) patří mezi méně prozkoumané rody řádu *Trypanosomatida*. Tento rod je rozšířen ve Střední a Jižní Americe a jeho přenašečem je krevsající hmyz rodu *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). Na rozdíl od ostatních zástupců trypanosomatid napadá tento rod výhradně erythrocyty svých hostitelů. Těmi jsou nejčastěji dvouprstí lenochodi rodu *Choloepus*, případně tříprstí lenochodi rodu *Bradypus* (Shaw, 1969; shrnutí v Franco & Grimaldi, 1999). Lenochodi mohou ale sloužit také jako rezervoároví hostitelé některých druhů

leishmanií (Christensen & Herrer, 1979). Vzhledem k tomu, že rod *Endotrypanum* i leishmanie podrodu *Viannia* využívají stejné hostitele a přenašeče, jsou si tyto rody velmi podobné. To značně komplikuje diagnostiku parazitárních nákaz i samotné taxonomické zařazení. Díky pokroku v molekulární fylogenetice se zdají být některé druhy leishmanií více příbuzné rodu *Endotrypanum*. Mezi druhy s nejasným postavením patří např. *Leishmania (Viannia) hertigi*, *L. (V.) equatorensis* či *L. enriettii*. Této problematice se věnovala celá řada studií (Noyes a kol., 1996; Cupolillo a kol., 1998; Asato a kol., 2009; Espinosa a kol., 2016).

Prozatím byly popsány dva druhy, *Endotrypanum schaudinni* a *E. monterogeii* (Shaw, 1964). V přenašeči, případně *in vitro*, vytváří *Endotrypanum* promastigotní formy a toto stádium se u obou druhů morfologicky takřka neliší (Soares a kol., 1991). Bezpečně je lze rozlišit až po napadení erytrocytů obratlovčího hostitele. Zatímco *E. schaudinni* se uvnitř erytrocytů vyskytuje ve formě epimastigota, *E. monterogeii* vytváří trypomastigotní formy (Montero-Gei, 1956; cit. dle Xavier Da Silveira a kol., 1998). Některé studie však rozdělení do těchto dvou rodů vyvrací a taxonomická klasifikace se zdá být mnohem složitější (Croft a kol. 1980; Arias a kol., 1985; Lopes a kol., 1990; Soares a kol., 1991).

### 3.1. Vývoj v přenašeči

Vývoj rodu *Endotrypanum* je omezen na trávicí trakt flebotomů, kde se po nasátí krve do oblasti mesenteronu z infikovaných erytrocytů uvolňují epimastigotní formy (u *E. monterogeii* trypomastigoti). Ve střevě pak dochází ke zmnožení parazitů a jejich diferenciaci v nektomonádní promastigoty. Krevní trávenina je obklopena peritrofickou matrix a po jejím rozpadu promastigoti migrují do zadní části trávicího traktu, kde zároveň dochází k přichycení parazitů k epitelu střeva (viz kapitola 3.2.). Nejsilnější infekce byly detekovány právě v proktodeu, v oblasti pyloru a ilea (Shaw, 1969; Franco a kol., 1997; Barbosa a kol., 2006). U tohoto rodu dochází také mimo jiné ke kolonizaci malpigických trubic (Shaw, 1969; Christensen & Herrer, 1976; Arias a kol., 1985; Franco a kol., 1997).

Někteří autoři se domnívají, že je vývoj těchto parazitů omezen pouze na zadní část trávicího traktu, tedy abdominální část mesenteronu a proktodeum (Shaw, 1969; Barbosa, 2006). Jiné studie zase popsali výskyt parazitů i v oblasti thorakálního



mesenteronu a stomodeální valvy (Shaw, 1964; Christensen & Herrer, 1976; Franco a kol., 1997). Kvůli tomu zatím není jasný ani způsob, jakým se *Endotrypanum* přenáší, zda inokulací při sání flebotoma či kontaminativně při jeho defekaci. Rozporuplná data ale mohou také vznášet otázku, zda opravdu všichni pozorovaní parazité náleželi do rodu *Endotrypanum* (Zeledón a kol., 1979; shrnuto v Cupolillo a kol., 2000).

### 3.2. Přichycení v přenašeči

Jak již bylo řečeno, řada studií popisujících způsob vývoje tohoto rodu v přenašeči je v datech značně rozporuplná. Ani o mechanismu přichycení tedy není příliš známo. V oblasti proctodea dochází k diferenciaci nektomonád v menší formy, které se pomocí bičíku přichytávají k epitelu střeva. Tyto formy jsou kulaté, případně oválné a vytvářejí seskupení v rozetách či palisádách (Christensen & Herrer, 1976; Shaw, 1981; Franco a kol., 1997).

Franco a kol. (1997) zkoumali infekce několika brazilských kmenů rodu *Endotrypanum* u třech druhů flebotomů: *Lutzomyia shannoni*, *Lu. longipalpis* a *Phlebotomus papatasi*. Zajímavé je, že se tento rod byl v laboratorních podmínkách schopný vyvíjet právě i v *P. papatasi*, který není pro *Endotrypanum* přirozeným přenašečem. V návaznosti na tuto práci Xavier Da Silveira a kol. (1998) pomocí chemické analýzy charakterizovali povrchové glykoinositolphospholipidy (GIPLs) u třech kmenů *E. shaudinni* a *E. monterogeii*. Zjistili, že GIPLs obsahují, podobně jako LPG u *Leishmania major*, terminální galaktosové zbytky. Pro přichycení v *P. papatasi* využívá *L. major* povrchový LPG, jehož postranní řetězce obsahují terminální galaktosu. Toto složení LPG vykazuje vysokou specifitu k lektinovým receptorům ve střevě flebotoma (Pimenta a kol., 1994; Kamhawi a kol., 2004). Není zatím jasné, zda *Endotrypanum* může využívat pro přichycení k epitelu střeva právě terminální galaktosové zbytky. Autoři se ale domnívají, že specifická vazba galaktosových zbytků ke střevním receptorům může případně určovat náchylnost některých druhů *Lutzomyií* vůči *Endotrypanu* (Xavier Da Silveira a kol., 1998).

