

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra parazitologie

Studijní program Biologie

Studijní obor Parazitologie



Bc. Kateřina Pružinová

Trávení krve u flebotomů a jeho vliv na vývoj leishmanií

Bloodmeal digestion of phlebotomine sand flies and its effect on
Leishmania development

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

Praha 2012

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 23. 4. 2012

Kateřina Pružinová

Poděkování

Na tomto místě bych především chtěla poděkovat svému školiteli panu profesorovi Petru Volfovi za velkou trpělivost, pomoc a cenné rady. Děkuji Lucce Ječné a Jovaně Sádlové za pomoc při mých experimentech a chtěla bych také poděkovat Janu Votýpkovi za provedení kvantitativní PCR a pomoc se statistikou. Děkuji Janě Hlaváčové za morální podporu a ochotu vždy nabídnout pomocnou ruku a Štěpánce Hlavové za její úžasnou pracovitost a pozitivní přístup. Mé poděkování patří také celému kolektivu naší laboratoře za velmi přátelskou atmosféru.

V neposlední řadě velmi děkuji mamince a příteli Jirkovi, kteří mě při studiu podporovali a byli tu vždy pro mě, když jsem je potřebovala.

ABSTRAKT

Vývoj leishmanií v zažívacím traktu vektora je úzce spojen s trávicími procesy, které následují po nasátí krve. Tato práce se zabývá faktory, které ovlivňují trávení, vývoj vajec a vývoj leishmanií u samic flebotomů. V první části práce jsme zjišťovali rozdíly při trávení savčí (králičí) a ptačí (kuřecí) krve. Ve střevech samic *Phlebotomus duboscqi* jsme po sání na kuřeti naměřili dvakrát nižší koncentraci proteinů a signifikantně nižší trypsinovou aktivitu než po sání na králíkovi. Rozdíl v trypsinové aktivitě byl patrný nejvíce v průběhu prvních 24 h, kdy po sání kuřecí krve byla aktivita o 40 – 55 % nižší než po sání králičí krve. Významný rozdíl mezi skupinami byl zaznamenán i ve vývoji vajec. U samic sátých na kuřeti se vejce vyvíjela pomaleji a byla v průměru o 10 % kratší než u samic sátých na králíkovi.

Ve druhé části práce jsme testovali vliv komářího hormonu TMOF na trypsinovou aktivitu a vývoj vajec u *Lutzomyia longipalpis*. Samice sály králičí krev s přidaným TMOF (28 mg/ml) přes membránu. Přidaný hormon snížil trypsinovou aktivitu o 15 – 35 %, přičemž nejvýraznější pokles byl zaznamenán po 18 a 24 h po sání krve. TMOF měl částečný vliv i na vývoj vajec, u pokusné skupiny se vyvinulo zhruba o 30 % vajec méně než u kontrolní skupiny a navíc vejce byla o 12 – 24 % kratší. Přidání TMOF do sáté krve mělo tedy signifikantní účinek na trypsinovou aktivitu a vývoj vajec, efekt byl ale méně výrazný, než je popisováno u komárů.

Nejdůležitější část práce byla věnována experimentálním infekcím. Zjistili jsme, že náchylnost *P. duboscqi* k infekci *Leishmania major* je stejná jak při prvním tak při druhém sání. U samic infikovaných až při druhém sání jsme nezaznamenali rozdíly ani v procentu infikovaných samic ani v intenzitách nákaz. Dále jsme zkoumali vliv trávení kuřecí krve na průběh infekce *L. major* u *P. duboscqi*. V literatuře je popsáno, že sání ptačí krve má negativní účinek na leishmanie ve střevě flebotoma. Proto jsme chtěli tuto teorii ověřit a detailněji prostudovat. Samice jsme infikovali sáním králičí krve s promastigoty leishmanií a druhý nebo šestý den po infekci jsme je nechali sát na kuřeti, zatímco kontrolní samice sály na myši. V obou typech experimentu a u obou skupin samic probíhal vývoj leishmanií obdobně, rozdíly nebyly zaznamenány ani v procentu infikovaných samic ani v intenzitách nákaz. Rozdíl v průběhu infekce nebyl zjištěn ani v pokusech, kdy byly samice sáty na kuřeti nebo na myši devět dní před infekčním sáním. Kuřecí krev tedy neměla žádný vliv na vývoj *L. major* ve střevech *P. duboscqi*.

Klíčová slova: flebotomus, *Leishmania*, trávení krve, trypsin, TMOF

ABSTRACT

Leishmania development in their vectors is closely connected with bloodmeal digestion. This thesis focuses on factors affecting bloodmeal digestion, egg development and *Leishmania* infection within the sand fly gut. First, we compared the effect of mammalian (rabbit) and avian (chicken) blood on digestion and eggs development in *Phlebotomus duboscqi*. Sand flies fed on chickens had twice lower protein concentrations in the midgut and significantly lower trypsin activity compared to those fed on rabbits. The highest differences in the trypsin activity were observed during first 24 hours post bloodmeal. In addition, females fed on chickens had slower eggs development and their eggs were 10 % smaller compared to those fed on rabbits.

In the second part of the thesis we tested the effect of mosquito hormone TMOF on the trypsin activity and eggs development of *Lutzomyia longipalpis*. Rabbit blood with TMOF (28 mg/ml) was presented to the females via a membrane feeding system. Sand flies fed on blood with TMOF had 15 – 35 % less trypsin activity than control females fed on only rabbit blood. In addition, females fed on blood with TMOF had developed 30 % less eggs and their eggs were 12 – 24 % smaller compared to control group. However the effect of TMOF we observed was lower than that described previously in mosquitoes.

The most important part was devoted to experimental infections. We compared a susceptibility of *P. duboscqi* to *Leishmania major* infection during the first or the second bloodmeal; no differences were found in infection rates or intensity of infections between these two groups. Next we studied the effect of chicken blood on *L. major* development in *P. duboscqi*. Previous studies proposed that avian bloodmeal is harmful to *Leishmania* within the sand fly gut. To test this hypothesis, females were given infective rabbit blood with promastigotes and then one or six days later chicken or mouse bloodmeal. The similar *Leishmania* development was observed in both types of experiments and in all groups of females, no differences were found in infection rates or intensity of infections. Similarly, sand flies fed on chick or mouse and given a second meal of rabbit blood with promastigotes nine days later, showed no differences in infections. This study indicates that avian blood does not affect *Leishmania* development.

Key words: sand fly, *Leishmania*, bloodmeal digestion, trypsin, TMOF

Obsah

1 ÚVOD.....	8
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1 Vývoj leishmanií v přenašeči	10
2.2 Trávení krve – proteolytické enzymy, peritrofická matrix	12
2.2.1 Proteolytické enzymy	12
2.2.2 Peritrofická matrix.....	13
2.3 Vliv procesů trávení na vývoj leishmanií	14
2.4 Vliv druhu nasáté krve	19
2.4.1 Vliv druhu nasáté krve na fekunditu flebotomů	19
2.4.2 Vliv druhu nasáté krve na vývoj leishmanií ve střevě přenašeče	20
2.5 „Trypsin modulating oostatic factor“	23
2.5.1 Syntéza, sekrece a struktura TMOF	23
2.5.2 Efekt TMOF na larvy a dospělé samice komárů	24
2.5.3 Efekt TMOF na jiné druhy hmyzu	26
2.5.4 Produkce TMOF rostlinami a kvasinkami a využití v biologickém boji	27
3 MATERIÁL A METODIKA.....	29
3.1 Složení použitých roztoků.....	29
3.2 Chov flebotomů, pitvy střev samic a příprava vzorků střeva	29
3.3 Fluorometrické měření trypsinové aktivity ve střevě flebotomů	30
3.4 Měření velikosti vajec	31
3.5 Stanovení proteinové koncentrace	31
3.6 Experimentální infekce	32
3.6.1 Leishmanie a jejich kultivace	32
3.6.2 Příprava kůžiček.....	32
3.6.3 Sání přes membránu nebo na zvířatech	32
3.7 Kvantitativní PCR	33
3.8 Histologie v pryskyřici JB-4	34
3.9 Schéma pokusů	34
3.9.1 Trávení krve u <i>P. duboscqi</i> : srovnání savčí a ptačí krve	34
3.9.2 Srovnání náchylnosti k infekci <i>L. major</i> při prvním a druhém sání <i>P. duboscqi</i>	34

3.9.3 Vývoj <i>L. major</i> v <i>P. duboscqi</i> : vliv kuřecí krve podané 9 dní před infekčním sáním .	35
3.9.4 Vývoj <i>L. major</i> v <i>P. duboscqi</i> : vliv kuřecí krve podané 1 den po infekčním sání...	35
3.9.5 Vývoj <i>L. major</i> v <i>P. duboscqi</i> : vliv kuřecí krve podané 6. den po infekčním sání..	35
3.9.6 Rozdíl v procentu infikovaných samic a intenzitě infekce po sání 5% nebo 100% krve s promastigoty leishmanií	35
3.9.7 Histologie „dvojité“ peritrofické matrix	36
3.9.8 Rozdíl při trávení 10% a 100% krve	36
3.9.9 Efekt TMOF na trypsinovou aktivitu a vývoj vajec u <i>Lu. longipalpis</i>	36
3.10 Statistické vyhodnocení	36
4 VÝSLEDKY	37
4.1 Trávení krve u <i>P. duboscqi</i> : srovnání savčí a ptačí krve	37
4.2 Srovnání náchylnosti k infekci <i>L. major</i> při prvním a druhém sání <i>P. duboscqi</i>	40
4.3 Vývoj <i>L. major</i> v <i>P. duboscqi</i> : vliv kuřecí krve podané 9 dní před infekčním sáním ..	41
4.4 Vývoj <i>L. major</i> v <i>P. duboscqi</i> : vliv kuřecí krve podané 1 den po infekčním sání.....	42
4.5 Vývoj <i>L. major</i> v <i>P. duboscqi</i> : vliv kuřecí krve podané 6. den po infekčním sání.....	44
4.6 Rozdíl v procentu infikovaných samic a intenzitě infekce po sání 5% nebo 100% krve s promastigoty leishmanií	47
4.7 Histologie peritrofické matrix	48
4.8 Rozdíl při trávení 10% a 100% krve	50
4.9 Efekt TMOF na trypsinovou aktivitu a vývoj vajec u <i>Lu. longipalpis</i>	51
5 DISKUZE	56
6 SHRNUÍ.....	64
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	65

1 ÚVOD

Flebotomové (řád Diptera, čeleď Psychodidae, podčeleď Phlebotominae) patří mezi drobný dvoukřídlý hematofágní hmyz. Obě pohlaví se živí sáním cukerných šťáv, samičky jsou ale zároveň ektoparazité, pro které je krev obratlovců zdrojem energie pro tvorbu vajíček. Vyskytují se na rozmanitých biotopech tropů a subtropů, především Asie, Afriky a Střední a Jižní Ameriky. Některé druhy mohou být rozšířeny i v mírném pásu, například v jižní Evropě. V posledních letech bylo v Evropě a Severní Americe zaznamenáno postupné šíření flebotomů severním směrem.

Z 900 popsanych druhů flebotomů je z hlediska přenosu infekčních onemocnění důležitých přibližně 70. Radíme je do dvou rodů: *Phlebotomus*, vyskytující se ve Starém Světě, a *Lutzomyia* žijící v Novém Světě. Druhy rodu *Sergentomyia*, kteří sají převážně na plazech, mohou v ojedinělých případech pobodat i člověka, není ale prokázáno, že by byli schopni přenášet lidské infekce.

Flebotomové mohou přenášet různá bakteriální a virová onemocnění, například bartonelózu (*Bartonella bacilliformis*) nebo horečku papatači (flebovirus z čeledi Bunyviridae). Jsou ale známí především jako vektorů prvoků rodu *Leishmania* způsobujících leishmaniózu, která je Světovou zdravotnickou organizací řazena mezi sedm nejvýznamnějších parazitárních onemocnění. Porozumění interakcím mezi parazitem a jeho vektorem může vést k účinnější kontrole přenosu tohoto onemocnění.

Vývoj leishmanií ve flebotomech je lokalizován v trávicím traktu. Schopnosti parazita úspěšně přežít v měnicích se podmínkách při trávení přijaté krve jsou určující pro uchycení infekce a úspěšný přenos do nového hostitele. Trávení krve a vývoj leishmanií ve střevě ovlivňují různé exogenní a endogenní faktory, jako je například teplota, složení přijaté potravy nebo schopnost leishmanií bránit se proteolytickým enzymům a modulovat některé trávicí procesy.

Proteiny z nasáté krve jsou tráveny přibližně 48 – 72 hodin, během kterých musejí parazité čelit nepříznivým podmínkám prostředí. Zdá se, že některé enzymatické procesy spouštěné určitými typy potravy mohou být pro leishmanie letální. Avšak názory různých autorů se neshodují. Diskutabilní je například vliv ptačí krve na průběh infekce. Zatímco u starosvětského druhu *Phlebotomus papatasi* infikovaného *Leishmania major* bylo zjištěno, že ptačí krev významně redukuje infekci, u novosvětského druhu *Lutzomyia longipalpis* nebylo zaznamenáno, že by ptačí krev měla výrazný vliv na průběh infekce *Leishmania mexicana*.

Ve své diplomové práci jsem se proto snažila ověřit tyto dva rozporuplné údaje o vlivu ptačí krve na vývoj leishmanií ve střevě přenašeče.

Současné programy kontroly přenašečů infekčních onemocnění zahrnují především různé insekticidní zákroky. Užívání chemických látek je sice nezbytné, přesto se ale stále více úsilí vynakládá na vývoj nových biologických metod. Jednou z nových možností by mohlo být využití hormonu „Trypsin modulating oostatic factor“ (TMOF). Tento hormon inhibuje syntézu trypsinu, vitelogenezi a vývoj larev u komárů a uvažuje se proto o jeho využití v biologickém boji s komáry. Na základě podobnosti komárů a flebotomů jsem se ve své diplomové práci pokusila zjistit efekt TMOF na trávení krve a vývoj vajec u samic flebotomů.

Cílem mé diplomové práce bylo:

- Porovnat trypsinovou aktivitu, množství proteinů v nasátém střevě a vývoj vajec u *Phlebotomus duboscqi* po sání ptačí (kuřecí) a savčí (králičí) krve.
- Zjistit efekt komářího hormonu TMOF na trypsinovou aktivitu a vývoj vajec u *Lutzomyia longipalpis*.
- Porovnat náchylnost k infekci *Leishmania major* při prvním a při druhém sání *P. duboscqi*.
- Sledovat efekt trávení ptačí (kuřecí) krve na vývoj leishmanií (*L. major*) u *P. duboscqi*.

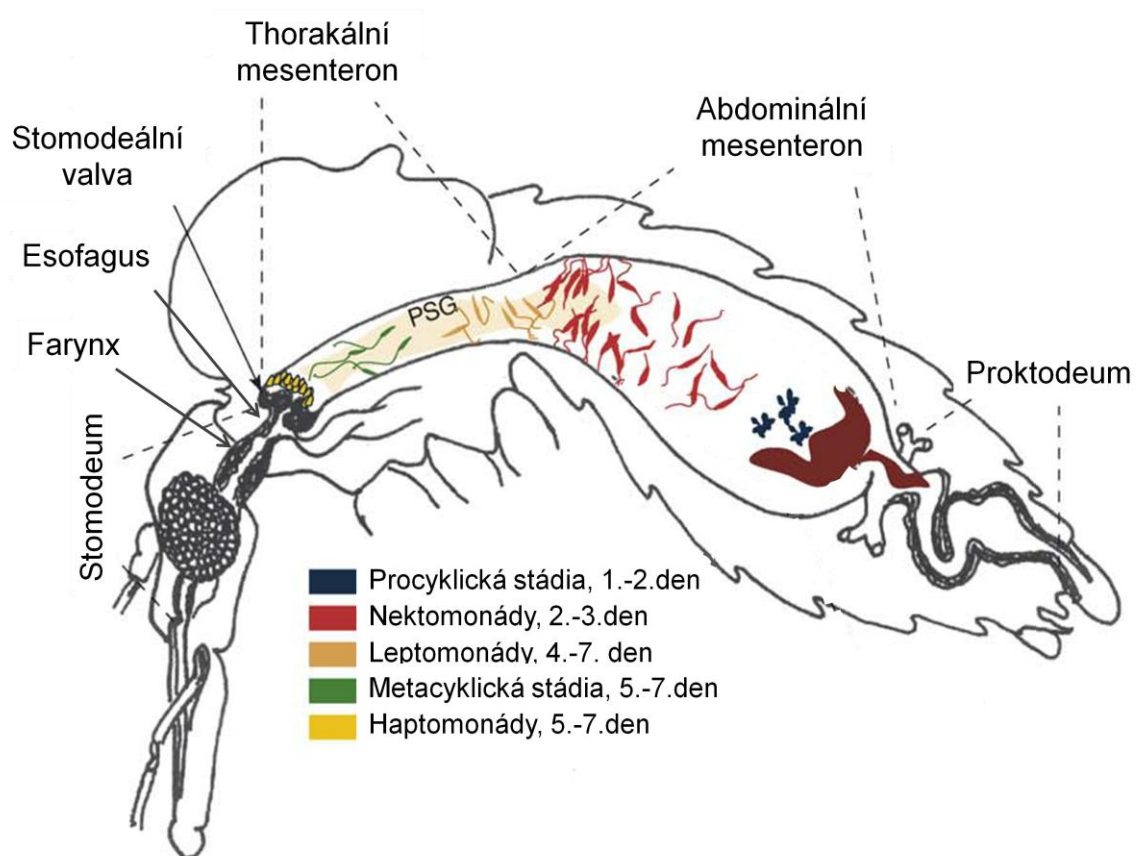
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Vývoj leishmanií v přenašeči

Prvoci rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) jsou dvojhostitelská parazitická protozoa přenášená flebotomy. Způsobují onemocnění leishmaniózu, která se projevuje různými symptomy od kožních vředů po fatální viscerální onemocnění. Leishmanióza může být zoonózou, kdy jsou rezervoárem domácí nebo divoká zvířata, anebo antroponózou, kdy je rezervoárovým hostitelem člověk. V životním cyklu leishmanií se střídají intracelulární amastigotní fáze v obratlovčím hostiteli a extracelulární promastigotní fáze ve flebotomovi. Ve flebotomech je vývoj leishmanií vázán na jejich trávicí trakt. Většina lékařsky významných druhů leishmanií patří do skupiny Suprapylaria, což znamená, že je jejich vývoj omezen na mesenteron a na anteriorní část trávicího traktu (shrnutí v Sadlova 1999, Kamhawi 2006). Výjimku tvoří novosvětský podrod *Viannia*, kam řadíme například druh *Leishmania braziliensis*, který má tak zvaný peripylární vývoj, kdy promastigoti před migrací do mesenteronu osidlují zadní střevo (Lainson a kol. 1977). Ke své práci jsem používala druh *Leishmania major*, který patří do skupiny Suprapylaria, proto zde dále stručně popisují střevní fázi vývoje pouze u této skupiny.