#### 4. *Phytomonas*

*Phytomonas* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) je jediným rodem dvouhostitelských trypanosomatid, který parazituje na rostlinách. Není tedy patogenní pro člověka, přesto mu může přivodit řadu nepříjemností. Tento rod je rozšířen globálně, významný je ale hlavně v Jižní Americe, kde způsobuje velké hospodářské škody a tím ovlivňuje i místní ekonomiku. Typickým přenašečem je fytofágní hmyz řádu Heteroptera. Zástupci rodu *Phytomonas* byli izolováni z nejrůznějších rostlinných pletiv, včetně floému, latexu, květů, plodů i semen. Mezi nejvýznamnější druhy patří např. *Phytomonas staheli*, který parazituje na kokosových (*Cocos nucifera*) a olejových (*Elaeis guineensis*) palmách, způsobuje žloutnutí jejich listů a s tím spojené vadnutí. *Phytomonas leprovasorum* zase způsobuje nekrózu floému u kávovníků a *P. françai* napadá maniok (*Manihot esculenta*). Oblíbeným modelovým organismem je *P. serpens*, který parazituje na rajčatech (shrnutí v Jaskowska a kol., 2015).

##### 4.1. Vývoj v přenašeči

Jelikož je rod *Phytomonas* nepatogenní pro člověka, informace o něm jsou velmi roztráštěné a navíc se některé studie v datech rozcházejí. Může za to nejspíš značný morfologický polymorfismus, který je pro tento rod tak typický, nebo také to, že se jednotlivé druhy mezi sebou liší způsobem vývoje. Najdeme mezi nimi jak extracelulární tak intracelulární formy (Freymuller a kol., 1990; Frolov a kol., 2016). Podobně jako sesterský rod *Leishmania*, vytváří tento rod převážně promastigotní stádia. Buňky jsou většinou podlouhlé, několikrát překroucené podél osy těla, pozorována ale byla i menší kulovitá stádia podobná amastigotům (Jankevicius a kol., 1989; shrnutí v Camargo, 1999).

*Phytomonas* se podobně jako jiné rody řádu Trypanosomatida vyvíjejí v trávicím traktu přenašeče, kde se několik hodin po sání nejprve množí. V průběhu trávení se ale množení parazitů zastavuje a dochází k jejich kumulaci v oblasti pyloru. Asi čtyři dny po sání začne docházet k morfologickým změnám. Paraziti výrazně prodlužují svá těla a během dalších šesti až osmi dnů začíná tato podlouhlá forma v pyloru postupně převládat (Gibbs, 1957; McGhee, 1964). Poté tuto oblast opouštějí a pronikají do hemocoelu, kde můžeme pozorovat dlouhá promastigotní stádia, jejichž těla jsou několikrát (asi 3-7x) překroucená (Frolov a kol., 2016). V hemolymfě jsou tato stádia

přímo vystavena imunitnímu systému, ale přestože infekci *P. serpens* fagocytující hemocyty mírně potlačují, následnému průniku parazitů do slinných žláz nejsou schopni zabránit (Alves e Silva a kol., 2013). Z hemocoelu promastigoti vstupují do myocytů a narušením bazální laminy se pak dostávají přes vrstvu epiteliálních buněk do lumen slinných žláz. Zde dochází k diferenciaci v podstatně menší endomastigoty, kteří jsou infekčním stádiem (Frolov a kol., 2016). Způsob proniknutí do slinných žláz se u různých druhů liší. *Phytomonas serpens* do těchto míst proniká buď mezibuněčným prostorem nebo přes epiteliální buňky a to buď ve vakuole, nebo v přímém kontaktu s cytoplasmou hostitelské buňky (Freymuller a kol., 1990). Naproti tomu parazité druhu *P. nordicus* byli pozorováni pouze ve vakuolách (Frolov a kol., 2016).

Právě vývoj a přichycení ve slinných žlázách jsou důležitou součástí životního cyklu rodu *Phytomonas* jelikož zajišťují přenos parazitů do hostitele (shrnuto v Jaskowska a kol., 2015). U *P. nordicus* pozorovali Frolov a kol. (2016) ve slinných žlázách čtyři hlavní morfotypy, které jsou pro *Phytomonas* typické. Jsou jimi volně se pohybující promastigoti, promastigoti uvnitř vakuol, haptomonádní stádia, která byla přichycena k epitelu žláz a endomastigoti. Kolonizace slinných žláz je nezbytná i v životním cyklu *P. nordicus*, přestože tento druh využívá jednohostitelský způsob života. Poté co přenašeč začne sát, totiž dochází ke vtažení některých parazitů zpět do oblasti střeva. Ti se zde nejsou schopni přichytávat a tak by později došlo k jejich vyloučení při defekaci (Frolov a kol., 2016).