Infekce je započata nasátím infikované krve, která je posléze v abdominálním mesenteronu obklopena peritrofickou matrix. Poté se leishmanie diferencují na různá vývojová stádia, která jsou charakteristická morfologickými a funkčními změnami zajišťujícími přežití ve vektoru a úspěšný přenos do obratlovce. Nejprve se amastigoti uvolní z makrofágů a transformují se na pomalé a oválné procyklické promastigoty, kteří se během 1 – 2 dnů výrazně namnoží. Tato stádia, vyskytující se ještě v přijaté krvi, se 2. – 3. den mění na dlouhé a rychle se pohybující nektomonády. Ty se při desintegraci peritrofické matrix (zpravidla třetí nebo čtvrtý den po sání) uvolňují do ektoperitrofického prostoru, kde se reverzibilně přichycují na mikroklky střevní stěny a poté postupně migrují do thorakálního mesenteronu. Dlouhé nektomonády se v průběhu 4. – 7. dne transformují na krátké nektomonády, podle Rogers a kol. (2002) tzv. leptomonády, které se opět namnoží a jsou předstupěň pro další vývojová stádia. V přední části trávicího ústrojí z nich vznikají krátké nepohyblivé haptomonády, které kolonizují stomodeální valvu a případně osidlují esofagus a farynx a mění se na paramastigotní stadia. Nektomonády se zároveň transformují i na metacyklická stádia, která jsou adaptována pro přenos do obratlovčího hostitele (shrnutí v Sadlova 1999, Kamhawi 2006). Trávicí trakt s vývojem leishmanií je schematicky znázorněn na obrázku 2-1.

Produkcí chitináz leishmanie narušují chitinovou výstelku stomodeální valvy (Schlein a kol. 1992, Volf a kol. 2004). Promastigoti zároveň sekretují gel PSG složený převážně z filamentárního proteofosfoglykanu (fPPG), který způsobuje neprůchodnost přední části mesenteronu (Rogers a kol. 2004). Těžké poškození stomodeální valvy spolu s neprůchodností přední části mesenteronu narušuje flebotomovi příjem krve (Volf a kol. 2004). Infikovaný flebotom je tak nucen k opakovaným pokusům o sání, při kterých dochází ke zpětnému toku nasáté krve a leishmanie jsou regurgitovány do kůže hostitele. Metacykličtí promastigoti jsou po vstupu do hostitele fagocytováni do makrofágů, kde se transformují na amastigotní stádia, která se dále množí (shrnutí v Sadlova 1999, Kamhawi 2006).



Obr. 2-1: Schéma trávicího traktu flebotoma s vyvíjejícími se leishmaniami (převzato a upraveno z Kamhawi 2006).

2.2 Trávení krve – proteolytické enzymy, peritrofická matrix

Krevsající nematocerní hmyz shromažďuje nasátou krev v abdominálním mesenteronu, kde je zahuštěna oddělením vody od masy erytrocytů. Poté buňky střevního epitelu začnou produkovat peritrofickou matrix, která vytvoří v zadním mesenteronu obal plně obklopující přijatou potravu. Nejvyšší aktivita trávicích enzymů je v místě tenké vrstvy tekutiny mezi střevním epitelem a peritrofickou matrix. Trávení postupuje od vnějšího okraje směrem ke středu endoperitrofického prostoru a hem je metabolizován na hematin. Délka doby trávení závisí na okolní vlhkosti, teplotě a množství přijaté potravy. Po ukončení trávení je peritrofická matrix se zbytky krve vyloučena defekací ven z těla (přehled Clements 2000).

Aby leishmanie dokázaly ve svém přenašeči přežít a vyvíjet se, musejí v průběhu trávení překonat několik překážek. Mezi tyto překážky patří především trávicí enzymy, které mohou infekci potlačit v samotném začátku, peritrofická matrix, která tvoří fyzickou bariéru pro migraci leishmanií do mesenteronu, a vylučování strávené krve, kdy spolu se zbytky krve a peritrofické matrix mohou být vydefekovány i leishmanie (shrnuto v Sacks a Kamhawi 2001).

2.2.1 Proteolytické enzymy

Většinu živin v nasáté krvi tvoří proteiny, a proto při trávení krve mají hlavní úlohu proteolytické enzymy. Většina krevsajícího hmyzu produkuje alkalické proteázy a to především serinové proteázy trypsinového a chymotrypsinového typu (Lehane 1994). Příjem potravy ale spouští syntézu i dalších trávicích enzymů, kterými jsou aminopeptidázy, karboxypeptidázy a glukosidázy. Trávicí enzymy jsou uvolňovány do ektoperitrofického prostoru a některé skrz peritrofickou matrix prostupují do přijaté krve (přehled Clements 2000).

U nenasátých samic flebotomů je proteázová aktivita obecně velmi nízká a syntéza proteolytických enzymů se tak spouští až po sání krve, kdy je signifikantně měřitelná po 6 h a podle druhu flebotomů dosahuje nejvyšších hodnot mezi 12 – 48 h po sání. U druhu *Lu. longipalpis* má proteázová aktivita maximum mezi 12 – 24 h po sání krve, zatímco u *P. papatasi* dosahuje maximálních hodnot až mezi 24 – 34 h a u *P. langeroni* dokonce až okolo 48 h po přijetí krve. Na původní hodnoty klesá proteázová aktivita opět mezi 58 – 72 h po sání krve (Dillon a Lane 1993a, Telleria a kol. 2010).

Podle Dillon a Lane (1993a) je trypsinová aktivita lokalizována výhradně v lumenu střeva, zatímco aminopeptidázová aktivita je asociována zejména se střevní stěnou. Optimální hodnota pH pro trypsinovou aktivitu byla u *P. papatasi* a *P. langeroni* stanovena v rozmezí

pH 7,5 – 9,5 a pro aminopeptidázovou aktivitu pH 8. Autoři také detekovali chymotrypsinovou aktivitu, která odpovídá < 2 % trypsinové aktivity (Dillon a Lane 1993a).

Produkce serinových proteáz se liší u různých stádií flebotomů. U dospělců *Lu. anthophora* jsou ve větší míře produkovány enzymy trypsinového typu, kdežto u larev bylo naměřeno více enzymů chymotrypsinového typu. Aktivita těchto serinových proteáz stoupá v průběhu larválního vývoje a klesá před kuklením; u kukel mohou tyto enzymy sloužit k lyzi střeva, ke které dochází v průběhu kuklení (Mahmood a Borovsky 1992, 1993).

Novější studie popsaly u *P. papatasi* sedm různých serinových proteáz. Sekvenací cDNA knihoven nasátého a nenasátého střeva samic byly charakterizovány čtyři trypsinové a tři chymotrypsinové sekvence. V nenasátých střevech byly nalezeny tři trypsinové sekvence: *Pptryp 1 – Pptryp3*, z nichž nejčastější je *Pptryp1*, a sekvenací cDNA knihovny střeva 6 a 24 h po sání krve byla odhalena čtvrtá sekvence pro trypsin: *Pptryp4*. Zároveň byly v nasátém střevě identifikovány tři chymotrypsinové sekvence: *Ppchym1 – Ppchym3* (Ramalho-Ortigao a kol. 2003, 2007). Několik trypsinových a chymotrypsinových sekvencí bylo popsáno i u *P. perniciosus* a *Lu. longipalpis*, konkrétně u *P. perniciosus* byly charakterizovány tři trypsiny a pět chymotrypsinů a u *Lu. longipalpis* čtyři trypsiny a šest chymotrypsinů (Telleria a kol. 2007, Jochim a kol. 2008, Dostalova a kol. 2011). U všech tří druhů se některé transkripty serinových proteáz vyskytují převážně v nenasátém střevě a po sání krve jejich exprese významně klesá. Současně ale sání krve indukuje expresi jiných trypsinů a chymotrypsinů, jejichž transkripce byla v nenasátém střevě potlačena (Ramalho-Ortigao a kol. 2003, 2007, Telleria a kol. 2007, Jochim a kol. 2008, Dostalova a kol. 2011).

2.2.2 Peritrofická matrix

Peritrofická matrix (PM) je membránová, acelulární, semipermeabilní obal, který se po sání krve tvoří okolo přijaté potravy. Tato struktura je tvořena chitinem, proteiny a glykoproteiny a její funkce je připisována ochraně střevního epitelu před patogeny a před chemickým či mechanickým poškozením (shrnutí v Lehane 1997). U flebotomů je peritrofická matrix vícevrstevný útvar, který je složen z tenké vnější laminární vrstvy a ze silné vnitřní amorfní vrstvy. U *P. duboscqi* je sekrece chitinu zahájena ihned po příjmu potravy a produkce proteinů a glykoproteinů začíná kolem šesté hodiny po sání. Matrix je plně utvořena do 12 h od nasátí krve a její opětovný rozpad je působením chitináz flebotoma započat třetí den po sání, kdy se PM otevírá ve své zadní části (Sadlova a Volf 2009).

Peritrofická matrix představuje pro promastigoty leishmanií bariéru, která jim znemožňuje průnik do ektoperitrofického prostoru (shrnutí v Bates a Rogers 2004), ale

zároveň je ochraňuje v rané fázi infekci, kdy jsou zranitelní vůči proteolytickému poškození (Pimenta a kol. 1997).

Schlein a kol. (1991) publikovali, že rozpad PM se u neinfikovaných a infikovaných samic *P. papatasi* liší a že u infikovaných se PM rozpadá ve své přední části. Autoři předpokládají, že lyze chitinové vrstvy je zapříčiněna působením chitináz produkovaných *L. major*. Chitinázovou aktivitu u různých druhů leishmanií demonstrovali i Shakarian a Dwyer (1998, 2000). V novější studii ale Sadlova a Volf (2009) nezaznamenali žádné rozdíly v degradaci PM mezi neinfikovanými a infikovanými samicemi *P. duboscqi*. Ačkoliv se leishmanie nacházely převážně v přední případně střední části peritrofického prostoru, byl u obou skupin (infikované i neinfikované) rozpad PM zahájen na jejím zadním konci a tímto koncem také leishmanie pronikaly do ektoperitrofického prostoru. Podle autorů nemá tedy chitináza *L. major* významnou úlohu v desintegraci a rozpadu PM a leishmanie tak musejí „čekat“, než se matrix rozpadne působením chitináz flebotoma (Sadlova a Volf 2009).

2.3 Vliv procesů trávení na vývoj leishmanií

Adler (1938) jako první navrhl, že produkty trávení králíčeho séra mohou ničit promastigoty leishmanií, které nejsou specifické pro daný druh flebotoma. Později Schlein a Romano (1986) a Borovsky a Schlein (1987) publikovali, že infekce *L. major* výrazně snižuje proteázovou aktivitu ve střevě jejího přirozeného přenašeče *P. papatasi*, zatímco *L. donovani*, která za normálních podmínek v *P. papatasi* nepřežívá, pokles trypsinové či chymotrypsinové aktivity neindukuje. Pokud je ale do infikované krve přidán inhibitor trypsinu (soybean trypsin inhibitor), je infekce *L. donovani* schopná se v *P. papatasi* uchytit a rozvinout. Autoři na základě těchto výsledků předpokládají, že trypsinová aktivita znemožňuje přežití a uchycení infekce *L. donovani* ve střevě *P. papatasi*. Schopnost *L. major* modulovat tuto aktivitu v přirozeném přenašeči zajišťuje naopak uchycení a rozvinutí infekce (Schlein a Romano 1986, Borovsky a Schlein 1987).

Změny aktivity trávicích enzymů u samic *P. papatasi* infikovaných amastigoty *L. major* pozorovali Dillon a Lane (1993b). Tito autoři ale popsali zpoždění proteázové aktivity, kdy 30 h po sání krve byla u infikovaných samic aktivita nižší než u neinfikovaných, zatímco po 72 h byla u infikované skupiny naopak aktivita vyšší než u kontrolní. Při infekci *P. langeroni*, který není přirozeným vektorem *L. major*, ale infekce je schopná se v něm uchytit, byl nástup proteázové aktivity také oddálen, ale pokles nebyl tak výrazný jako u *P. papatasi*. Podle autorů může mít zpoždění produkce proteáz ve střevě flebotoma dva pozitivní účinky na vývoj leishmanií: jednak potlačení škodlivého účinku proteolytických enzymů v časně fázi

infekce, nebo zvýšení množství dostupných živin pro rostoucí populaci leishmanií (Dillon a Lane 1993b). Dostalova a kol. (2011) publikovali, že infekce *L. infantum* ve střevě *P. perniciosus* indukuje redukci transkripce genu pro trypsin *PperTryp3*. Snížení trypsinové aktivity v přítomnosti leishmanií ve střevě bylo prokázáno i u novosvětského druhu *Lu. longipalpis* infikovaného *L. mexicana* a *L. infantum chagasi* (Sant'Anna a kol. 2009, Telleria a kol. 2010). S těmito názory jsou ale v rozporu studie Pimenta a kol. (1997) a Secundino a kol. (2010), podle kterých infekce *L. major* neindukuje snížení trypsinové aktivity ve specifických přenašečích *P. papatasi* a *P. duboscqi*. Autoři se tedy v teorii ohledně vlivu leishmanií na trypsinovou aktivitu ve střevě vektorů úplně neshodují a i u jednoho druhu existují různé názory.

Volf a kol. (2001) demonstrovali pozitivní vliv heparinu na vývoj *L. major* v jejím přirozeném vektoru *P. duboscqi*. Heparin přidaný do infikované krve signifikantně snížil trypsinovou aktivitu 12 a 72 h po sání, zároveň ale neovlivnil mortalitu, defekaci ani ovipozici samic. Autoři zaznamenali, že heparin měl vliv na procento infikovaných samic a intenzity infekcí. Signifikantní rozdíl byl pozorován třetí den po sání (Volf a kol. 2001). Podobný vliv heparinu popsali v dřívější studii i Schlein a Jacobson (1998). Po sání heparinované krve s amastigoty či promastigoty *L. donovani* byla proteázová aktivita snížena a oddálena, čímž bylo umožněno uchycení infekce *L. donovani* v jejím nepřirozeném přenašeči *P. papatasi* (Schlein a Jacobson 1998).

Pimenta a kol. (1997) se věnovali studiu role peritrofické matrix. Prokázali, že peritrofická matrix je sice bariérou bránící leishmaniím v průniku do ektoperitrofického prostoru, ale zároveň chrání parazity v časně fázi transformace z amastigotního do promastigotního stadia (2 – 8 h po sání), tedy v době, kdy jsou leishmanie náchylné k proteolytickému poškození. Pokud byla samicím *P. papatasi* do sání krve s amastigoty *L. major* přidána chitináza, která zabránila tvorbě peritrofické matrix, docházelo po 4 h k 90% potlačení infekce a do 12 h byla nákaza eliminována prakticky úplně. Byl-li do krve s amastigoty a chitinázou současně přidán i inhibitor trypsinu, docházelo ke zřetelně nižšímu poklesu infekce. Zdá se tedy, že i přestože je 4 h po sání trypsinová aktivita nízká, postačuje v nepřítomnosti peritrofické matrix k eliminaci infekce (Pimenta a kol. 1997).

Flebotomové jsou ektotermní živočichové a stejně jako ostatní hmyz jsou ovlivňováni okolní teplotou. Teplota prostředí má vliv jak na délku vývojového cyklu, tak i na přežívání larválních stádií a délku života dospělých jedinců (Theodor 1936, Ready a Croset 1980, Guzman a Tesh 2000, Kasap a Alten 2005, Benkova a Volf 2007). Teplota prostředí je

zároveň jedním z faktorů, který ovlivňuje i vývoj leishmanií. Vlivem teploty na vývoj leishmanií ve střevech flebotomů se ve svých studiích zabývali Leaney (1977), Rioux a kol. (1985) a Anez a kol. (1989). Leaney (1977) testoval vliv tří různých teplot (22, 25 a 28 °C) na vývoj *L. mexicana amazonensis* ve střevě *Lu. longipalpis*. U samic chovaných ve 28 °C bylo osídlení parazity značně odlišné od jedinců držných ve 22 a 25 °C. Zatímco při nižších teplotách bylo infikováno 70 a 75 % samic, při vyšší teplotě bylo zjištěno pouhých 30 % infikovaných případů, u kterých byly zároveň i nižší intenzity nákazy. Pokles procenta infikovaných samic při 28 °C je pravděpodobně způsoben rychlejším trávením, díky čemuž nestihne před defekací proniknout do ektoperitrofického dostatečné množství leishmanií (Leaney 1977).