Způsob přenosu se u jednotlivých druhů liší. K napadení přenašečů většinou dochází při sání na infikované rostlině (shrnuto v Camargo, 1999). Přenos u *P. nordicus* je umožněn díky autoinfekci, jelikož se po celý život vyvíjí pouze v ploštic *Troilus luridus*. Bylo však prokázáno, že se zástupci tohoto druhu mohou nakazit i kontaminativně díky koprofáгии, případně horizontálně při sání více ploštic na jednom hostiteli (Frolov & Malysheva, 1993; cit. dle Frolov a kol., 2016). Horizontální i kontaminativní přenos příležitostně využívají i některé další druhy. Jankevicius a kol. (1989) pozorovali u *P. serpens* přítomnost endomastigotních stádií v moči i výkalech. Tato skutečnost naznačuje, že tradiční způsob přenosu, který využívají hlavně zástupci jednohostitelských trypanosomatid, zůstává zachován.

## 4.2. Přichycení v přenašeči

Řada studií prokázala, že různé druhy rodu *Phytomonas* využívají odlišné strategie při kolonizaci slinných žláz (Jankevicius a kol., 1989; Frolov a kol., 2016; Seward a kol., 2017). *Phytomonas nordicus* vytváří haptomonádní stádia, která se přichytávají mezi mikrovily na epitelu slinných žláz pomocí speciálně modifikovaného bičíku (Frolov a kol., 2016). Zatímco u poměrně nově popsáného druhu *P. oxycareni* se zatím zdá, že se k epitelu slinných žláz nepřichytává a promastigoti se nacházejí v celém lumen žláz (Seward a kol., 2017).

Molekulární podstata přichycení u rodu *Phytomonas* nebyla zatím objasněna. D'Avila-Levy a kol. (2006) popsali u tohoto rodu povrchovou molekulu podobnou gp63. Po přidání protilátek proti gp63 *Leishmania amazonensis* došlo k morfologickým změnám a byla výrazně snížena schopnost vazby *P. serpens* ke slinným žlázám explantovaným z *Oncopeltus fasciatus*. Role této molekuly v rostlinném hostiteli zatím není objasněna, autoři se ale domnívají, že může být důležitá při interakci s hmyzím přenašečem. Podobný význam mohou mít i cysteinové peptidázy, které byly popsány na povrchu promastigotních stádií. Tyto peptidázy jsou podobné cruzipainu u *Trypanosomy cruzi* a právě po přidání protilátek proti cruzipainu došlo k významnému potlačení infekce *P. serpens* v explantovaných žlázách *O. fasciatus* (Santos a kol., 2006). Mimo to se ukázalo, že cysteinové proteázy produkované *P. serpens* jsou schopné štěpit některé polypeptidy, které se nacházejí na povrchu slinných žláz *O. fasciatus* (Elias a kol., 2008). Jako možný receptor pro přichycení *P. serpens* ve slinných žlázách *O. fasciatus* byla navržena molekula podobná lamininu (Dias a kol., 2012). Přestože tento objev slouží jako dobrý základ pro lepší pochopení interakce parazit-vektor, je k objasnění této problematiky potřeba ještě dalších studií.

## Závěr

Ve své bakalářské práci jsem shrnula základní poznatky o vývoji dvouhostitelských trypanosomatid v hmyzím přenašeči s důrazem na fázi životního cyklu, ve které dochází k jejich přichycení ve vektorovi. Jednotlivé rody totiž kolonizují různé části trávicího traktu a liší se taktéž mechanismus, který pro své přichycení v přenašeči využívají. Jelikož je toto téma velmi obsáhlé, nejvíce jsem se soustředila na lékařsky významné rody a to především na rod *Leishmania*, kterému se budu věnovat i ve své diplomové práci.

Přichycení leishmanií v mesenteronu je nezbytné, jinak by došlo k jejich vyloučení při defekaci spolu se zbytky nestrávené potravy. U ostatních dvouhostitelských trypanosomatid se zdá být přichycení v přenašeči důležité hlavně při metacyklogenezi. U většiny trypanosomatid totiž při přichycení dochází zároveň k diferenciaci v infekční stádia, která po opětovném uvolnění napadají obratlovčího hostitele. *Trypanosoma cruzi* se přichytává v zadní části trávicího traktu ploštice, zatímco trypanosomy z komplexu *T. brucei* ve slinných žlázách glossin. Rod *Endotrypanum* je příbuzný leishmaniím a podobně jako ony se vyvíjí ve flebotomech. Proto se zdá, že by pro své přichycení mohli využívat podobný mechanismus jako leishmanie. *Phytomonas* se stejně jako *Trypanosoma cruzi* vyvíjí v trávicím traktu ploštice, k jejich přichycení ale na rozdíl od *T. cruzi* dochází ve slinných žlázách.

Molekulární podstata přichycení stále nebyla u většiny rodů objasněna. Co se této problematiky týče, vůbec nejprobádanějším rodem je *Leishmania*. Nejvíce studií se zaměřuje na vývoj suprapylárních leishmanií, jejichž mechanismus přichycení se liší v závislosti na přenašeči. Přichycení ve specifickém přenašeči je závislé na LPG, zatímco u permisivních je přichycení založené na jiném, LPG nezávislém mechanismu. Zdá se, že trypanosomatida obecně při přichytávání využívají interakci proteinu (pravděpodobně lektinového typu) se sacharidy (glykoproteiny, glykolipidy). Je překvapivé, že o podstatě přichycení u tak významném druhu jako je *Trypanosoma brucei* víme velmi málo. Studie, které se tímto tématem zabývají, jsou většinou staršího data a je jich poskrovnu.