K závěrům, že teplota může ovlivňovat vývoj leishmanií v přenašeči, dospěli i Rioux a kol. (1985). Autoři ve svých experimentech chovali samice *P. ariasi* infikované *L. infantum* v teplotách 10, 15, 20 a 25 °C. Teploty 5 a 30 °C se ukázaly jako letální pro flebotomy i leishmanie. Ve vyšší teplotě se zvyšovalo procento infikovaných samic a zároveň se i zrychlilo dělení promastigotů v mesenteronu a zvýšilo se procento samic s kolonizovanou stomodeální valvou. Zatímco při 10 a 15 °C nebyly leishmanie na stomodeální valvě zachyceny, při 20 a 25 °C mělo valvu osídleno 6 %, respektive 22 % infikovaných samic. Optimální teplotu pro vývoj *L. infantum* ve střevech autoři určili jako 25 °C.

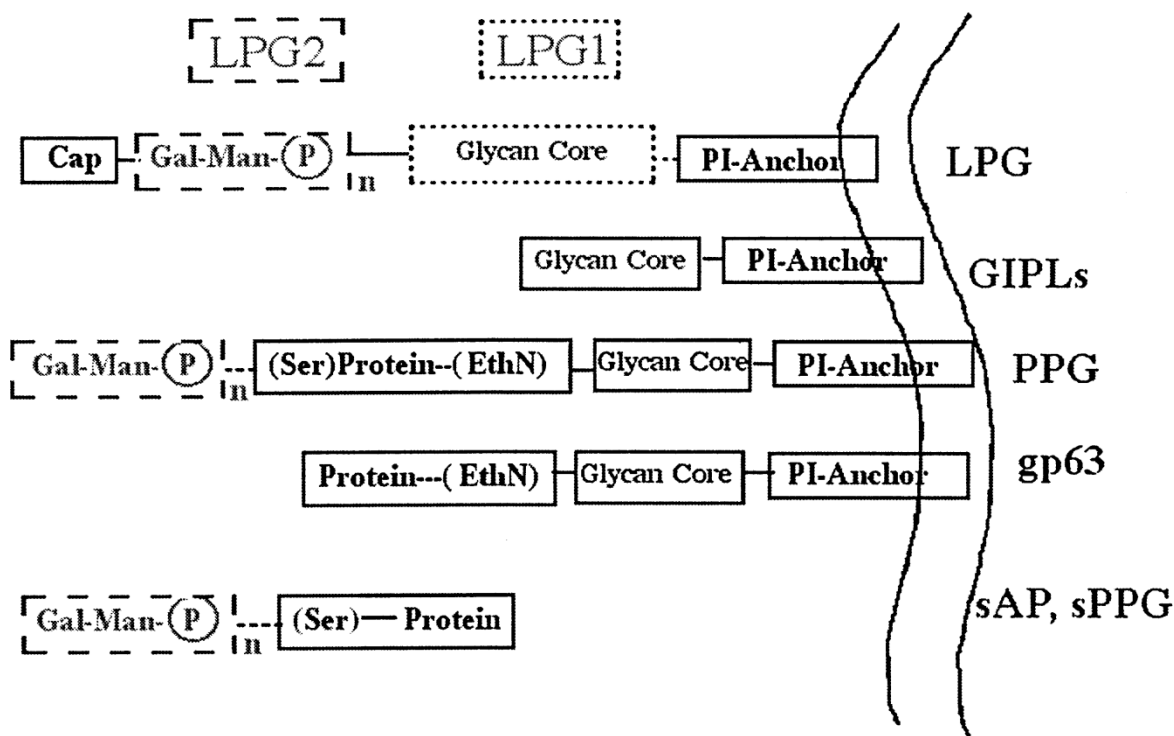
Vlivem teploty na vývoj leishmanií v přenašeči se zabývali i Anez a kol. (1989), kteří ale zároveň hodnotili i efekt typu podaného cukru (sacharózy, fruktózy a maltózy). Samice *Lu. youngi* infikovali *L. mexicana amazonensis* a poté je rozdělili do tří skupin, jedna byla krmena 30% roztokem sacharózy, druhá 30% roztokem fruktózy a třetí 30% roztokem maltózy. Každou skupinu zároveň rozdělili na tři další podskupiny, které byly umístěny do různých teplot – 22, 25 a 28 °C. Ačkoliv je *L. mexicana amazonensis* známá svým suprapylárním vývojem (Lainson a kol. 1977), byl tento typický vývoj zaznamenán pouze u samic krmených sacharózou a držných v teplotě 25 °C a 28 °C, naproti tomu ve všech ostatních případech autoři pozorovali i atypickou lokalizaci, kdy se leishmanie nacházely v pyloru, malpigických trubicích a zadním střevě. Autoři zároveň upozorňují, že výsledky mohou být ovlivněny tím, že *Lu. youngi* není přirozeným přenašečem *L. mexicana amazonensis* (Anez a kol 1989).

Vliv teploty na vývoj leishmanií byl zaznamenán i v naší laboratoři. U samic *P. papatasi* držných ve 23 °C byla pozorována vyšší vnímavost k infekci *L. major* než u samic chovaných za teploty 28 °C (nepublikováno). Zvýšení vnímavosti k infekci je vysvětlováno oddálením defekace, kdy u samic chovaných ve 23 °C byla ve srovnání s 28 °C

zpožděna defekace o 12 – 36 h (Benkova a Volf 2007). Leishmanie tak pravděpodobně mají více času k rozvoji infekce. Jelikož si uvědomuji, že teplota prostředí může mít vliv na vývoj leishmanií, dbala jsem ve svých experimentech na to, aby byly všechny pokusné skupiny flebotomů chovány ve stejné a stabilní teplotě.

Procesy spojené s trávením krve tedy mohou být pro parazity letální a vytvářejí nepříznivé podmínky pro vývoj infekce. Proto si leishmanie musely v průběhu evoluce vyvinout mechanismy a molekuly, které jim zajistí přežití v nepřátelském prostředí. Molekuly, kterým je připisována ochrana leishmanií před proteolytickým poškozením, patří především do rodiny glykokonjugátů. Část těchto molekul obsahuje opakující se sekvenci fosfoglykanu [PO₄-6Gal(β1-4)Manα1)], mezi ně patří povrchově vázané nebo volně sekretované proteofosfoglykany (PPG a sPPG), glykolipidy, jako je lipofosfoglykan (LPG), a sekretovaná fosfatáza (sAP). Mezi glykonjugáty patří i molekuly neobsahující fosfoglykanovou sekvenci, což jsou glykofosfatidylinositolové lipidy (GIPLs) a povrchový glykoprotein metaloproteináza gp63. Povrchové molekuly (LPG, PPG, GIPLs a gp63) jsou k membráně leishmanií vázány pomocí glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvy (shrnutí v Sacks a Kamhawi 2001, Kamhawi 2006). Hlavní glykokonjugáty promastigotů leishmanií jsou schematicky znázorněny na obrázku 2-2.

Podle Sacks a kol. (2000) jsou fosfoglykany důležité v časně fázi vývoje pro ochranu promastigotů před poškozením způsobeným proteolytickými enzymy. Nejhojnějšími molekulami na povrchu promastigotů jsou GIPLs, jejich funkce není úplně známa, ale je připisována ochraně leishmanií před proteolytickým poškozením ve střevě flebotoma (McConville a Ferguson 1993, Guha-Niyogi a kol. 2001, Ralton a kol. 2002). LPG, které se též hojně vyskytuje na povrchu promastigotů leishmanií, však nemá zásadní význam pro přežití parazita před defekací v rané fázi infekce, ale je důležité pro přichycení promastigotů k mikroklkům střeva zejména v průběhu defekace (Sacks a kol. 2000, Secundino a kol. 2010). LPG hraje významnou úlohu v uchycení infekce *L. major* v jejím specifickém vektoru *P. papatasi* a *P. duboscqi*, ale nemá vliv na přežití těchto leishmanií v permisivních druzích přenašeče jako jsou *Lu. longipalpis*, *P. arabicus*, *P. perniciosus* a *P. argentipes* (Myskova a kol. 2007, Volf a Myskova 2007, Svarovska a kol. 2010).



Obr. 2-2: Hlavní glykokonjugáty promastigotů leishmanií (převzato ze Sacks a Kamhawi 2001).

Jinými molekulami chránícími leishmanie před proteolytickým poškozením mohou být inhibitory serinových proteáz. Eschenlauer a kol. (2009) ve své studii popsali u *L. major* inhibitor serinových proteáz (ISP), který působí inhibičně na trypsin, chymotrypsin a neutrofilní elastázu. Není však doposud jisté, zda tento inhibitor má nějakou roli při vývoji leishmanií v přenašeči (Eschenlauer 2009).

Infekce může být potlačena i v době, kdy je strávená krev se zbytky peritrofitické matrix vylučována ven ze střeva flebotoma. Při procesu defekace mají úlohu peristaltické pohyby střeva. Vaidyanathan (2004, 2005) u *L. major* charakterizoval neuropeptid s myoinhibičními účinky, který potlačuje peristaltické pohyby ve středním a zadním střevě *P. papatasi* a o něco méně i u *Lu. longipalpis*. Myoinhibiční aktivita byla detekována i u *L. braziliensis* a u súdánského kmene *L. donovani*. Inhibiční účinky v nespecifickém vektoru jsou menší než ve specifickém, což naznačuje, že jsou tyto myoinhibitory druhově specifické. Inhibice peristaltiky má za následek uvolnění a roztažení střeva, čímž se zvyšuje šance leishmanií na udržení a uchycení se ve střevě (Vaidyanathan 2004, 2005).

2.4 Vliv druhu nasáté krve

2.4.1 Vliv druhu nasáté krve na fekunditu flebotomů

Reprodukční potenciál samic flebotomů závisí na různých faktorech, jedním z nich je i dostupnost a schopnost nalezení vhodného hostitele jakožto zdroje krve. Několik studií ukázalo, že druh krve může mít vliv na průběh trávení, dobu kladení a množství nakladených vajec. Ward (1977) publikoval, že druh *Lu. flaviscutellata* naklade po sání na křečkovi více vajec než po sání na člověku nebo jihoamerickém hlodavci rodu *Oryzomys*. Ready (1979) porovnával u *Lu. longipalpis* množství zralých vajec po sání na sedmi různých savčích hostitelích a zjistil, že jednotlivé druhy krve se nutritivně liší a množství nakladených vajec závisí zřejmě na obsahu proteinů a aminokyselin v nasáté krvi. Podobných výsledků dosáhli i u starosvětských druhů (*P. perniciosus* a *P. kazeruni*) Benito-De Martin a kol. (1994) a Hanafi a kol. (1999), kteří rovněž ukázali, že fekundita samic závisí na druhu nasáté krve.

Vliv druhu krve na různé biologické aspekty *Lu. ovallesi* studovali velmi podrobně Noguera a kol. (2006). Ke svým experimentům zvolili koňskou, psí, kraví, kuřecí, kozí, prasečí a lidskou krev, kterou samicím *Lu. ovallesi* podávali saním přes membránu. U nasátých samic pak sledovali délku jejich života, dobu trávení, čas vykladení a počty nakladených a vylíhlých vajec, viz tabulka 2-1. Ukázalo se, že nejkratší doba trávení je po sání kuřecí krve a naopak nejdelší po sání lidské a koňské. Délka trávení však nekoreluje s časem kladení; po sání kuřecí krve je doba vykladení naopak nejdelší a nejkratší je po sání prasečí krve. Druh nasáté krve ovlivňuje rovněž fekunditu, ta je nejvyšší po sání kuřecí a nejnižší po sání prasečí krve. V experimentu byl pozorován rozdíl i v délce života nasátých samic - nejdelší je u kravské a kuřecí krve a nejkratší u psí krve (Noguera a kol. 2006). Dostupnost a preference určitých hostitelů tak může mít vliv na celkový reprodukční potenciál populací flebotomů a samozřejmě hraje úlohu v přenosu leishmaniózy.

Tab. 2-1: Vliv druhu nasáté krve na trávení, kladení, délku života a fekunditu nasátých samic *Lutzomyia ovallesi*. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty ve dnech (d) od nasátí krve a průměrný počet nakladených a vylíhlých vajec na samici (podle Noguera a kol. 2006, upraveno).

	kuřecí k.	kravská k.	kozí k.	prasečí k.	psí k.	lidská k.	koňská k.
doba trávení	3,3 d	4 d	4,05 d	4,1 d	4,2 d	4,3 d	4,55 d
čas kladení	5,9 d	5,7 d	5,3 d	5,65 d	5,2 d	5,6 d	5,45 d
přežívání po sání	5,45 d	5,6 d	5,05 d	5,3 d	4 d	5,3 d	4,6 d
fekundita	30	22	27	24	28	23	23

Naproti tomu u *P. papatasi* není po sání lidské nebo zvířecí krve výrazný rozdíl v mortalitě, množství nakladených vajec a jejich životaschopnosti (Harre a kol. 2001). Autoři ke svým experimentům zvolili lidskou, koňskou, kravskou, prasečí, králičí a křeččí krev a zjistili, že po sání lidské krve je sice nakladeno nejméně vajec, nicméně rozdíl není signifikantní. Po shrnutí všech sledovaných parametrů dospěli autoři k závěru, že lidská krev není lepší, ale ani se nijak výrazně neliší od ostatních savčích kreví (Harre a kol. 2001).

Sant'Anna a kol (2010) zjišťovali nutritivní hodnoty psí, lidské, králičí a kuřecí krve a jejich vliv na samice *Lu. longipalpis*. Ukázalo se, že psí a lidská krev obsahují signifikantně více hemoglobinu než králičí nebo kuřecí krev a že savčí krev obsahuje výrazně více proteinů než ptačí. Zatímco mezi lidskou, psí a králičí krví není v obsahu proteinů výrazný rozdíl, kuřecí krev má proteinů dvakrát méně než ostatní testované krve. Tyto výsledky tedy ukazují, že 1 ml kuřecí krve je nutritivně chudší než 1 ml savčí krve a to především psí a lidské. Pokud byl ale obsah hemoglobinu a proteinů měřen v plně nasátých střevech samic *Lu. longipalpis*, vypadala situace poněkud odlišně a obsah hemoglobinu i proteinu se u jednotlivých druhů krve téměř vyrovnal. Hodnota koncentrace proteinů i hemoglobinu byla po sání kuřecí krve dokonce vyšší než po sání králičí krve. Stále bylo naměřeno nejvíce hemoglobinu a proteinů v psí krvi, ale rozdíl mezi skupinami už nebyl zdaleka tak výrazný. Autoři tedy předpokládají, že samice *Lu. longipalpis* jsou schopné kompenzovat nižší obsah živin v krvi tím, že krev při sání výrazně zahustí mechanismem prediurézy (Sant'Anna a kol. 2010). Flebotomové stejně jako komáři vylučují moč v průběhu sání a tím zahušťují přijatou krev a obnovují osmotickou rovnováhu. Prediuréza začíná 1 – 2 min po začátku sání a množství vyloučené moči pozitivně koreluje s délkou sání. Vylučování kapiček moči v průběhu sání bylo zaznamenáno u 100 % testovaných samic *P. papatasi* a u 85 % samic *P. duboscqi*. Zároveň bylo pozorováno, že jednotlivé samice se liší jak v době trvání prediurézy, tak v počtu vyloučených močových kapiček. U infikovaných samic se ve vyloučených kapičkách moči také mohou vyskytovat leishmanie (Sadlova a kol. 1998, Sadlova a Volf 1998).

2.4.2 Vliv druhu nasáté krve na vývoj leishmanií ve střevě přenašeče

Trávení nasáté krve hraje důležitou roli i při uchycení a vývoji leishmaniové infekce. V průběhu 2 – 3 dní, kdy je přijatá krev trávena, musí leishmanie překonat nepříznivé podmínky okolního prostředí (Schlein a Romano 1986, Borovsky a Schlein 1987, Pimenta a kol. 1997). Různé enzymatické procesy ve střevě jsou aktivovány různými typy potravy a zdá se, že pro leishmanie může být krev od některých hostitelů letální (Adler 1964 podle Schlein a kol. 1983).

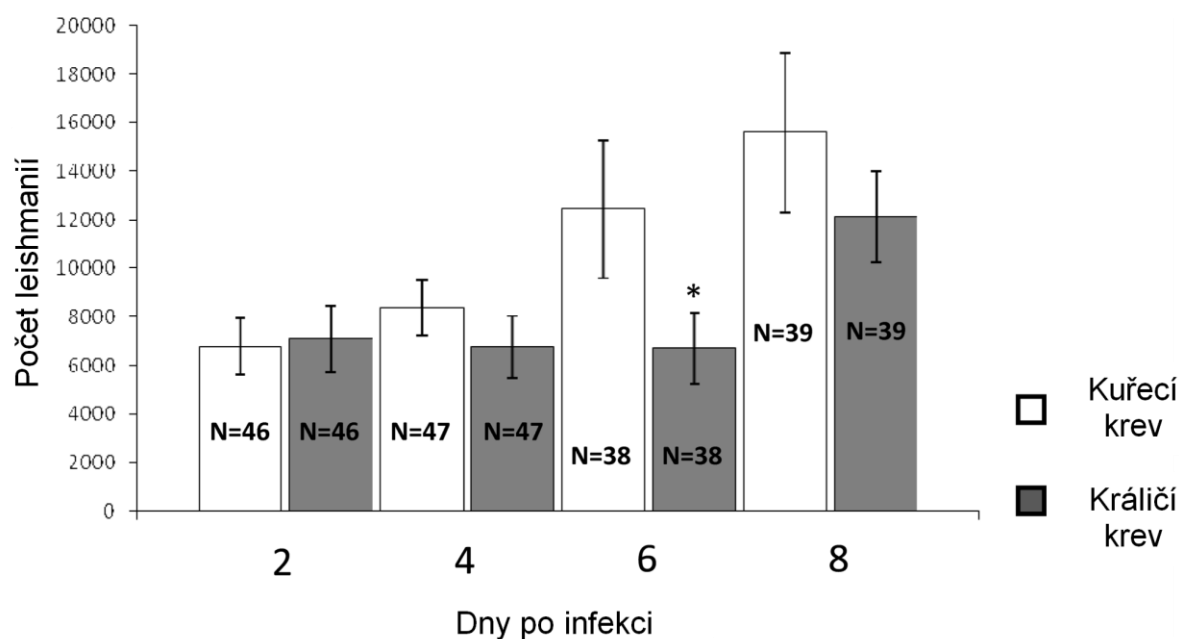
Podle Schlein a kol. (1983) je infekce leishmanií (popsáno jako *L. tropica*; dnes *L. major*) ve střevích *P. papatasi* potlačena, pokud samice před nebo po infekčním sání sají na krocanech. Autoři infikovali samice z 5% králičí krve (2×10^6 promastigotů/ml) nebo pouze z fyziologického roztoku (2×10^6 promastigotů/ml) a za 24 h je nechali sát na krocanech. Při jiném schématu pokusu samice infikovali z králičí krve (2×10^6 promastigotů/ml) jeden den nebo jeden týden po sání na krocanech. U prvního typu experimentu, kde byly samice infikovány z 5% krve a poté sáty na krocanech, byly leishmanie přítomny u 86 % samic, ale téměř 50 % infekcí byla pouze slabé intenzity. Ve druhém typu pokusu, kde byly leishmanie podány samicím pouze ve fyziologickém roztoku, bylo po sání na krocanech infekčních pouhých 5 % případů. K redukci infekce docházelo i v experimentech, kdy byly samice infikovány jeden den nebo i jeden týden po sání na krocanech. V případech, kdy byla samicím podána krev s leishmaniemi jeden den po sání na krocanech, bylo před defekací infekčních 54 % samic, zatímco po defekaci pouze 26 % samic. Pokud samice sály na krocanech týden před infekčním sáním, byla infekce zjištěna u 25 % samic. Ve studii bohužel chybí regulérní pozitivní kontroly, neboť je zde uveden pouze dlouhodobý průměr z předešlých experimentů, který činí 86 % pozitivních samic. Autoři se domnívají, že infekce jsou signifikantně redukovány následkem vysoké DNAsové aktivity, která je indukována přítomností jader v ptačích erytrocytech (Schlein a kol. 1983). Infekce *L. major* byla prý potlačena u 100 % samic i v případech, kdy byla samicím 24 h po infekčním sání podána kuřecí krev, výsledky však nejsou v práci uvedeny (Schlein a Jacobson 1994).

Vlivem druhu přijaté krve na vývoj leishmanií (*L. braziliensis* a *L. amazonensis*) u novovětských flebotomů se později podrobně zabývali Nieves a Pimenta (2002), kteří ke svým experimentům použili lidskou a sedm zvířecích krví. Samice flebotomů *Lu. migonei* infikovali přes membránu sáním krve z osmi různých hostitelů (člověka, psa, koně, vačice, krysy rodu *Cercomys*, kuřete, myši nebo křečka) smíchané s 2×10^7 amastigotů/ml krve. V následujících dnech pak sledovali mortalitu flebotomů a procenta infikovaných samic. Rozdíly byly pozorovány jak v mortalitě, tak i v procentu nakažených samic, viz tabulka 2-2. Nejnižší procento infikovaných samic bylo po sání kuřecí a křeččí krve a nejvyšší naopak po sání krysí krve. I když se ale mezi jednotlivými skupinami vyskytovaly rozdíly, žádný typ krve (tedy ani kuřecí) neeliminovat infekci tak, jak popsali Schlein a kol. (1983) a Schlein a Jacobson (1994) ve svých studiích s *P. papatasi*, *L. major* a krocání nebo kuřecí krví.

Tab. 2-2: Mortalita a procenta infikovaných samic *Lu. migonei* po sání různého druhu krve s amastigoty *L. braziliensis* a *L. amazonensis* (podle Nieves a Pimenta 2002).

hostitel	<i>Leishmania braziliensis</i>		<i>Leishmania amazonensis</i>	
	mortalita (%)	% infikovaných	mortalita (%)	% infikovaných
člověk	49	78	49	76
pes	60	76	81	68
kůň	49	75	66	70
vačice	63	79	68	65
krysa	67	81	71	81
kuře	32	65	25	43
myš	75	73	65	68
křeček	57	57	54	55

K obdobným závěrům, to jest, že kuřecí krev neinhibuje vývoj leishmanií v novosvětských flebotomech dospěli ve své studii i Sant'Anna a kol. (2010). Autoři uvádějí, že po sání kuřecí nebo králičí krve s amastigoty *L. mexicana* (2×10^6 amastigotů/ml) byl mezi skupinami částečný rozdíl v procentu infikovaných samic, ale naopak o něco více infikovaných samic bylo ve skupině sáte kuřecí krev; po sání králičí krve bylo infikováno 68 – 89%, zatímco po sání kuřecí 82 – 96 %. Současně byla u samic infikovaných z kuřecí krve pozorována tendence k vyšším intenzitám nálezů, viz obrázek 2-3. Autoři také pozorovali signifikantní rozdíl v četnosti různých morfologických stádií. U samic infikovaných z kuřecí krve byla zaznamenána tendence k pomalejšímu vývoji leishmanií: druhý den po sání u nich bylo více procyklických stádií a méně nektomonád, šestý den více nektomonád a leptomonád a méně metacyklických stádií. Po infekci z kuřecí krve se tedy opozdila transformace do metacyklických stádií, ale osmý den po infekčním sání již nebyl mezi skupinami signifikantní rozdíl. Podle autorů nemá tedy kuřecí krev negativní vliv na průběh infekce *L. mexicana* v *Lu. longipalpis* (Sant'Anna a kol. 2010).



Obr. 2-3: Počet leishmanií ve střevě samic *Lu. longipalpis* po infekčním sání kuřecí nebo králičí krve (podle Sant'Anna a kol. 2010, upraveno).

2.5 „Trypsin modulating oostatic factor“ (TMOF)

2.5.1 Syntéza, sekrece a struktura TMOF

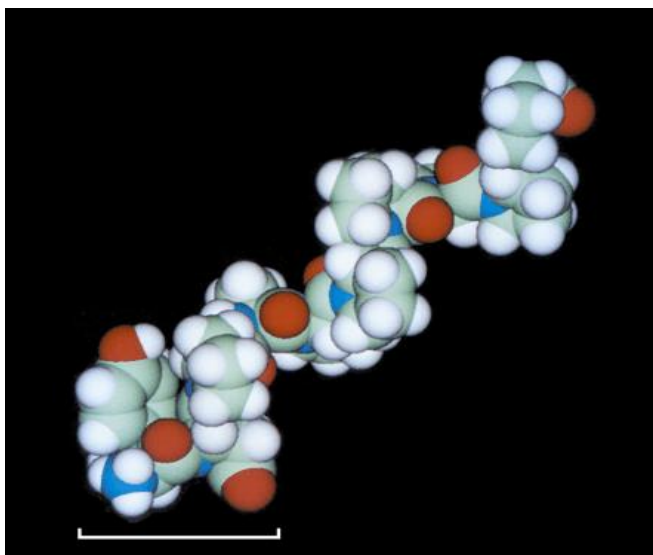
„Trypsin modulating oostatic factor“ je komáří hormon, který ve střevních epitelálních buňkách moduluje syntézu trypsinu. Po sání krve je syntetizován ve folikulárních buňkách vaječníků odkud se uvolňuje do hemolymfy. Poté se váže na specifické receptory střevních epitelálních buněk, kde modulací translace trypsinové mRNA ukončuje syntézu trypsinu. V experimentech, kdy je TMOF přidán komářími samicím do potravy nebo jim je injikován rektem přímo do střeva, je blokována syntéza trypsinu a dochází tak k inhibici vitelogeneze a vývoje vajec (Borovsky 1985, 1988, Borovsky a kol. 1990, 1996). Na základě těchto pokusů se uvažuje o možnosti využití TMOF v biologickém boji s komáry (Borovsky a kol. 1998).

Částečně purifikovaný hormon byl injikován do hemolymfy samic komárů a bylo prokázáno, že kontroluje syntézu serinových proteáz a blokuje syntézu vitelogeninu a ukládání žloutku, proto byl tento hormon nazván „trypsin modulating oostatic factor“ (Borovsky 1985, 1988). Jako místo syntézy TMOF byly za pomoci imunocytochemických metod určeny folikulární buňky vaječníků. U *Aedes aegypti* je syntéza TMOF započata 18 h po sání krve, maximálních hodnot sekrece dosahuje po 33 h a poté začíná rychle klesat – po 48 h je sekrece téměř na minimu. Syntéza TMOF vaječnými koreluje s inhibicí syntézy trypsinu ve střevech samic. U samice *A. aegypti* s odstraněnými vaječnými byl trypsin

produkován kontinuálně 64 h po sání, zatímco u kontrolních samic byla syntéza ukončena po 40 h (Borovsky a kol. 1994b).

S využitím hmotnostní spektrometrie byl TMOF charakterizován jako dekapeptid, jenž je v roztoku přítomen jako levotočivý α helix s primární aminokyselinovou sekvencí: NH₂-Tyr-Asp-Pro-Ala-(Pro)₆-COOH, viz obrázek 2-3 (Borovsky a kol. 1990, 1993, Curto a kol. 1993). Aktivita peptidu je snížena v případě, kdy jsou na N-konci zaměněny aminokyseliny Tyr a Asp nebo když je na C-konci vyjmuto dva až pět prolinů, což dokazuje, že N- i C-konec jsou pro aktivitu hormonu podstatné (Borovsky a kol. 1993). V Experimentech s 29 syntetickými analogy tohoto peptidu bylo prokázáno, že biologická aktivita hormonu je obsažena v tetrapeptidu Tyr-Asp-Pro-Ala (Borovsky a Meola 2004).

I když původně nebyl tento hormon nalezen v mozkových gangliích dospělců (Borovsky a kol. 1994b), pozdější experimenty prokázaly, že u dospělců krmených pouze cukrem a u larev je TMOF syntetizován i centrální nervovou soustavou (Borovsky a Meola 2004).



Obr. 2-3: 3D NMR model - „*Aedes aegypti* trypsin modulating oostatic factor“ (*Aea*-TMOF). Na N-konci je označena aminokyselinová sekvence prvních čtyř aminokyselin (Tyr-Asp-Pro-Ala), které jsou důležité při vazbě TMOF na membránový receptor (podle Borovsky 2003).

2.5.2 Efekt TMOF na larvy a dospělé samice komárů

Klasické inhibitory trypsinu [např.: TLCK (p-tosyl-L-lysin-chlormetylketon), TPCK (p-tosyl-L-fenylalaninchlormetylketon) a soybean inhibitor trypsinu] se váží do aktivního místa serinových proteáz a brání hydrolyze. TMOF působí ale poněkud jinak; váže se na specifické receptory vyskytující se na střevních epitelálních buňkách, moduluje translaci trypsinové mRNA a potlačuje tak syntézu trypsinu (Borovsky a kol. 1990, 1994a, 1996).

Po injikování purifikovaného značeného TMOF do hemolymfy samic *A. aegypti* bylo prokázáno, že pokud je hormon injikován po sání krve, je v thorakálním mesenteronu rychle metabolizován (poločas rozpadu 1,6 h) a to patrně endopeptidázami a aminopeptidázami na pentapeptid a tripeptid. Inhibice syntézy trypsinu byla proto monitorována v abdominálním mesenteronu, který syntetizuje trypsin, ale nemetabolizuje TMOF. Po injikování TMOF do hemolymfy v oblasti abdomenu v koncentracích 3×10^{-9} M a $6,8 \times 10^{-6}$ M způsobil hormon redukci syntézy trypsinu o 50 a 90 % (Borovsky a kol. 1993).

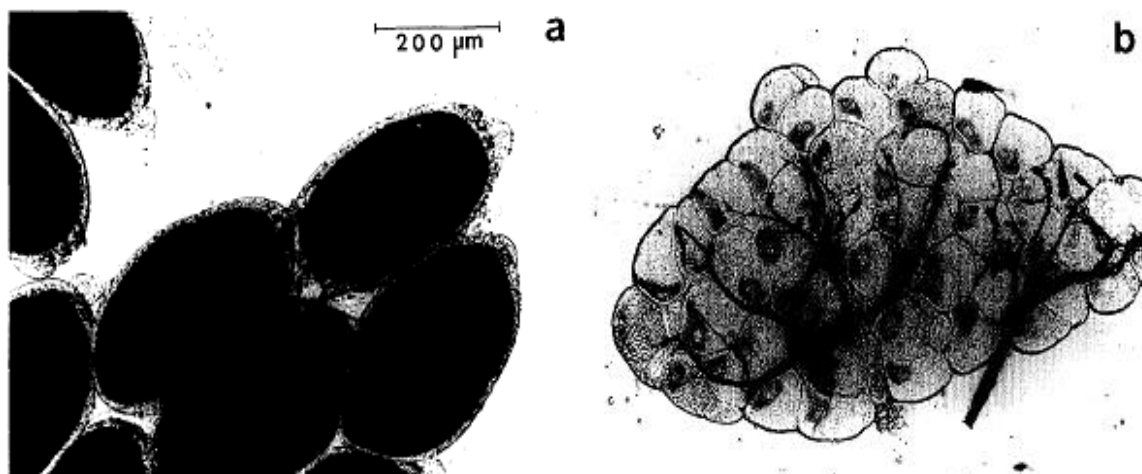
Borovsky a Mahmood (1995) sledovali účinky TMOF na syntézu trypsinu a vývoj vajec u samic *A. aegypti*, kterým byl podán rekombinantní *Aedes aegypti* TMOF (*Aea*-TMOF). U samic, kterým byla rektem do střeva injikována krev obsahující *Aea*-TMOF (20 μ g TMOF/3 μ l krve), byla o 80 % potlačena syntéza trypsinu a zároveň byl inhibován i vývoj vajec, zatímco u kontrolních samic, kterým byla rektem injikována pouze krev, probíhalo trávení a vývoj vajec obvyklým způsobem. Rozdíly mezi samicemi, kterým byl podán *Aea*-TMOF, a kontrolními jsou zobrazeny na obrázku 2-4.

Obdobné výsledky byly dosaženy i ve studii, kde byl samicím přidán *Aea*-TMOF do krve při sání přes membránu. TMOF musel být tedy transportován skrz stěnu střeva do hemolymfy, kde se navázal na receptory střevních epitelálních buněk (Borovsky a Mahmood 1995). Z těchto výsledků vyplývá, že by orálně podávaný TMOF mohl být využit jako insekticid proti dospělčům komárů. Překážkou při využití TMOF v biologickém boji může být jeho degradace střevními proteázami. Shen a kol. (2009) konjugovali TMOF alifatickým polymerem polyetylen glykolu a zvýšili tak jeho stabilitu a usnadnili přechod do hemolymfy. K metabolismu takto modifikovaného TMOF poté už nedocházelo (Shen a kol. 2009).

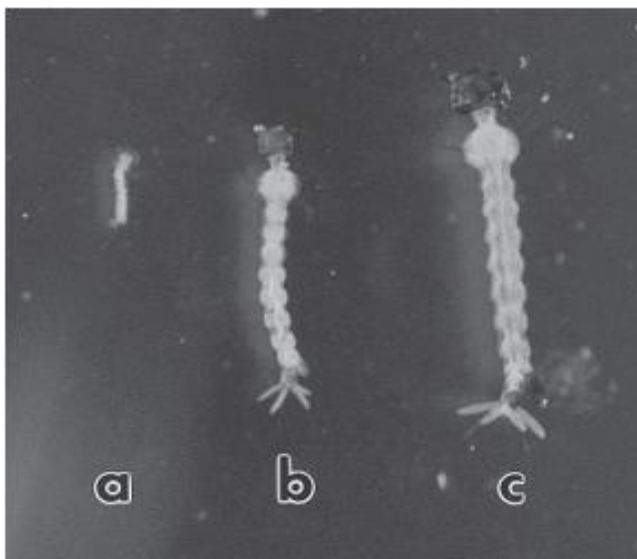
Ukazuje se ale, že praktičtější jsou kontrolní metody zaměřené na larvální stádia. Pokud byly larvy *Aedes aegypti* a *Culex quinquefasciatus* krmeny pivními kvasinkami s adsorbovaným *Aea*-TMOF, byla potlačena syntéza trypsinu, zpomalil se růst a vývoj a zvýšila se mortalita (Borovsky a Meola 2004). Inhibice růstu larev je ukázána na obrázku 2-5. Lau a kol. (2011) publikovali, že 300 a 400 ppm kvasinek produkujících TMOF (*Pichia*-TMOF) způsobilo u prvních larválních instarů *A. aegypti* v průběhu osmi dní po podání kumulativní mortalitu 67 % a 100 % (Lau a kol. 2011).

Aea-TMOF působí i na larvy jiných druhů komárů (*Culex quinquefasciatus*, *Culex nigripalpus*, *Anopheles quadrimaculatus* a *Aedes taeniorhynchus*), což by nasvědčovalo tomu, že i ostatní druhy komárů mají hormon typu TMOF. Jisté rozdíly v efektu *Aea*-TMOF na jiné druhy komárů ovšem poukazují, že analogy u ostatních druhů jsou

podobné, ale mohou být rozdílně transportovány ze střeva do hemolymfy nebo se mohou odlišovat v aminokyselinové sekvenci (Borovsky a Meola 2004).