## Seznam použité literatury

- Al-Zahrani, M. A., Peters, W., Evans, D. A., Chin, C., Smith, V., & Lane, R. P. (1988).** Phlebotomus sergenti, a vector of Leishmania tropica in Saudi Arabia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(3), 416.
- Alves, C. R., Albuquerque-Cunha, J. M., Mello, C. B., Garcia, E. S., Nogueira, N. F., Bourguignon, S. C., ... Gonzalez, M. S. (2007).** Trypanosoma cruzi: Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of Rhodnius prolixus. *Experimental Parasitology*, 116(1), 44–52.
- Alves e Silva, T. L., Vasconcellos, L. R. C., Lopes, A. H., & Souto-Padrón, T. (2013).** The Immune Response of Hemocytes of the Insect Oncopeltus fasciatus against the Flagellate Phytomonas serpens. *PLoS ONE*, 8(8).
- Arias, J. R., Miles, M. A., Naiff, R. D., Pova, M. M., de Freitas, R. A., Biancardi, C. B., & Castellon, E. G. (1985).** Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): Isolation in vitro and biochemical identification of Endotrypanum and Leishmania. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34(6), 1098–1108.
- Asato, Y., Oshiro, M., Myint, C. K., Yamamoto, Y., Kato, H., Marco, J. D., ... Uezato, H. (2009).** Phylogenetic analysis of the genus Leishmania by cytochrome b gene sequencing. *Experimental Parasitology*, 121(4), 352–61.
- Azambuja, P., Guimarães, J. A., & Garcia, E. S. (1983).** Haemolytic factor from the crop of Rhodnius prolixus: evidence and partial characterization. *Journal of insect physiology*, 29(11), 833-837.
- Barbosa, A. F., Oliveira, S. M. P., Bertho, Á. L., Franco, A. M. R., & Rangel, E. F. (2006).** Single and concomitant experimental infections by Endotrypanum spp. and Leishmania (Viannia) guyanensis (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(8), 851–856.

- Bates, P. a, & Rogers, M. E. (2004).** New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. *Current Molecular Medicine*, 4(6), 601–609.
- Bates, P. A. (2008).** Leishmania sand fly interaction: progress and challenges. *Current opinion in microbiology*, 11(4), 340-344.
- Billingsley, P. F., & Downe, a E. R. (1983).** Ultrastructural changes in posterior midgut cells associated with blood-feeding in adult female *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera:Reduviidae). *Can J. Zool.*, 61(4), 1175–1187.
- Bonaldo, M. C., Souto-Padron, T., De Souza, W., & Goldenberg, S. (1988).** Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Journal of Cell Biology*, 106(4), 1349–1358.
- Brener, Z. (1973).** Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Reviews in Microbiology*, 27(1), 347-382.
- Bruce, D., Hamerton, A. E., Bateman, H. R., & Mackie, F. P. (1911).** Further researches on the development of *Trypanosoma gambiense* in *Glossina palpalis*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 83(567), 513-527.
- Camargo, E. P. (1999).** Phytomonas and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Advances in Parasitology*, 42, 29–112.
- Christensen, H. A., & Herrer, A. (1976).** Neotropical sand flies (Diptera: Psychodidae), invertebrate hosts of *Endotrypanum schaudinni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Journal of medical entomology*, 13(3), 299-303.
- Christensen, H. A., & Herrer, A. (1979).** Susceptibility of sand flies (Diptera: Psychodidae) to Trypanosomatidae from two-toed sloths (Edentata: Bradypodidae). *Journal of medical entomology*, 16(5), 424-427.
- Coelho-Finamore, J. M., Freitas, V. C., Assis, R. R., Melo, M. N., Novozhilova, N., Secundino, N. F., ... Soares, R. P. (2011).** *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *International Journal for Parasitology*, 41(3), 333–342.

- Colli, W., & Alves, M. J. M. (1999).** Relevant Glycoconjugates on the Surface of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(SUPPL. 1), 37–49.
- Croft, S. L., Chance, M. L., & Gardener, P. J. (1980).** Ultrastructural and biochemical characterization of stocks of *Endotrypanum*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 74(6), 585-589.
- Cross, G. A. (1975).** Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*, 71(3), 393–417.
- Cupolillo, E., Pereira, L. O. R., Fernandes, O., Catanho, M. P., Pereira, J. C., Medina-acosta, E., & Jr, G. G. (1998).** Genetic Data Showing Evolutionary Links between *Leishmania* and *Endotrypanum*, 93(5), 677–683.
- Cupolillo, E., Medina-Acosta, E., Noyes, H., Momen, H., & Grimaldi, G. (2000).** A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today*, 16(4), 142–144.
- D’Avila-Levy, C. M., Santos, L. O., Marinho, F. A., Dias, F. A., Lopes, A. H., Santos, A. L. S., & Branquinha, M. H. (2006).** Gp63-like molecules in *Phytomonas serpens*: Possible role in the insect interaction. *Current Microbiology*, 52(6), 439–444.
- de Castro Côrtes, L., de Souza Pereira, M., da Silva, F., Pereira, B. A., de Oliveira Junior, F., de Araújo Soares, R., ... Alves, C. (2012).** Participation of heparin binding proteins from the surface of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes in the adhesion of parasites to *Lutzomyia longipalpis* cells (Lulo) in vitro. *Parasites & Vectors*, 5(1), 142.
- de Jesus, a R., Cooper, R., Espinosa, M., Gomes, J. E., Garcia, E. S., Paul, S., & Cross, G. a. (1993).** Gene deletion suggests a role for *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein GP72 in the insect and mammalian stages of the life cycle. *Journal of Cell Science*, 106 ( Pt 4, 1023–1033.