Obr. 2-4: Oocyty vyjmuté ze samic *A. aegypti* 48h po podání krve, rektum byla injikována krev obsahující: **a:** vodu nebo **b:** 20µg *Aea*-TMOF (podle Borovsky a Mahmood 1995).



Obr. 2-5: Efekt *Aea*-TMOF na larvální růst a vývoj. Komáří larvy byly krmeny pivními kvasinkami (200 µg) s adsorbovaným *Aea*-TMOF v různých koncentracích **a:** 188 µg, **b:** 45 µg a **c:** bez přidaného TMOF (podle Borovsky a Meola 2004).

2.5.3 Efekt TMOF na jiné druhy hmyzu

Borovsky a kol. (1993) zjišťovali účinek purifikovaného TMOF (H-YDPAPPPPPP-OH) a jeho syntetického analogu TMOF(B) (H-DYPAPPPPPP-OH), u něhož byly prohozeny první dvě aminokyseliny, i na další druhy parazitického hmyzu, konkrétně na bodalku *Stomoxys calcitrans*, tiplíka *Culicoides variipennis*, blechu *Ctenocephalides felis* a flebotomu *Lutzomyia anthophora*. Dospělce krmili krví a poté jim v oblasti abdomenu injikovali do

hemolymfy TMOF nebo jeho analog a prokázali, že TMOF a TMOF(B) mají jistý efekt i na ostatní druhy hmyzu (Borovsky a kol. 1993). V tabulce 2-3 jsou shrnuty výsledky potlačení syntézy proteolytických enzymů u zmiňovaných druhů hmyzu.

Tab. 2-3: Efekt TMOF nebo TMOF(B) na syntézu proteolytických enzymů (podle Borovsky a kol. 1993).

Druh hmyzu	hormon	koncentrace hormonu (M)	inhibice syntézy proteolytických enzymů (%)
<i>Culicoides variipennis</i>	TMOF(B)	$2,9 \times 10^{-4}$	61
<i>Stomoxys calcitrans</i>	TMOF	$8,2 \times 10^{-4}$	46
<i>Ctenocephalides felis</i>	TMOF(B)	$4,8 \times 10^{-4}$	41
<i>Lutzomyia anthophora</i>	TMOF + TMOF(B)	4×10^{-4}	30

Bylemans a kol. (1994) izolovali z vaječnicků masařky *Neobellieria bullata* hexapeptid *Neb-TMOF*. Tento hormon je obdobný jako *Aea-TMOF* a moduluje u masařek syntézu trávicích enzymů. Pokud je hormon injikován do hemolymfy dospělců masařek způsobuje inhibici syntézy trypsinu a snižuje koncentraci vitelogeninu v hemolymfě a tak potlačuje vývoj vajec. Komáří *Aea-TMOF* však nemá vliv na syntézu trypsinu u masařky a *Neb-TMOF* z masařek neovlivňuje syntézu trypsinu u komárů (Bylemans a kol. 1994).

Dále bylo zjištěno, že i u housenek můry *Heliothis virescens* je syntéza trypsinu kontrolována podobným hormonem jako je *Aea-TMOF*. Experimentální podání *Aea-TMOF* (v potravě nebo injekce do hemolymfy) způsobilo u housenek potlačení syntézy trypsinu a růstu (Nauen a kol. 2001).

2.5.4 Produkce TMOF rostlinami a kvasinkami a využití v biologickém boji

U škodlivých druhů hmyzu, které při trávení využívají enzymy typu trypsinu, se uvažuje o využití TMOF v programech biologického boje. Je ale zapotřebí vyvinout efektivní komerční produkt, a proto jsou testovány metody produkce TMOF. Hormon byl inkorporován do obalového proteinu (CP) viru tabákové mozaiky (TMV) a poté byla hybridní virová RNA injikována do rostlin tabáku. Takto ošetřené rostliny následně akumulovaly TMOF ve svých listech. Infikovanými tabákovými listy byly krmeny housenky *Heliothis virescens*, což u nich způsobilo inhibici trypsinové a chymotrypsinové aktivity a zpomalilo jejich růst a vývoj (Borovsky a kol. 2006).

CP-TMOF viriony měly efekt i na larvy komárů, pokud byly krmeny pivními kvasinkami s adsorbovanými viriony. U larev byla inhibována trypsinová aktivita o 90 % a zpomalil se růst, což způsobilo následnou smrt (Borovsky a kol. 2006). Výsledky z těchto experimentů jsou ve shodě s předešlou publikací Borovsky a Meola (2004), kde byla u larev *A. aegypti* a *C. quinquefasciatus* krmených kvasinkami s adsorbovaným TMOF redukována trypsinová aktivita a byl inhibován vývoj. Borovsky a kol. (1998) úspěšně exprimovali TMOF i v řasách rodu *Chlorella*, krmení rekombinantními řasami způsobilo smrt larev do 72 h.

Fiandra a kol. (2010) pak dále studovali kombinovaný efekt *Aea*-TMOF a nucleopolyhedrovirové chitinázy A (AcMNPV ChiA), která je schopna ovlivnit permeabilitu peritrofické matrix. Larvy *Heliothis virescens* byly krmeny tabákovými listy, které obsahovaly obě tyto molekuly. Díky hydrolytické aktivitě ChiA na peritrofickou matrix se zvýšila její propustnost pro TMOF a hormon tak mohl snáze pronikat do ektoperitrofického prostoru ke svým receptorům a zesílil se tak jeho efekt (Fiandra a kol. 2010).

Novější experimenty prokázaly též synergistický efekt TMOF a δ -endotoxinů *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Larvy *A. aegypti* byly krmeny kvasinkami *Pichia pastoris* exprimující *tmfA* (syntetický gen kódující *Aea*-TMOF) a současně bakteriemi *Escherichia coli* s geny pro Cry toxiny *B. thuringiensis*. TMOF způsobil hladovění larev a ty pak byly 35krát citlivější k působení Cry toxinů (Borovsky a kol. 2010). Obdobných výsledků dosáhly ve své práci i Lau a kol. (2011), kde kombinace kvasinek s adsorbovaným TMOF (*Pichia*-TMOF) a *Bacillus thuringiensis* způsobila rovněž synergistický efekt a zvýšila mortalitu larev. Užití kombinace *B. thuringiensis* a *Pichia*-TMOF by mohlo navíc předejít vzniku resistance, což je důležité v dlouhodobých kontrolních programech (Lau a kol. 2011).

Výsledky těchto studií naznačují, že by genetické inženýrství a následná produkce TMOF rostlinami nebo kvasinkami mohly být využity při rozvoji biologických insekticidů. Například virus tabákové mozaiky má široký hostitelský rozsah a exprese TMV-TMOF v rostlinách by tak mohla být využita k ochraně rostlin před škůdci (Borovsky a kol. 2006).

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1. Složení použitých roztoků

Trisový pufr

20 mM Tris (Sigma), 150 mM NaCl

dotitrovat pomocí HCl na pH 7,8 nebo 8,4

Ředící roztok na leishmanie při počítání v Bürkerově komůrce

0,85% HCl, 1% formaldehyd

AFA

38% formaldehyd (6 ml), 96% čistý etanol (49,48 ml), destilovaná H₂O (40,52 ml), kyselina octová ledová (4 ml)

PBS

146 mM NaCl

2,6 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O

3,7 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O

destilovaná H₂O

dotitrovat pomocí HCl na pH 7,6

Infiltrační roztok pro histologii v pryskyřici JB-4

JB-4 Plus Solution A (10 ml)

Benzoyl Peroxide (0,125 g)

Zalévací roztok pro histologii v pryskyřici JB-4

JB-4 Plus Solution A (5 ml)

Benzoyl Peroxide (0,0625 g)

JB-4 Plus Solution B (0,2 ml)

3.2 Chov flebotomů, pitvy střev samic a příprava vzorků střeva

K pokusům byly použity samice flebotomů z laboratorních kolonií a to druhů *Phlebotomus duboscqi* (původem z Turecka) a *Lutzomyia longipalpis* (původem z Brazílie).

Kolonie flebotomů jsou chovány při teplotě 25 – 26 °C a vlhkosti vzduchu 60 – 95%. Dospělci jsou třikrát týdně vypouštěni do nylonových sítí (asi 40x40x40 cm) zavěšených na kovových konstrukcích. Sítě jsou umístěné v igelitových pytlích s navlhčenou vatou uvnitř, aby se udržela odpovídající vlhkost. Samci i samice sají 50% roztok sacharózy (krátce

převařený v mikrovlnné troubě), kterým je napuštěn kousek vaty umístěný na Petriho misce v síti. Samice sají navíc jednou týdně krev na uspané myši. K anestezii je užívána směs ketaminu a xylazinu (10 mg ketaminu a 2 mg xylazinu na 100 g váhy zvířete). Nasáté samice jsou po defekaci (cca 5. den po sání krve) umístěny do plastových kelímků vyplněných navlhčenou sádrou, kde se během dvou až pěti následných dní vykladou. Kelímky s vajíčky, larvami a kuklami jsou situovány v plastových dózách, jejichž dno je pokryto sterilizovaným pískem navlhčeným destilovanou vodou. Larvy jsou krmeny jemně mletou směsí králíčího trusu a pelet (v poměru 1:1), která je 4 týdny fermentována při teplotě 25 °C a vysoké vlhkosti. Celkový životní cyklus flebotomů trvá v laboratorních podmínkách 5 – 8 týdnů.

K pitvě střev byly použity pouze plně nasáté samice. Střeva samic flebotomů byla pitvána pomocí minucie vsazené do dřevěné špejle pod binokulární lupou. Samice uspané na ledu byly zbaveny končetin a přeneseny pod binokulární lupu na podložní sklo do kapky trisového pufru, kde jim byla oddělena hlava a poté za poslední zadečkové články vytaženo střevo. Střevo byla přemístěna buď do trisového pufru (pH 8,4) v 1 ml mikrozkuřavkách nebo byla přenesena do nové kapky trisového pufru, přikryta krycím sklem a prohlížena pod světelným mikroskopem pro stanovení intenzity infekce.

Vzorky pro stanovení trypsinové aktivity a proteinového obsahu (vždy 10 střev / 100 μ l trisového pufru) byly zhomogenizovány ručním minimixérem a skladovány v –80 °C.

3.3 Fluorometrické měření trypsinové aktivity ve střevě flebotomů

Trypsinová aktivita vzorků střev samic byla měřena pomocí fluorometru (Tecan infinite M200) s použitím syntetického substrátu. Syntetické peptidické substráty jsou na C-konci značeny 7-amino-4-methylcoumarinem (AMC) a na N-konci blokovány proti štěpení aminopeptidázami. AMC je excitován pouze ve volné formě čili po odštěpení od peptidického řetězce. AMC byl excitován zářením o vlnové délce 355 nm, emitované záření bylo měřeno při vlnové délce 460 nm. V experimentech byl použit substrát Boc-Leu-Gly-Arg-AMC (Bachem) – fluorogenní substrát, který se používá například pro soybean trypsin-like enzym a pro komponenty C3/C5 konvertáz.

I když jsou v experimentech používány pouze plně nasáté samice, dřívější pokusy prokázaly, že se trypsinová aktivita u jednotlivých vypitvaných střev může velmi lišit. Proto byly k měření trypsinové aktivity použity vzorky obsahující homogenát deseti střev, které v předešlých experimentech vykázaly reprodukovatelné a relativně standardní výsledky (Svárovská 2006, diplomová práce). Měření probíhalo v černých 96 jamkových kultivačních

destičkách Nunclon (NUN96fb). Celkový objem v jedné jamce byl 200 μ l (100 μ l vzorku střev + 100 μ l substrátu). Substrát byl použit o koncentraci 40 μ M a koncentrace vzorku střev byla 0,005 střeva/ml. Každý vzorek byl měřen ve třech jamkách.

Naměřené hodnoty jsou uváděny v relativních fluorescenčních jednotkách za minutu (rfu/min). Jelikož se ve všech uskutečněných experimentech jedná o porovnávání aktivit, nikoliv o jejich absolutní hodnotu, nebyla provedena kalibrace na množství AMC. Jednotka rfu má proto stálou hodnotu pouze u pokusů uvedených v rámci jedné kapitoly a nelze je mezi jednotlivými kapitolami porovnávat.

3.4 Měření velikosti vajec

Většina druhů flebotomů je gonotroficky konkordantních a vejce se u nich vyvíjí teprve při trávení nasáté krve. Při pitvě střev byla ze samic vytažena zároveň i vyvíjející se vejce. Ta byla po přenesení střeva a odstranění těla samice ponechána na podložním skle a přikryta krycím sklem. Preparáty byly prohlíženy pod světelným mikroskopem (Olympus BX51) se zabudovanou kamerou (DP-70) při celkovém zvětšení 100krát (24 h po sání krve) nebo 40krát (48 a 72 h po sání krve). Vejce byla focena a jejich celková délka i délka jejich žloutku byla měřena pomocí programu QuickPHOTO MICRO 2.2 (Olympus).

3.5 Stanovení proteinové koncentrace

Koncentrace proteinů byla měřena metodou dle Bradfordové (Bradford 1976). K tomuto účelu byly použity průhledné mikrotitrační destičky Nuclon (NUN96ft). Kalibrační křivka byla sestavena podle standardů bovinního sérumalbuminu (BSA, Sigma) o známých koncentracích: ze zásobního roztoku BSA (1 mg/ml) bylo do 11 jamek mikrotitrační destičky napipetováno 0 – 10 μ l a jamky byly doplněny do 10 μ l trisovým pufrům (pH 7,8). Do jamek pro vzorky (každý vzorek byl měřen ve třech jamkách) bylo napipetováno 10 μ l vzorku o koncentraci 4 střeva/ml. Do každé jamky bylo poté přidáno 200 μ l činidla Bradfordové (BioRad) 5krát ředěného deionizovanou destilovanou vodou. Absorbance byla měřena do 20 minut po přidání činidla za pokojové teploty při vlnové délce 590 nm na přístroji Tecan infinite M200.

3.6 Experimentální infekce

3.6.1 Leishmanie a jejich kultivace

Ke všem experimentům byl použit druh *Leishmania major* kmen LV 561 (MHOM/IL/67/LRC-L137), který je v naší laboratoři používán jako standard pro infekce flebotomů.

Leishmanie jsou uchovávány v kryobance v zamrazovacích ampulích CryoTube™ Vials (NUNC) v mediu s 5 – 10 % kryoprezervační látky Dimethylsulfoxidu (Sigma-Aldrich). Před použitím byly buňky vymrazeny a přeočkovány do nového média. Leishmanie byly kultivovány v plochých kultivačních zkumavkách v tekutém mediu při teplotě 23 °C. Složení media: M199 (Aldrich, Sigma) + 10% fetální bovinní sérum (Sigma, Gibco) + antibiotikum gentamicin o koncentraci 80 µg/ml (Lek Pharmaceuticals d.d.) + 1% BME vitaminy (Sigma) + 2% sterilní moč.

3.6.2 Příprava kůžiček

Usmrcené asi třídní kuře bylo zbaveno peří a poté mu byla ze zad sterilně stažena kůže. Stažené kůžičky byly zbaveny tuku a propláchnuty 2krát po 10 minutách v etanolu a 2krát po 10 minutách ve sterilním fyziologickém roztoku. Připravené kůžičky byly skladovány v –20 °C.

3.6.3 Sání přes membránu nebo na zvířatech

Samice *P. duboscqi* (staré 5 – 7 dní) byly infikovány sáním sterilní králičí krve (Bioveta) smíchané s promastigoty leishmanií. Samice sály infekční krev přes kuřecí kůžičku napnutou na sterilní skleněné krmítko.

Čtyři až pět dní stará kultura promastigotů *L. major* (exponenciální fáze růstu) byla dvakrát promyta ve fyziologickém roztoku. Ke zjištění koncentrace buněk bylo z promyté kultury odebráno 10 µl a smícháno s 990 µl ředícího roztoku. Leishmanie byly spočítány v Bürkerově komůrce a poté byla kultura naředěna na koncentraci 1×10^7 .

Na sterilní skleněné krmítko byla natažena a pomocí parafilmového pásku upevněna kuřecí kůžička tak, aby samice flebotomů sály na její vnější straně. Krmítko bylo naplněno 3 ml tepelně inaktivované (35 min v 56 °C) králičí krve smíchané s leishmaniemi v poměru 1:9. Výsledná koncentrace leishmanií v krvi byla 1×10^6 . Na krmítko byla připevněna síťka se samicemi flebotomů. Sání probíhalo ve tmě a krmítko bylo ohříváno na 37 °C vodní lázni s vnější cirkulací. Po 2 h sání byla síťka opatrně sundána a nenasáté samice byly odstraněny

exhaustorem. Nasáté samice byly ponechány v síťce s navlhčenou vatou a cukrem v termostatu s teplotou 26 °C.

Pitvy samic byly prováděny druhý, šestý a případně devátý den po nasátí. U infikovaných samic byla intenzita infekce určována podle množství promastigotů ve střevě jako slabá (1 – 100 promastigotů), střední (100 – 1000 promastigotů) a silná (více než 1000 promastigotů).

V laboratorních podmínkách je obtížné s flebotomy uskutečnit opakované sání (samice nechtějí znovu sát nebo po druhém sání nepřežijí), proto v experimentech, kde bylo prováděno infekčního sání a poté sání na zvířeti, byla při infekci flebotomů použita ředěná krev – 5% a 10% (inaktivovaná králičí krev + fyziologický roztok). Ředěná krev neposkytla samicím dostatečné množství živin pro tvorbu vajec, a proto byly ochotné znovu sát dříve a aniž by se vykladly.