- Di-Blasi, T., Lobo, A. R., Nascimento, L. M., Cordova-Rojas, J. L., Pestana, K., Marin-Villa, M., ... Traub-Csekoe, Y. M. (2015).** The Flagellar Protein FLAG1/SMP1 is a Candidate for Leishmania-Sand Fly Interaction. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(3), 202–209.
- Dias, F. de A., dos Santos, A. L. S., Lery, L. M. S., Alves e Silva, T. L., Oliveira, M. M., Bisch, P. M., ... Lopes, A. H. (2012).** Evidence That a Laminin-Like Insect Protein Mediates Early Events in the Interaction of a Phytoparasite with Its Vector's Salivary Gland. *PLoS ONE*, 7(10), 1–11.
- Dobson, D. E., Kamhawi, S., Lawyer, P., Turco, S. J., Beverley, S. M., & Sacks, D. L. (2010).** Leishmania major survival in selective Phlebotomus papatasi sand fly vector requires a specific SCG-encoded lipophosphoglycan galactosylation pattern. *PLoS Pathogens*, 6(11).
- Dostálová, A., & Volf, P. (2012).** Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*, 5, 276.
- Elias, C. G. R., Pereira, F. M., Dias, F. A., Silva, T. L. A., Lopes, A. H. C. S., d'Avila-Levy, C. M., ... Santos, A. L. S. (2008).** Cysteine peptidases in the tomato trypanosomatid Phytomonas serpens: Influence of growth conditions, similarities with cruzipain and secretion to the extracellular environment. *Experimental Parasitology*, 120(4), 343–352.
- Ellis, D. S., & Evans, D. A. (1977).** Passage of Trypanosoma brucei rhodesiense through the peritrophic membrane of Glossina morsitans morsitans. *Nature*, 267(5614), 834-835.
- Espinosa, O. A., Serrano, M. G., Camargo, E. P., Teixeira, M., & Shaw, J. J. (2016).** An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as Leishmania and Endotrypanum. *Parasitology*, 1-13.
- \* **Evans, D. A., & Ellis, D. S. (1983).** Recent observations on the behaviour of certain trypanosomes within their insect hosts. *Advances in parasitology*, 22, 1-42.

- Franco, A. M. R., Tesh, R. B., Guzman, H., Deane, M. P., & Grimaldi, G. (1997).** Development of Endotrypanum (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in experimentally infected phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*, 34(2), 189-192.
- Franco, A. M. R., & Grimaldi Jr, G. (1999).** Characterization of Endotrypanum (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a unique parasite infecting the neotropical tree sloths (Edentata). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(2), 261-268.
- Freytmüller, E., Milder, R., Jankevicius, J. V., Jankevicius, S. I., & Camargo, E. P. (1990).** Ultrastructural studies on the trypanosomatid *Phytomonas serpens* in the salivary glands of a phytophagous hemipteran. *The Journal of Protozoology*, 37(3), 225-229.
- \* **Frolov, A. O., & Malysheva, M. N. (1993).** Description of *Phytomonas nordicus* sp. n. (Trypanosomatidae) from the predatory bug *Troilus luridus* (Hemiptera, Pentatomidae). *Parazitologiya*, 27, 227-232.
- Frolov, A. O., Malysheva, M. N., Yurchenko, V., & Kostygov, A. Y. (2016).** Back to monoxeny: *Phytomonas nordicus* descended from dixenous plant parasites. *European Journal of Protistology*, 52, 1–10.
- Fruit, J., Afchain, D., Petitprez, A., Van Meirvenne, N., Le Ray, D., Bout, D., & A., C. (1977).** Antigenic analysis of a variant-specific component of *Trypanosoma brucei brucei*: localization on the surface coat with labelled antibodies. *Parasitology*, 0(1977), 1–6.
- Garcia, E. S., & Azambuja, P. (1991).** Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 7(9), 240–244.
- Garcia, E. S., Ratcliffe, N. A., Whitten, M. M., Gonzalez, M. S., & Azambuja, P. (2007).** Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*–*Rhodnius prolixus* interactions. *Journal of Insect Physiology*, 53(1), 11-21.
- Garcia, E. S., Genta, F. A., De Azambuja, P., & Schaub, G. A. (2010).** Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology*, 26(10), 499–505.

- Gemetchu, T. (1974).** The morphology and fine structure of the midgut and peritrophic membrane fo the adult female, *Phlebotomus longipes* Parrot and Martin (Diptera: Psychodidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 68(1), 111–24.
- Gibbs, A. J. (1957).** *Leptomonas-serpens* nsp. parasitic in the digestive tract and salivary glands of *Nezara-viridula* (Pentatomidae) and in the sap of *Solanum-lycopersicum* (tomato) and other plants. *Parasitology*, 47(3–4), 297–303.
- Gibson, W., & Bailey, M. (2003).** The development of *Trypanosoma brucei* within the tsetse fly midgut observed using green fluorescent trypanosomes. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 2(1), 1.
- Gonzalez, M. S., Nogueira, N. F., Mello, C. B., De Souza, W., Schaub, G. a, Azambuja, P., & Garcia, E. S. (1999).** Influence of brain and azadirachtin on *Trypanosoma cruzi* development in the vector, *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, 92(2), 100–108.
- Gonzalez, M. S., Hamed, A., Albuquerque-Cunha, J. M., Nogueira, N. F. S., De Souza, W., Ratcliffe, N. A., ... Mello, C. B. (2006).** Antiserum against perimicrovillar membranes and midgut tissue reduces the development of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector, *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, 114(4), 297–304.
- Jacobson, R. L., Eisenberger, C. L., Svobodova, M., Baneth, G., Sztern, J., Carvalho, J., ... Warburg, A. (2003).** Outbreak of cutaneous leishmaniasis in northern Israel. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(7), 1065–73.
- Jankevicius, J. V., Jankevicius, S. I., Campaner, M., Conchon, I., Maeda, L. A., Telxeira, M. M. G., ... Camargo, E. P. (1989).** Life Cycle and Culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a Trypanosomatid Parasite of Tomatoes. *The Journal of Protozoology*, 36(3), 265–271.
- Jaskowska, E., Butler, C., Preston, G., & Kelly, S. (2015).** *Phytomonas*: Trypanosomatids Adapted to Plant Environments. *PLoS Pathogens*, 11(1), 1–17.

- Kamhawi, S., Modi, G. B., Pimenta, P. F., Rowton, E., & Sacks, D. L. (2000).** The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology*, *121* (Pt 1(2000)), 25–33.
- Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Van, M. P., Kumar, S., Lawyer, P. G., Turco, S. J., ... Valenzuela, J. G. (2004).** A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*, *119*(3), 329–341.
- Kamhawi, S. (2006).** Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*, *22*(9), 439–445.
- Killick-Kendrick, R., Molyneux, D. H., & Ashford, R. W. (1974).** *Leishmania* in phlebotomid sandflies I. modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sand fly. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, *187*(1089), 409–419.
- Kleffmann, T., Schmidt, J., & Schaub, G. A. (1998).** Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *45*(5), 548-555.
- Kollien, A. H., Schmidt, J., & Schaub, G. A. (1998).** Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. *Acta tropica*, *70*(2), 127-141.
- Kollien, A. H., & Schaub, G. A. (2000).** The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitology Today*, *16*(9), 381–387.
- Lainson, R., & Shaw, J. J. (1987).** Evolution, classification and geographical distribution. In *The leishmaniases in biology and medicine. Volume I. Biology and epidemiology* (p. 120).
- Lane, N. J., & Harrison, J. B. (1979).** An unusual cell surface modification: a double plasma membrane. *Journal of Cell Science*, *39*, 355–372.
- Lehane, M. J. (1997).** Peritrophic Matrix Structure and Function. *Annu. Rev. Entomol.*, *42*(100), 525–50.

- Lopes, A. H., Iovannisci, D., Petrillo-Peixoto, M., McMahon-Pratt, D., & Beverley, S. M. (1990).** Evolution of nuclear DNA and the occurrence of sequences related to new small chromosomal DNAs in the trypanosomatid genus *Endotrypanum*. *Molecular and biochemical parasitology*, 40(2), 151-161.
- Mahoney, A. B., Sacks, D. L., Saraiva, E., Modi, G., & Turco, S. J. (1999).** Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani* - Sand fly interactions. *Biochemistry*, 38(31), 9813–9823.
- Malvy, D., & Chappuis, F. (2011).** Sleeping sickness. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17(7), 986–95.
- McConville, M. J., Thomas-Oates, J. E., Ferguson, M. A., & Homans, S. W. (1990).** Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. *Journal of Biological Chemistry*, 265(32), 19611-19623.
- 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*, 8(12), 396.
- McConville, M. J., Schnur, L. F., Jaffe, C., & Schneider, P. (1995).** Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter-and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochemical Journal*, 310(3), 807-818.
- McGhee, R. B. (1964).** *Leptomonas oncopelti*, 11(4), 555–562.
- McGhee, R. B., & Hanson, W. L. (1964).** Comparison of the life cycle of *Leptomonas oncopelti* and *Phytomonas elmasdsiani*. *The Journal of protozoology*, 11(4), 555-562.
- Minchin, E. A. (1905).** Report on the anatomy of the tsetse-fly (*Glossina palpalis*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 76(512), 531-547.
- Molyneux, D. H., & Killick-Kendrick, R. (1987).** Morphology, ultrastructure and life cycles. *The leishmaniasis in biology and medicine*, 1, 121-176.

- Moncayo, A., & Ortiz Yanine, M. I. (2006).** An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 100(8), 663-677.
- \* **Montero-Gei, F. (1956).** Contribución al estudio de *Endotrypanum schaudinni* (Trypanosomidae). *Rev. Biol. Trop*, 4(1), 41-68.
- Mukhopadhyay, N., Shome, K., Saha, A., Hassell, J., & Glew, R. (1989).** Heparin binds to *Leishmania donovani* promastigotes and inhibits protein phosphorylation. *Biochemical Journal*, 264, 517–525.
- Myšková, J. (2007).** Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. p. 1-53
- Myšková, J., Svobodová, M., Beverley, S. M., & Volf, P. (2007).** A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes and Infection*, 9(3), 317–324.
- Myšková, J., Dostálová, A., Pěničková, L., Halada, P., Bates, P. A., & Volf, P. (2016).** Characterization of a midgut mucin-like glycoconjugate of *Lutzomyia longipalpis* with a potential role in *Leishmania* attachment. *Parasites & Vectors*, 9(1), 413.
- Nogueira, N. F., Gonzales, M., Garcia, E. M., & de Souza, W. (1997).** Effect of azadirachtin A on the fine structure of the midgut of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 69(1), 58–63.
- Nogueira, N. F. S., Gonzalez, M. S., Gomes, J. E., de Souza, W., Garcia, E. S., Azambuja, P., ... Colli, W. (2007).** Trypanosoma cruzi: Involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, 116(2), 120–128.
- Noyes, H. A., Perez Camps, A., & Chance, M. L. (1996).** *Leishmania herreri* (kinetoplastida; trypanosomatidae) is more closely related to *Endotrypanum* (kinetoplastida; trypanosomatidae) than to *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 80(1), 119–123.