K experimentům srovnávajících efekt savčí a ptačí krve na infekci leishmaniami byla použita 6 – 21 dní stará kuřátka pocházející z Výzkumného ústavu biofarmacie a veterinárních léčiv BIOPHARM, králík Chinchilla Bastard Crl: CHB (AnLab) a myši BALB/C (AnLab). Myši byly anestetizovány kombinací ketamin-xylazin.

3.7 Kvantitativní PCR

K izolaci DNA leishmanií byly použity samice flebotomů šestý nebo devátý den po infekčním sání. Samice byly uchovávány ve 100 µl Tissue lysis buffer (Roche) v –20 °C. DNA byla izolována pomocí High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), viz protokol od výrobce. Vyizolovaná DNA byla eluována do 100 µl elučního pufru (Roche) a skladována při teplotě –20 °C.

Počet leishmanií ve flebotomech byl stanoven pomocí kvantitativní PCR založené na detekci vznikajícího dvouvláknového produktu (amplikonu) prostřednictvím metody SYBER Green (iQSYBER Green Supermix, Bio-Rad, Hercules, CA) na přístroji iQ5 real-time PCR detection system (Bio-Rad). Amplifikována byla kinetoplastová DNA s využitím primerů: „forward primer“ 5'-CTTTTCTGGTCCTCCGGGTAGG-3' a „reverse primer“ 5'-CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA-3' (Myskova a kol. 2008). Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí Mann-Whitney U testu. Kvantitativní PCR provedl a vyhodnotil doc. RNDr. Jan Votýpka, Ph.D.

3.8 Histologie v pryskyřici JB-4

Infikované samice *P. duboscqi* zbavené končetin, hlavičky, křídel a posledních článků zadečku byly fixovány den až týden ve fixáži AFA. Poté byla fixáž vymyta pomocí PBS (3krát 15 minut na třepačce) a 70% etanolu (propláchnuto 3krát) a samice byly umístěny do infiltračního roztoku. Po 90 min byl infiltrační roztok vyměněn za nový, ve kterém byly vzorky ponechány 12 – 24 h. Poté byl roztok opět vyměněn na 90 min a následně byly vzorky zality do želatinových kapslí (300 – 400 μ l) zalévacím roztokem a ponechány tuhnout (minimálně 24 h). Vzorky ve fixáži a infiltračním roztoku byly skladovány ve tmě při 4 °C, zalité vzorky v kapslích pak ve tmě při pokojové teplotě.

Histologické řezy (silné 2 – 3 μ m) připravené na mikrotomu (Ultracut E, Reichert) byly barveny hematoxylinem a 0,2% eosinem. Preparáty byly prohlíženy pod světelným mikroskopem (Olympus BX51) se zabudovanou kamerou (DP-70) a foceny v programu QuickPHOTO MICRO 2.2 (Olympus).

3.9 Schéma pokusů

3.9.1 Trávení krve u *P. duboscqi*: srovnání savčí a ptačí krve

V experimentech byly použity samice *Phlebotomus duboscqi*. Samice byly rozděleny na dvě skupiny, skupina s 200 samicemi sála na králíkovi a druhá skupina čítající 600 samic na kuřeti. Rozdílné počty samic ve skupinách byly potřebné k získání srovnatelných počtů nasátých samic (vždy menší procento nasátých na kuřeti). U nasátých samic byl pak porovnáván obsah proteinů ve střevě – 4 h po sání krve, trypsinová aktivita – 18, 24, 30, 48 a 72 h po sání krve a velikost vajec a jejich žloutku – 24, 48 a 72 h po sání krve.

3.9.2 Srovnání náchylnosti k infekci *L. major* při prvním a druhém sání *P. duboscqi*

Osm set samic *P. duboscqi* bylo nasáto na myších a po defekaci umístěno do kelímků (viz kapitola o chovu flebotomů). Po vykladení byly přeživší samice umístěny zpět do sítěky (devátý den po sání) a bylo s nimi provedeno infekční sání na membráně. Jako kontrola sloužila skupina o týden mladších samic, kterým nebyla dosud krev podána. Infekce byly hodnoceny druhý, šestý a devátý den po infekčním sání. V obou skupinách byl srovnatelný počet samic (cca 200).

3.9.3 Vývoj *L. major* v *P. duboscqi*: vliv kuřecí krve podané 9 dní před infekčním sáním

Samice *P. duboscqi* byly rozděleny na dvě skupiny, jedna byla sáta na králíkovi (300 samic) a druhá na kuřeti (800 samic). Nasáté samice byly po defekaci umístěny do kelímků se sádkou, aby se vykladly (viz kapitola o chovu flebotomů). Devátý den po sání byly samice z kelímku umístěny zpět do sítky a bylo provedeno infekční sání na membráně (viz kap. 3.6.3). Intenzita infekce byla sledována druhý a šestý den po infekčním sání.

3.9.4 Vývoj *L. major* v *P. duboscqi*: vliv kuřecí krve podané 1 den po infekčním sání

Šest set samic *P. duboscqi* bylo infikováno (10^6 promastigotů/ml v 5% krvi) a za 24 h byly samice sáty na kuřeti (cca 300 samic) nebo na myši (cca 100 samic). Intenzita infekce byla zjišťována druhý, šestý a devátý den po sání na zvířeti. Pozorování ve světelném mikroskopu bylo doplněno i o kvantitativní PCR a to z devátého dne po druhém sání. V experimentech byla k infekci flebotomů použita 5% krev (králičí krev ředěná fyziologickým roztokem) z toho důvodu, aby samice při sání krve přijaly pouze omezené množství živiny a byly ochotné znovu sát jeden den po infekčním sání.

3.9.5 Vývoj *L. major* v *P. duboscqi*: vliv kuřecí krve podané 6. den po infekčním sání

Šest set samic *P. duboscqi* bylo infikováno (10^6 promastigotů/ml v 10% krvi) a šest dní poté byly samice sáty na kuřeti (cca 350 samic) nebo na myši (cca 150 samic). Intenzita infekce byla zjišťována druhý a šestý den po sání na zvířeti. Procento infikovaných samic a intenzita infekce byly hodnoceny i pomocí kvantitativní PCR a to ze šestého dne po druhém sání. V experimentech byla k infekci flebotomů použita opět ředěná krev, aby byly samice ochotné sát znovu, aniž by se vykladly.

3.9.6 Rozdíl v procentu infikovaných samic a intenzitě infekce po sání 5% nebo 100% krve s promastigoty leishmanií

Pokusy, ve kterých byla k infekci flebotomů použita 5% krev, byly doplněny srovnáním infekčnosti samic v rané fázi infekce po sání 5% nebo 100% krve s leishmaniami, tedy v době, kdy infekční samice v předešlém experimentu (kap. 3.9.4) sály na kuřeti nebo na myši. Dvě stě samic *P. duboscqi* bylo infikováno z 5% krve (10^6 promastigotů/ml v 5% krvi) a dvě stě z neředěné krve (10^6 promastigotů/ml v 100% krvi). Procenta a intenzity infekce byly hodnoceny pozorováním ve světelném mikroskopu první a druhý den po infekčním sání.

3.9.7 Histologie „dvojité“ peritrofické matrix

Samice *P. duboscqi* byly infikovány (10^6 promastigotů/ml 5% krve) a za 24 h se nechaly sát na anestetizované myši. Pro histologii byly použity nasáté samice 24 h po druhém sání, které byly fixovány ve fixáži AFA a zality do pryskyřice JB-4. Vzorky byly nakrájeny na mikrotomu, obarveny, zality médiem Plastic UV Mount (Polysciences) a pozorovány pod světelným mikroskopem, kde byl hledán řez dvěma peritrofickými matrix – z prvního a z druhého sání.

3.9.8 Rozdíl při trávení 10% a 100% krve

Experimenty, ve kterých byla při infekci flebotomů použita 10% krev (kap. 3.9.5), byly doplněny porovnáním trypsinové aktivity po sání 10% krve nebo 100% (neředěné) krve. Dvě skupiny samic sání na krmítkách s 10% a 100% králičí krví byly pitvány ve čtyřech časových úsecích (24h, 30h, 48h a 72h) a byla u nich měřena trypsinová aktivita. U obou skupin byl také sledován konec defekace – 30 nasátých samic z každé skupiny bylo umístěno individuálně do skleniček (viz Volf a Volfová 2011) a dvakrát denně bylo zjišťováno, zda již proběhla defekace.

3.9.9 Efekt TMOF na trypsinovou aktivitu a vývoj vajec u *Lu. longipalpis*

K pokusům byly použity samice *Lutzomyia longipalpis*, které byly rozděleny na dvě skupiny po 150 samicích. Jedna skupina byla sána na krmítku s 1 ml čisté inaktivované králičí krve (skupina dále značena jako kontrola) a druhá na krmítku, kde bylo do 1 ml krve přidáno 28 mg TMOF (skupina dále značena jako TMOF). U nasátých samic byl zjišťován efekt TMOF na trypsinovou aktivitu – 18, 24, 30 a 48 h po sání krve, a také na vývoj vajec – 24, 48 a 72 h po sání krve.

3.10 Statistické vyhodnocení

Každý experiment byl opakován nejméně dvakrát a výsledky byly statisticky vyhodnoceny testy ANOVA, χ^2 nebo Mann-Whitney U-test v programech STATISTIKA nebo S-PLUS. Hladina pravděpodobnosti byla zvolena 95% ($p = 0,05$).

4 VÝSLEDKY

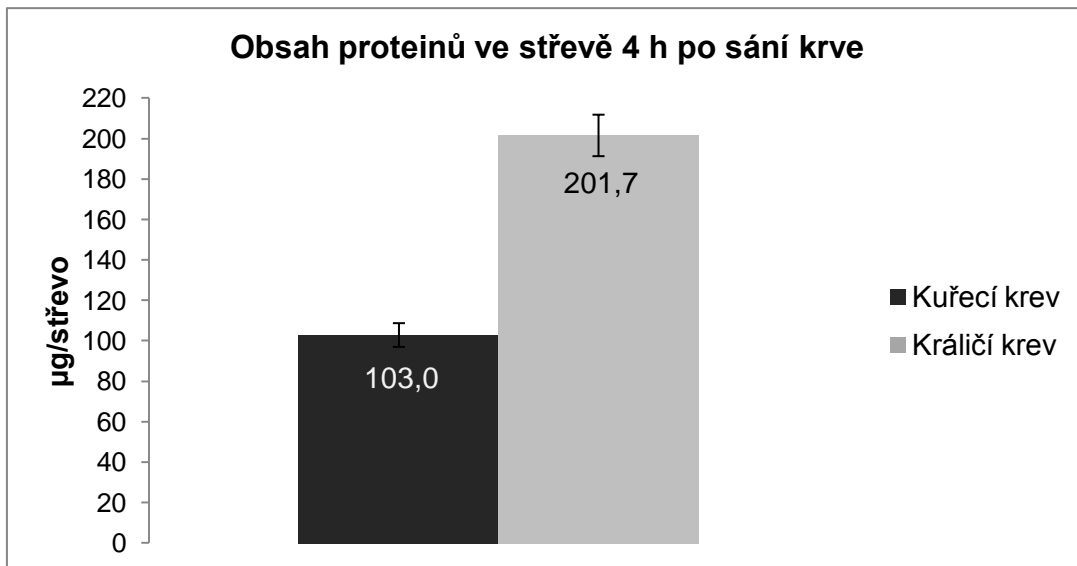
Výsledky předkládané práce obsahují dva tematické okruhy. První část je věnována porovnání trávení krve u *Phlebotomus duboscqi* po sání na kuřeti a na králíkovi (kapitola 4.1) a experimentálním infekcím zaměřených na vliv trávení kuřecí krve na průběh infekce *Leishmania major* (kapitoly 4.2 – 4.8). Druhá část se zabývá vlivem komářího hormonu TMOF na trypsinovou aktivitu a vývoj vajec u *Lutzomyia longipalpis* (kapitola 4.9).

4.1 Trávení krve u *P. duboscqi*: srovnání savčí a ptačí krve

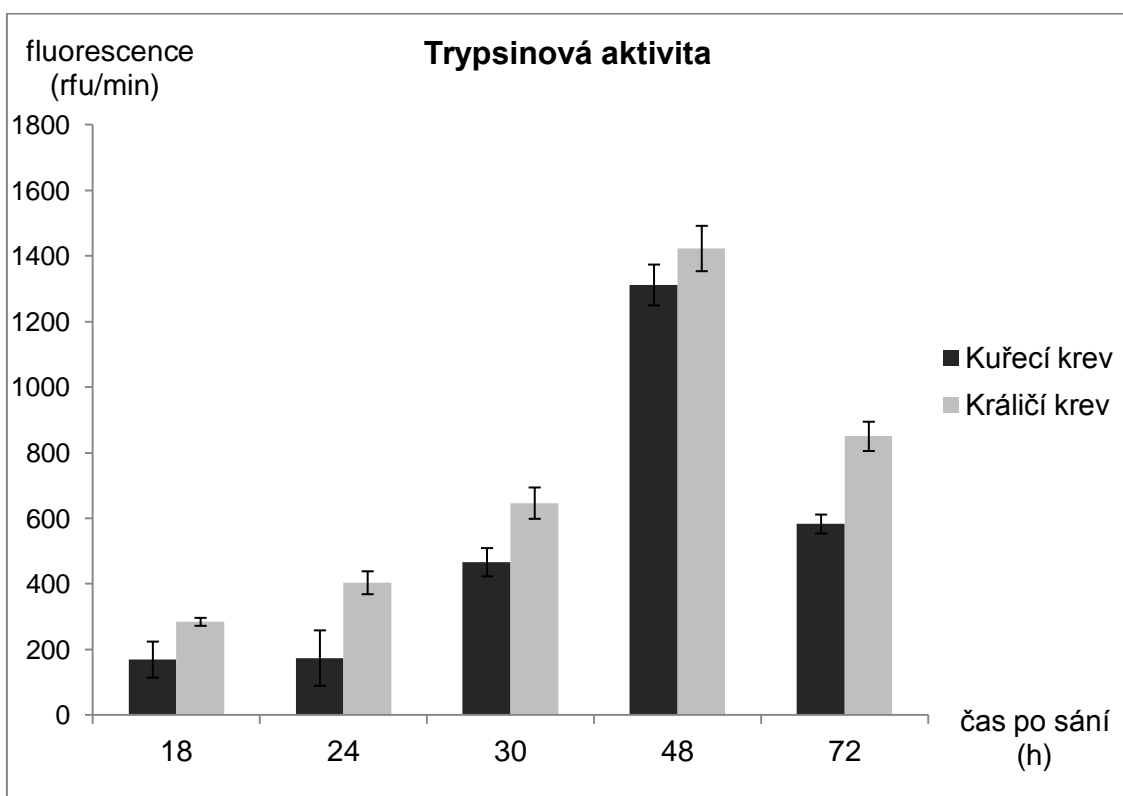
Dvě skupiny samic *P. duboscqi* sály na králíkovi a na kuřeti. Čtyři hodiny po sání jsme u obou skupin změřili proteinový obsah v homogenátu deseti vypitvaných střev a přepočítali jej na obsah proteinů v jednom střevu. Po sání králičí krve bylo ve střevě naměřeno téměř dvakrát tolik proteinů než po sání kuřecí krve. Výsledky dvou pokusů jsou shrnuty a znázorněny na obrázku 4-1.

V pěti časových intervalech po sání jsme měřili trypsinovou aktivitu. Výsledky dvou pokusů s obdobnými výsledky jsou shrnuty a znázorněny na obrázku 4-2. Ke statistickému vyhodnocení výsledků byl použit Mann-Whitney U-test. Rozdíl mezi skupinami je statisticky průkazný 18, 24, 30 a 72h po sání, pouze po 48h se výsledky pohybují blízko hladiny signifikance ($p(18) = 0,004$; $p(24) = 0,004$; $p(30) = 0,004$; $p(48) = 0,06$; $p(72) = 0,004$). Rozdíl v trypsinové aktivitě je patrný nejvíce v průběhu prvních 24 h po sání, kdy je po sání na kuřeti trypsinová aktivita nižší o 40 – 55% než po sání na králíkovi.

Nakonec jsme ve třech časových úsecích měřili délku vajec a délku jejich žloutku. Ve všech časových intervalech existuje mezi skupinami sátých kuřecí nebo králičí krev signifikantní rozdíl jak ve velikosti vajec, tak ve velikosti jejich žloutku (ANOVA: délka vajec – $F(1, 526) = 94,3$; $p < 0,0001$; délka žloutku – $F(1, 526) = 61,2$; $p < 0,0001$). Výsledky ze dvou pokusů jsou shrnuty v tabulce 4-1 a znázorněny na obrázcích 4-3 a 4-4. Po sání kuřecí krve se u samic vejce vyvíjela o něco pomaleji a byla v průměru o 10 % kratší než po sání králičí krve. Tyto výsledky částečně korelují s nižším obsahem proteinů ve střevě a nižší trypsinovou aktivitou.