- Pascoa, V., Oliveira, P. L., Dansa-Petretski, M., Silva, J. R., Alvarenga, P. H., Jacobs-Lorena, M., & Lemos, F. J. A. (2002).** *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(5), 517–523.
- Peters, W., 1992.** *Peritrophic Membranes*. 2nd ed. B.m.: Springer-Verlag. ISBN 3-540-53635-3.
- 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(5065), 1812–1815.
- Pimenta, P. F. P., Saraiva, E. M. B., Rowton, E., Modi, G. B., Garraway, L. A., Beverley, S. M., ... 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19), 9155–9159.
- 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 ( Pt 4(November 1997), 359–369.
- Robertson, M. (1913).** Notes on the life-history of *Trypanosoma gambiense*, with a brief reference to the cycles of *Trypanosoma nanum* and *Trypanosoma pecorum* in *Glossina palpalis*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 203, 161-184.
- 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(Pt 5), 495–507.
- Rogers, M. E., Ilg, T., Nikolaev, A. V, Ferguson, M. A. J., & Bates, P. A. (2004).** Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, 430(6998), 463–7.

- 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(2), 685–97.
- Sacks, D. L., Modi, G., Rowton, E., Späth, G., Epstein, L., Turco, S. J., & Beverley, S. M. (2000).** The role of phosphoglycans in *Leishmania*–sand fly interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(1), 406–411.
- Sádlová, J. (1999).** The life history of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta Soc. Zool. Bohem*, 63, 331–366.
- Sádlová, J., & Volf, P. (2009).** Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania* major development. *Cell and Tissue Research*, 337(2), 313–325.
- Santos, A. L. S., D’Avila-Levy, C. M., Dias, F. A., Ribeiro, R. O., Pereira, F. M., Elias, C. G. R., ... Soares, R. M. A. (2006).** *Phytomonas serpens*: Cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion. *International Journal for Parasitology*, 36(1), 47–56.
- Secundino, N. F. C., Eger-Mangrich, I., Braga, E. M., Santoro, M. M., & Pimenta, P. F. P. (2005).** *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *Journal of Medical Entomology*, 42(6), 928–938.
- Seward, E. A., Votýpka, J., Kment, P., Lukeš, J., & Kelly, S. (2017).** Description of *Phytomonas oxycareni* n. sp. from the Salivary Glands of *Oxycarenum lavaterae*. *Protist*, 168(1), 71–79.
- Sharma, R., Peacock, L., Gluenz, E., Gull, K., Gibson, W., & Carrington, M. (2008).** Asymmetric Cell Division as a Route to Reduction in Cell Length and Change in Cell Morphology in Trypanosomes. *Protist*, 159(1), 137–151.
- Sharma, R., Gluenz, E., Peacock, L., Gibson, W., Gull, K., & Carrington, M. (2009).** The heart of darkness: growth and form of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly. *Trends in Parasitology*, 25(11), 517–524.



- Shaw, J. J. (1964).** A possible vector of *Endotrypanum schaudinni* of the sloth *Choloepus hoffmanni*, in Panama. *Nature*, 201(4917), 417-418.
- Shaw, J. J. (1969).** The haemoflagellates of sloths. *The haemoflagellates of sloths*.
- Shaw, J. J. (1981).** The behaviour of *Endotrypanum schaudinni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in three species of laboratory-bred Neotropical sandflies (Diptera: Psychodidae) and its influence on the classification of the genus *Leishmania* [*Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia furcata*]. *Special publication Society of Protozoologists*.
- Schaub, G. A., Kleffmann, T., Kollien, A. H., & Schmidt, J. (1998).** Hydrophobic attachment of *Trypanosoma cruzi* to the rectal cuticle of *Triatoma infestans* and its influence on metacyclogenesis - A review. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 23(6), 321–327.
- Schlein, Y., Schnur, L. F., & Jacobson, R. L. (1990).** Released glycoconjugate of indigenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(3), 353–355.
- Schlein, Y., Jacobson, R. L., & Shlomai, J. (1991).** Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 245(1313), 121-126.
- Schlein, Y., Jacobson, R. L., & Messer, G. (1992).** *Leishmania* Infections Damage the Feeding Mechanism of the Sandfly Vector and Implement Parasite Transmission By Bite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(20), 9944–9948.
- Silva, C. P., Silva, J. R., Vasconcelos, F. F., Petretski, M. D. A., DaMatta, R. A., Ribeiro, A. F., & Terra, W. R. (2004).** Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance. *Arthropod Structure and Development*, 33(2), 139–148.
- Soares, M. J., Lopes, A. H., & Souza, W. D. (1991).** Ultrastructural and stereological analysis of trypanosomatidosis of the genus *Endotrypanum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86(2), 175-180.