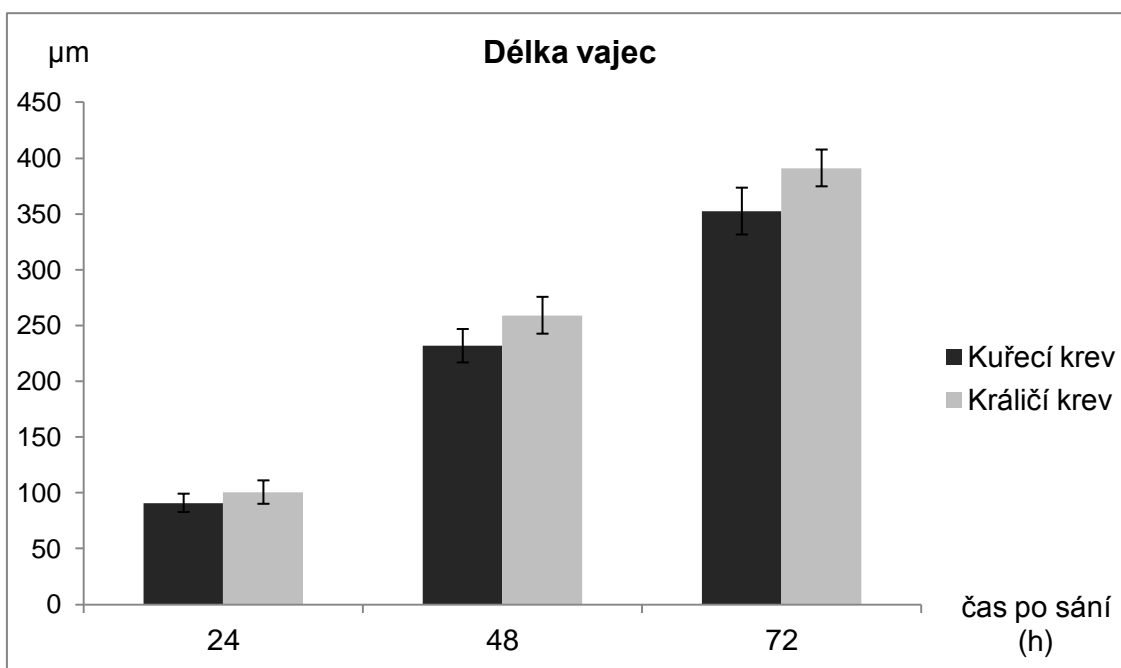
Obr. 4-1: Srovnání obsahu proteinů ve střevě *P. duboscqi* 4h po sání kuřecí a králičí krve.



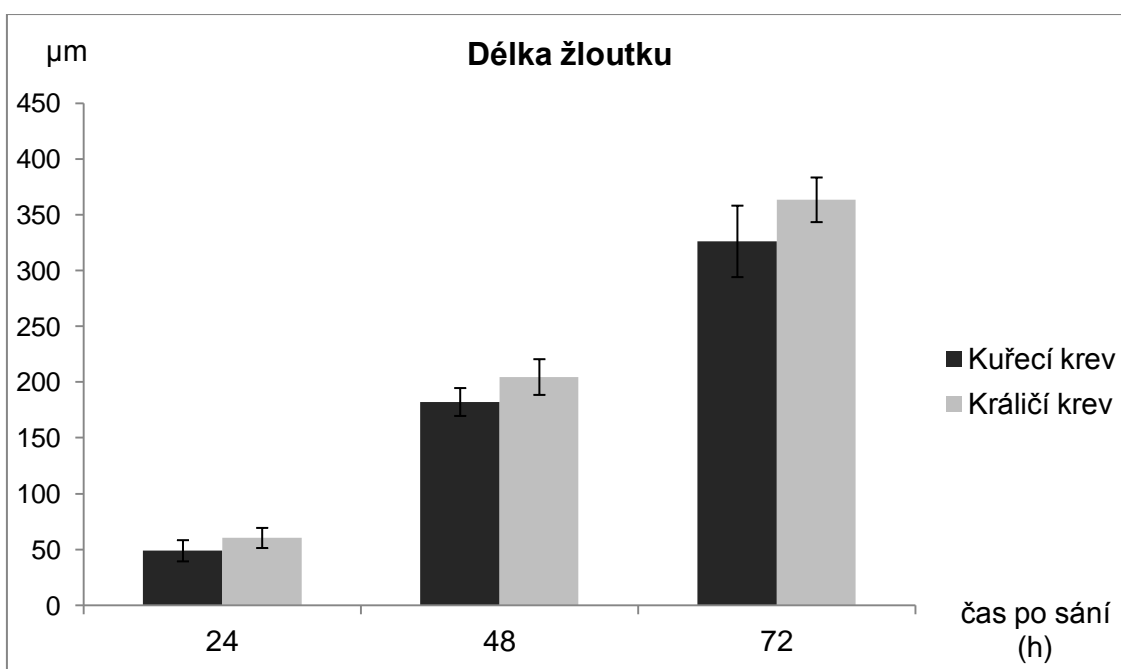
Obr. 4-2: Srovnání trypsinové aktivity ve střevě *P. duboscqi* po sání kuřecí a králičí krve, aktivita v homogenátu střev 18, 24, 30, 48 a 72 h po sání krve.

Tab. 4-1: Srovnání velikosti vajec a žloutku *P. duboscqi* po sání kuřecí a králičí krve.

Čas (h)	Počet změřených vajec	Průměrná délka vejce		Průměrná délka žloutku	
		Kuřecí krev	Králičí krev	Kuřecí krev	Králičí krev
24	70	91 μm	101 μm	49 μm	61 μm
48	100	232 μm	259 μm	182 μm	205 μm
72	100	354 μm	391 μm	326 μm	363 μm



Obr. 4-3: Srovnání velikosti vajec *P. duboscqi* po sání kuřecí a králičí krve.



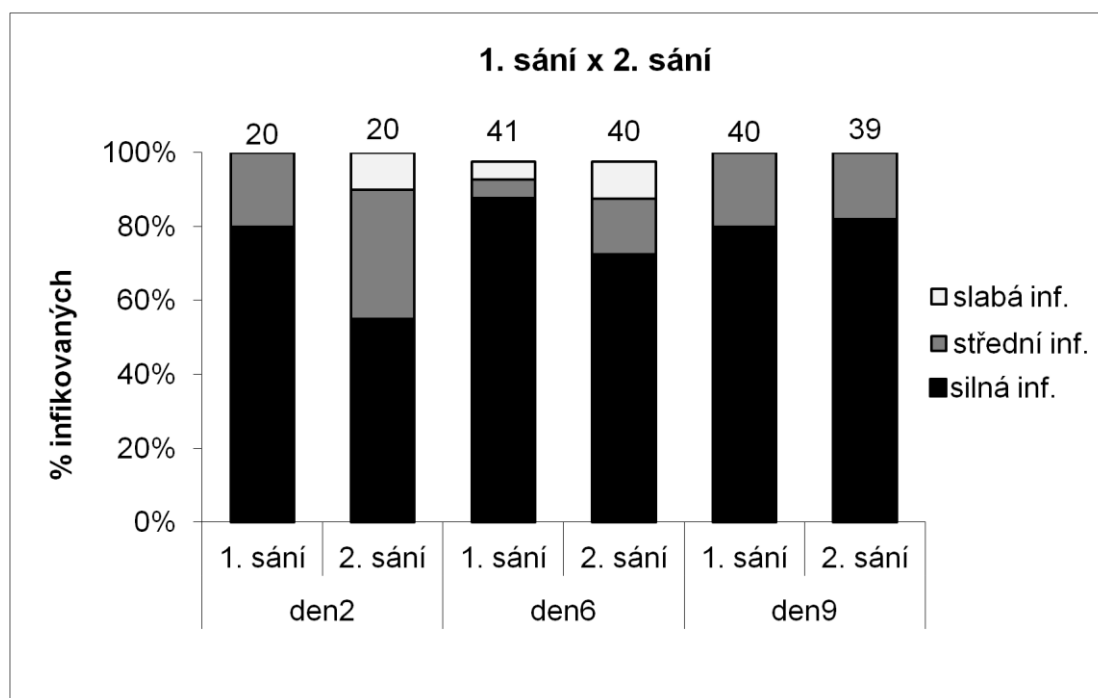
Obr. 4-4: Srovnání velikosti žloutku *P. duboscqi* po sání kuřecí a králičí krve.

4.2 Srovnání náchylnosti k infekci *L. major* při prvním a druhém sání *P. duboscqi*

Porovnávali jsme procento infikovaných samic a intenzitu infekce u samic, kterým byla podána infekční krev při jejich prvním sání, a u samic infikovaných až při druhém sání. Výsledky dvou pokusů jsou shrnuty v tabulce 4-2 a znázorněny na obrázku 4-5. Mezi infekcemi při prvním a při druhém sání nebyly zjištěny signifikantní rozdíly ani v intenzitě infekce (den 2 $\chi^2 = 3,744$, $p = 0,1538$; den 6 $\chi^2 = 3,409$, $p = 0,3328$; den 9 $\chi^2 = 0,054$, $p = 0,8162$) ani v procentu infikovaných samic ($\chi^2 = 0,0002$, $p = 0,9887$). U obou skupin a všech sledovaných dnů bylo nakaženo téměř 100 % samic, ve většině případů (zhruba 80 % v den 6 a 9) se jednalo o silné nákazy. Téměř u všech samic leishmanie kolonizovaly stomodeální valvu již od šestého dne po infekčním sání.

Tab. 4-2: Srovnání náchylnosti *P. duboscqi* k infekci *L. major* při 1. a 2. sání.

	den2		den6		den9	
	1. sání	2. sání	1. sání	2. sání	1. sání	2. sání
silná infekce	16	11	36	29	32	32
střední infekce	4	7	2	6	8	7
slabá infekce	0	2	2	4	0	0
neinfikované	0	0	1	1	0	0
celkem	20	20	41	40	40	39



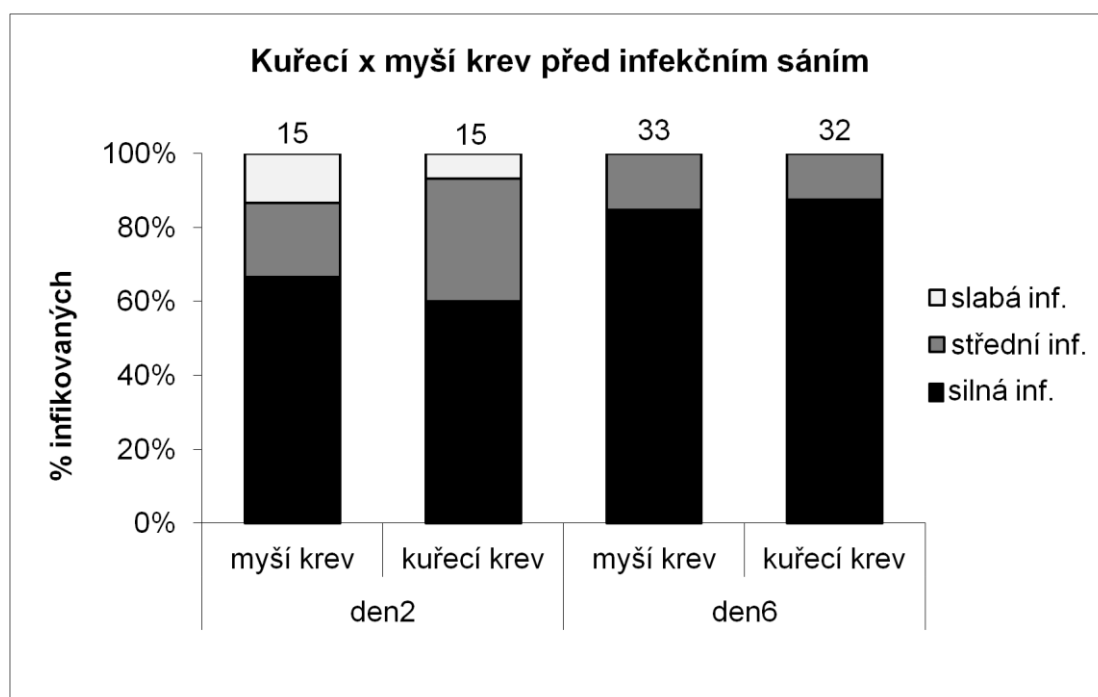
Obr. 4-5: Srovnání náchylnosti *P. duboscqi* k infekci *L. major* při 1. a 2. sání. Čísla nad sloupci značí počet vypitvaných samic.

4.3 Vývoj *L. major* v *P. duboscqi*: vliv kuřecí krve podané 9 dní před infekčním sáním

Samice sály na kuřeti nebo na myši a devátý den po sání byly nasáty přes membránu na krvi s leishmaniami. Výsledky tří pokusů jsou shrnuty v tabulce 4-3 a znázorněny na obrázku 4-6. Mezi skupinami samic sátých na myši a na kuřeti nebyly pozorovány signifikantní rozdíly ani v intenzitě infekce (den 2 $\chi^2 = 0,886$, $p = 0,6421$; den 6 $\chi^2 = 0,096$, $p = 0,7570$) ani v procentu infikovaných samic (stejně u obou skupin). U obou skupin bylo nakaženo 100 % samic a ve většině případů (přes 80% v den 6) se jednalo o silné infekce. Šestý den po infekčním sání leishmanie kolonizovaly stomodeální valvu téměř u všech samic.

Tab. 4-3: Vliv kuřecí krve podané 9 dní před infekčním sáním na vývoj *L. major*.

	den2		den6	
	myší krev	kuřecí krev	myší krev	kuřecí krev
silná infekce	10	9	28	28
střední infekce	3	5	5	4
slabá infekce	2	1	0	0
neinfikované	0	0	0	0
celkem	15	15	33	32



Obr. 4-6: Vliv kuřecí krve podané 9 dní před infekčním sáním na vývoj *L. major*. Čísla nad sloupci značí počet vypitvaných samic.

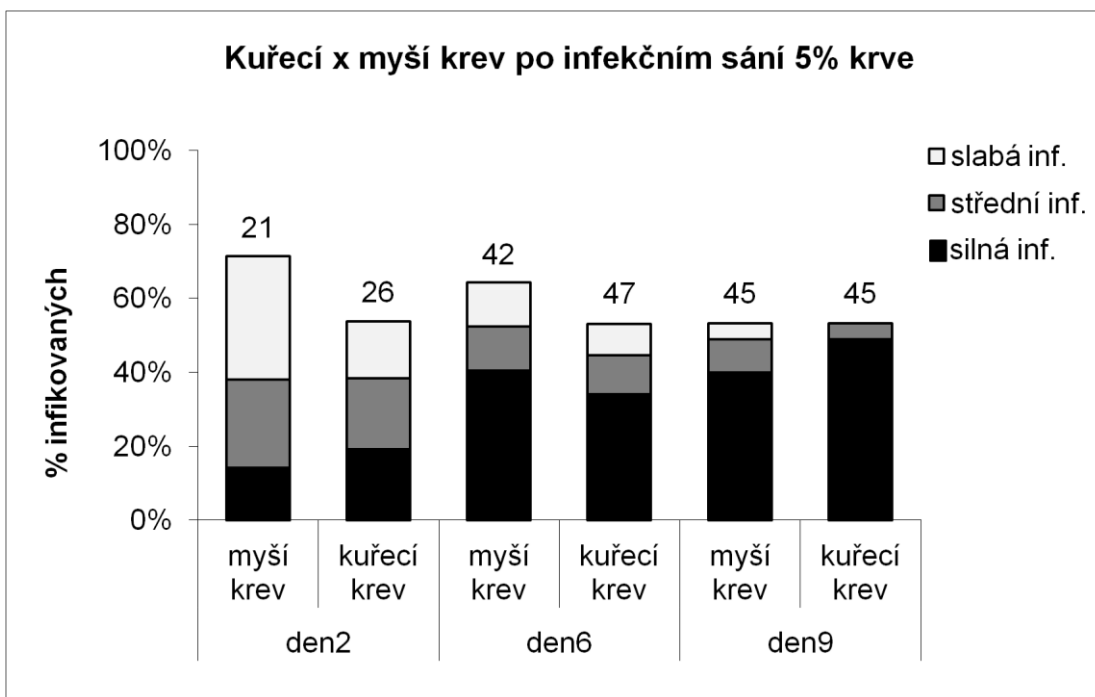
4.4 Vývoj *L. major* v *P. duboscqi*: vliv kuřecí krve podané 1 den po infekčním sání

Samicím jsme podali 5% krev s leishmaniemi a 24 h poté jsme je nechali sát na kuřeti nebo na myši. Výsledky tří pokusů jsou shrnuty v tabulce 4-4 a znázorněny na obrázku 4-7. Mezi skupinami samic sátých na myši nebo na kuřeti nebyly pozorovány signifikantní rozdíly ani v intenzitě infekce (den 2 $\chi^2 = 2,818$, $p = 0,4205$; den 6 $\chi^2 = 1,189$, $p = 0,7557$; den 9 $\chi^2 = 3,067$, $p = 0,3815$) ani v procentu infikovaných samic ($\chi^2 = 1,372$, $p = 0,2414$). Procento infikovaných samic bylo u obou skupin velmi podobné, mezi 50 a 70 %; devátý den po sání bylo dokonce shodné – 50 %. U většiny případů se devátý den jednalo o silné infekce, kdy leishmanie kolonizovaly stomodeální valvu.