- Soares, R. P. P., Macedo, M. E., Ropert, C., Gontijo, N. F., Almeida, I. C., Gazzinelli, R. T., ... 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(2), 213–224.
- Soares, R. P. P., Barron, T., McCoy-Simandle, K., Svobodova, M., Warburg, A., & Turco, S. J. (2004).** Leishmania tropica: Intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different Phlebotomus species. *Experimental Parasitology*, 107(1–2), 105–114.
- Soares, R. P., Altoé, E. C. F., Ennes-Vidal, V., da Costa, S. M., Rangel, E. F., de Souza, N. A., ... d'Avila-Levy, C. M. (2017).** In Vitro Inhibition of Leishmania Attachment to Sandfly Midguts and LL-5 Cells by Divalent Metal Chelators, Anti-gp63 and Phosphoglycans. *Protist*.
- 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(10), 675–689.
- Svárovská, A., Ant, T. H., Seblová, V., Jecná, L., Beverley, S. M., & Volf, P. (2010).** Leishmania major glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2<sup>-</sup>) but not lipophosphoglycan (lpg1<sup>-</sup>) for survival in permissive sand fly vectors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(1), 1–7.
- Svobodová, M., Bates, P. A., & Volf, P. (1997).** Detection of lectin activity in Leishmania promastigotes and amastigotes. *Acta Tropica*, 68(1), 23–35.
- Svobodová, M., Votýpka, J., Pecková, J., Dvořák, V., Nasereddin, A., Baneth, G., ... Warburg, A. (2006).** Distinct transmission cycles of Leishmania tropica in 2 adjacent foci, northern Israel. *Emerging Infectious Diseases*, 12(12), 1860–1868.
- Terra, W. R. (1990).** Evolution of Digestive Systems of Insects. *Annual Review of Entomology*, 35(1), 181–200.

- Tetley, L., & Vickerman, K. (1985).** Differentiation in *Trypanosoma brucei*: host-parasite cell junctions and their persistence during acquisition of the variable antigen coat. *Journal of Cell Science*, 74, 1–19.
- Tetley, L., Turner, C. M., Barry, J. D., Crowe, J. S., & Vickerman, K. (1987).** Onset of expression of the variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly studied using immunoelectron microscopy. *Journal of Cell Science*, 87(2), 363–72.
- Turco, S. J., & Descoteaux, A. (1992).** The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*, 46(January), 65–94.
- Van Den Abbeele, J., Claes, Y., van Bockstaele, D., Le Ray, D., & Coosemans, M. (1999).** *Trypanosoma brucei* spp. development in the tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. *Parasitology*, 118 (Pt 5(April 2017)), 469–478.F
- Vickerman, K. (1969).** On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. *Journal of Cell Science*, 5, 163–193.
- Vickerman, K., Tetley, L., Hendry, K. a, & Turner, C. M. (1988).** Biology of African trypanosomes in the tsetse fly. *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 64(2), 109–119.
- Volf, P., Hajmová, M., Sádlová, J., & Votýpka, J. (2004).** Blocked stomodeal valve of the insect vector: Similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International Journal for Parasitology*, 34(11), 1221–1227.
- Volf, P., & Myšková, J. (2007).** Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends in Parasitology*, 23(3), 91–92.
- Volf, P., Hostomská, J., & Rohousová, I. (2008).** Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite*, 15(3), 237-243.
- Walters, L. L., Chaplin, G. L., Modi, G. B., & Tesh, R. B. (1989).** Ultrastructural biology of *Leishmania (Viannia) panamensis* (= *Leishmania Braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: psychodidae): a natural host-parasite association. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40(1), 19–39.

- Walters, L. L., Irons, K. P., Modi, G. B., & Tesh, R. B. (1992).** Refractory barriers in the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to infection with *Leishmania panamensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(2), 211–228.
- 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(1), 179–198.
- Walters, L. L. (1993).** *Leishmania* Differentiation in Natural and Unnatural Sand Fly Hosts. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40(2), 196–206.
- Warburg, A., Tesh, R. B., & McMahon-Pratt, D. (1989).** Studies on the attachment of *Leishmania* flagella to sand fly midgut epithelium. *J Protozool*, 36(613), 7.
- Welburn, S. C., Fèvre, E. M., Coleman, P. G., Odiit, M., & Maudlin, I. (2001).** Sleeping sickness: A tale of two diseases. *Parasitology Today*, 17(1), 19–24.
- 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(2), 161–166.
- Welburn, S. C., & Maudlin, I. (1999).** Tsetse–trypanosome interactions: rites of passage. *Parasitology Today*, 15(10), 399–403.
- Welburn, S. C., Fèvre, E. M., Coleman, P. G., Odiit, M., & Maudlin, I. (2001).** Sleeping sickness: a tale of two diseases. *Trends in parasitology*, 17(1), 19–24.
- Xavier Da Silveira, E., Jones, C., Wait, R., Previato, J. O., & Mendonca-Previato, L. (1998).** Glycoinositol phospholipids from *Endotrypanum* species express epitopes in common with saccharide side chains of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. *The Biochemical Journal*, 329 ( Pt 3, 665–673
- Zeledón, R., Ponce, C., & Murillo, J. (1979).** *Leishmania herreri* sp. n. from sloths and sandflies of Costa Rica. *The Journal of parasitology*, 275–279.

---

\*) sekundární citace