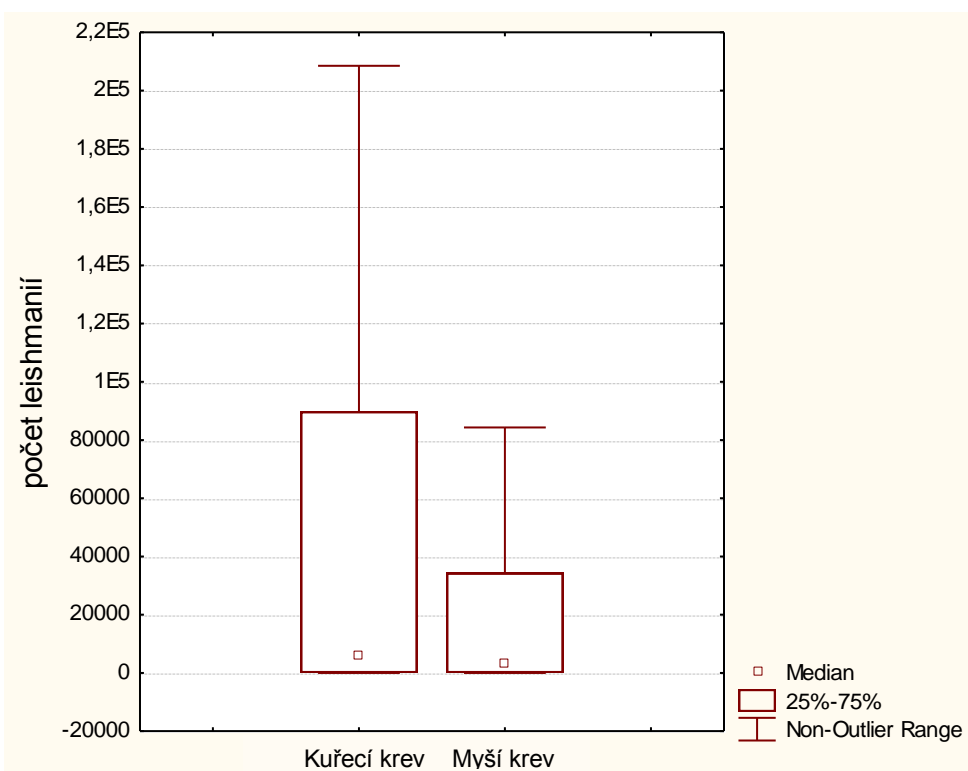
Z 50 samic sátých na kuřeti a ze 40 sátých na myši jsme devátý den po infekčním sání izolovali DNA a hodnotili jsme infekce i pomocí kvantitativní PCR. Výsledky dvou pokusů z kvantitativní PCR jsou shrnuty a znázorněny na obrázcích 4-8 a 4-9. Mezi skupinami samic sátých na kuřeti a na myši není signifikantní rozdíl (M-W U-test: $p = 0,3099$); u obou skupin bylo 60 % nakažených samic. Signifikantní rozdíl byl nalezen pouze v intenzitě infekce a to v případě, pokud jsme hodnotili intenzitu infekce pouze u pozitivních samic – ty infikované z kuřecí krve měly více leishmanií ve střevě (M-W U-test: $p = 0,0352$).

Tab. 4-4: Vliv kuřecí krve podané 1 den po infekčním sání na vývoj *L. major*.

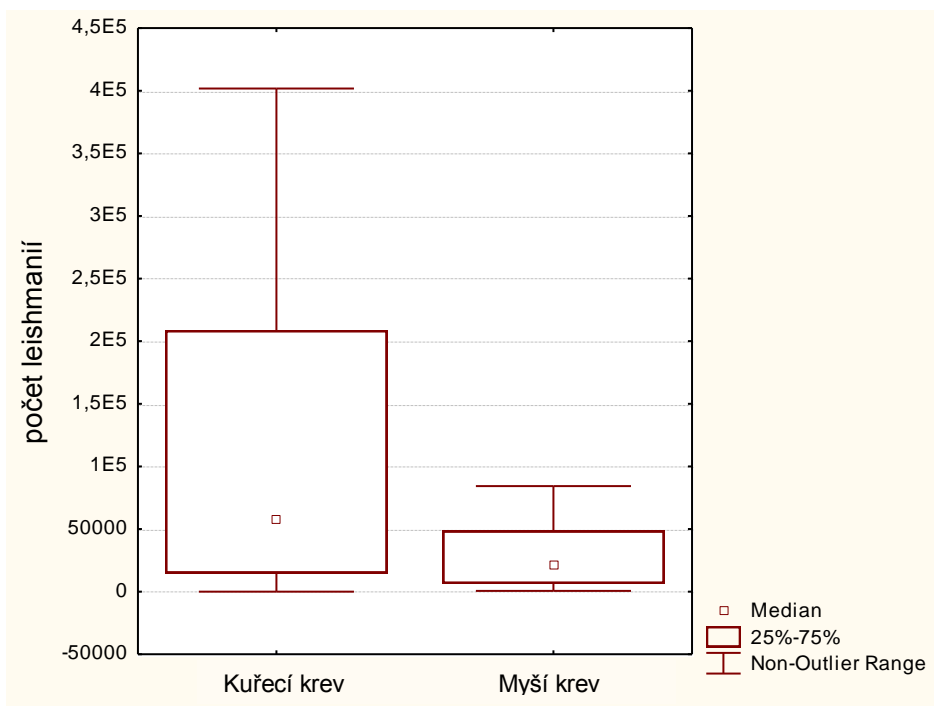
	den2		den6		den9	
	myší krev	kuřecí krev	myší krev	kuřecí krev	myší krev	kuřecí krev
silná infekce	3	5	17	16	18	22
střední infekce	5	5	5	5	4	2
slabá infekce	7	4	5	4	2	0
neinfikované	6	12	15	22	21	21
celkem	21	26	42	47	45	45



Obr. 4-7: Vliv kuřecí krve podané 1 den po infekčním sání na vývoj *L. major*. Čísla nad sloupci značí počet vypitvaných samic.



Obr. 4-8: Kvantitativní PCR – vliv kuřecí krve podané 1 den po infekčním sání na vývoj *L. major*, všechny samice.



Obr. 4-9: Kvantitativní PCR – vliv kuřecí krve podané 1 den po infekčním sání na vývoj *L. major*, pouze pozitivní samice.

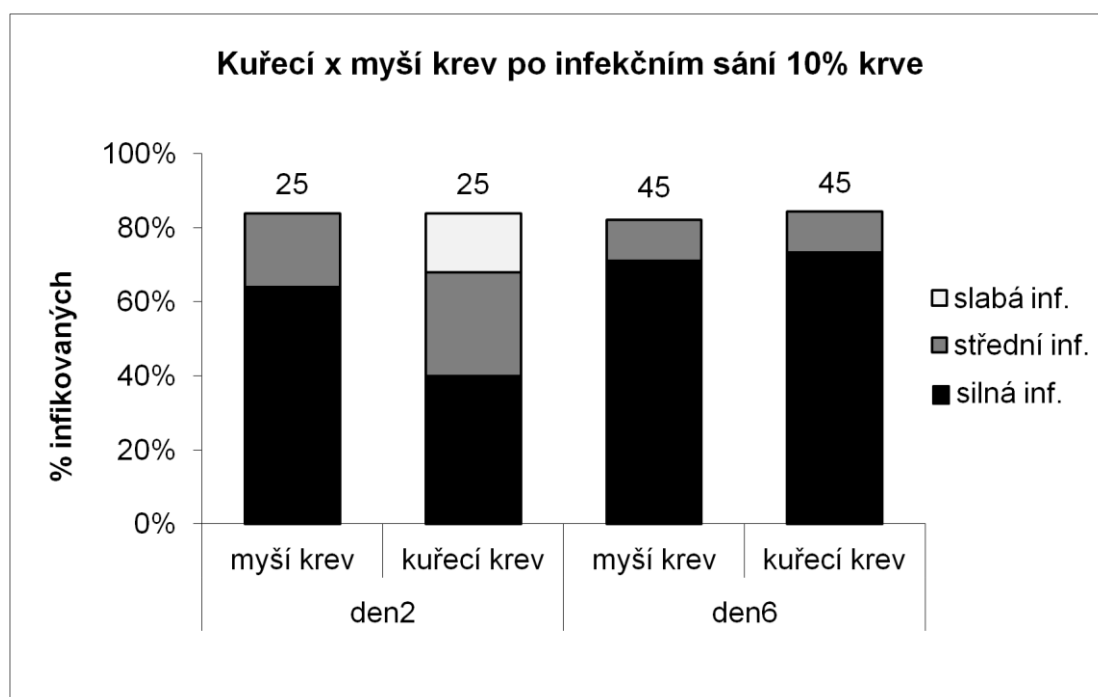
4.5 Vývoj *L. major* v *P. duboscqi*: vliv kuřecí krve podané 6. den po infekčním sání

Samicím jsme podali 10% krev s leishmaniami a šest dní poté jsme je nechali sát na kuřeti nebo na myši. Výsledky dvou pokusů jsou shrnuty v tabulce 4-5 a znázorněny na obrázku 4-10. Mezi skupinami samic sátých na myši a na kuřeti nebyly zjištěny signifikantní rozdíly ani v intenzitě infekce (den 2 $\chi^2 = 5,718$, $p = 0,1262$; den 6 $\chi^2 = 0,0821$, $p = 0,9598$) ani v procentu infikovaných samic ($\chi^2 = 0,052$, $p = 0,8196$). Druhý i šestý den po sání infikovaných flebotomů na zvířeti bylo u obou skupin infikováno shodně mezi 80 – 85 % samic. Ve většině případů se šestý den jednalo o silné infekce, kdy leishmanie kolonizovaly stomodeální valvu.

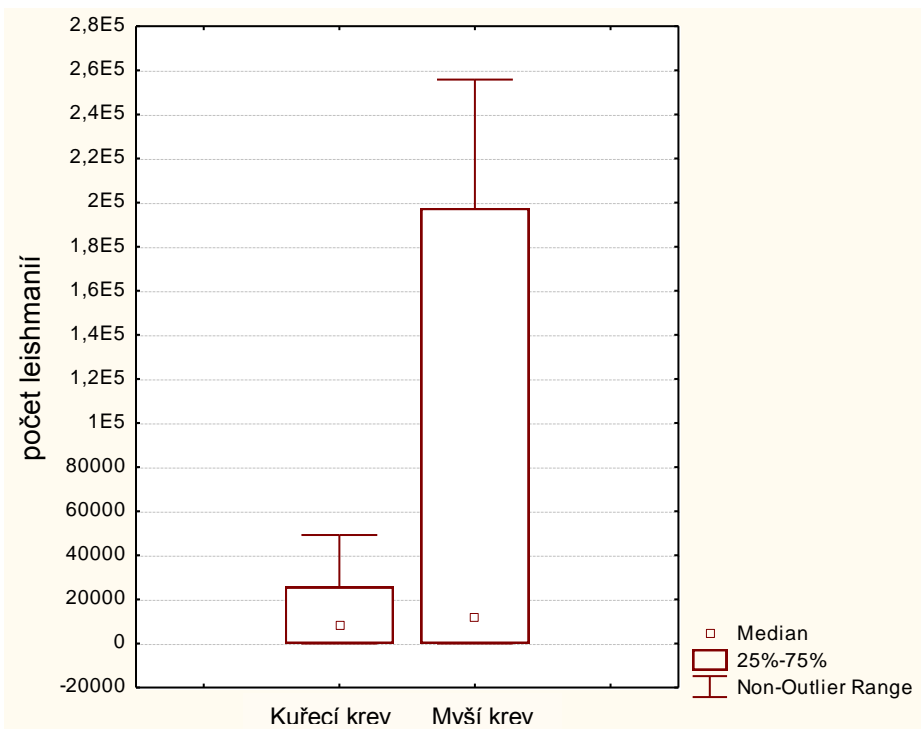
Z 50 samic sátých na kuřeti a z 50 sátých na myši jsme šestý den po infekčním sání izolovali DNA a hodnotili jsme infekce i pomocí kvantitativní PCR. Výsledky dvou pokusů z kvantitativní PCR jsou shrnuty a znázorněny na obrázcích 4-11 a 4-12. Mezi skupinami samic sátých na kuřeti a na myši není signifikantní rozdíl (M-W U-test: $p = 0,2741$); u obou skupin bylo 70 % nakažených samic. Signifikantní rozdíl není ani v případě, pokud hodnotíme intenzitu infekce pouze u pozitivních samic (M-W U-test $p = 0,0660$).

Tab. 4-5: Vliv kuřecí krve podané 6. den po infekčním sání na vývoj *L. major*.

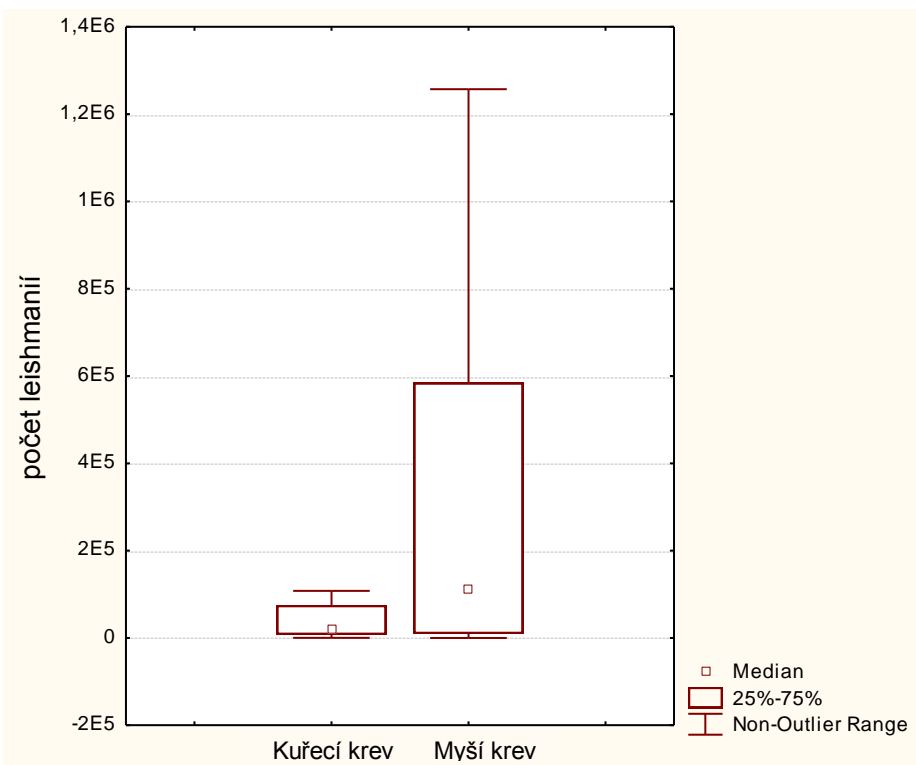
	den2		den6	
	myší krev	kuřecí krev	myší krev	kuřecí krev
silná infekce	16	10	32	33
střední infekce	5	7	5	5
slabá infekce	0	4	0	0
neinfikované	4	4	8	7
celkem	25	25	45	45



Obr. 4-10: Vliv kuřecí krve podané 6. den po infekčním sání na vývoj *L. major*. Čísla nad sloupci značí počet vypitvaných samic.



Obr. 4-11: Kvantitativní PCR – vliv kuřecí krve podané 6. den po infekčním sání na vývoj *L. major*, všechny samice.



Obr. 4-12: Kvantitativní PCR – vliv kuřecí krve podané 6. den po infekčním sání na vývoj *L. major*, pouze pozitivní samice.

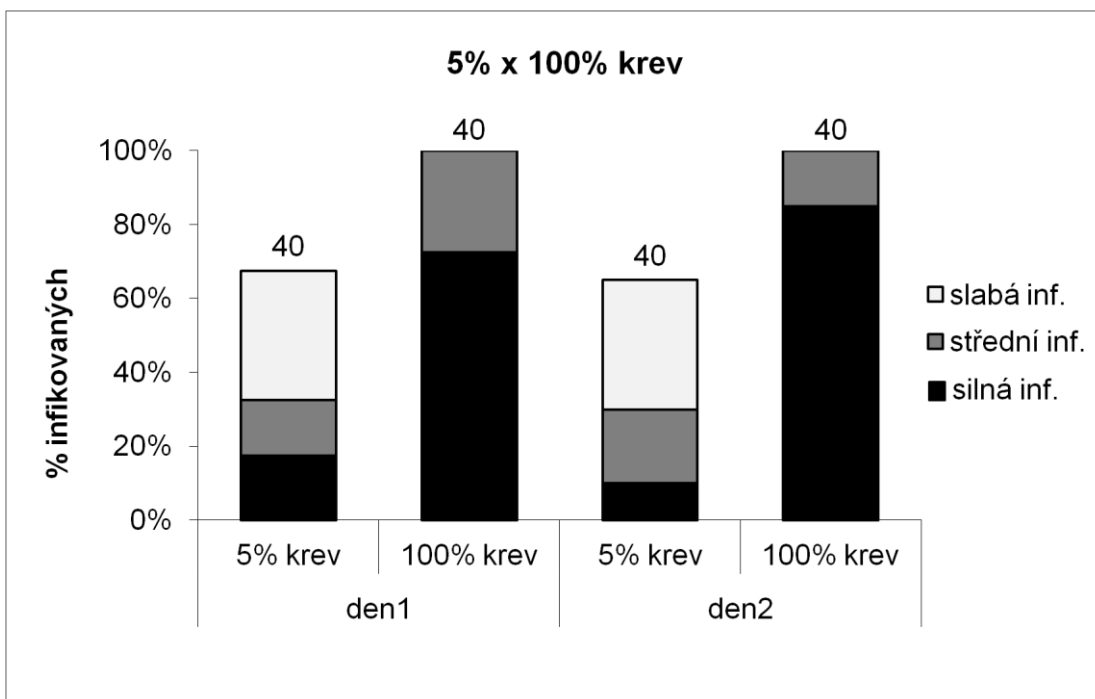
4.6 Rozdíl v procentu infikovaných samic a intenzitě infekce po sání 5% nebo 100% krve s promastigoty leishmanií

U jedinců infikovaných sáním 5% krve s promastigoty leishmanií bylo po druhém sání krve nižší procento infikovaných samic i nižší intenzity infekce než po druhém sání u samic infikovaných standardně z neředěné krve. Proto jsme se rozhodli zjistit procenta a intenzity infekcí v rané fázi infekce (1. a 2. den po sání), tedy v době, kdy byly v předešlých experimentech samice sáty na zvířeti (viz kap. 4.4). Výsledky ze dvou pokusů jsou shrnuty v tabulce 4-6 a znázorněny na obrázku 4-13. Mezi skupinami samic infikovaných z 5% nebo 100% krve byl pozorován signifikantní rozdíl jak v intenzitě infekce (den 1 $\chi^2 = 41,9150$, $p < 0,001$; den 2 $\chi^2 = 51,9699$, $p < 0,001$), tak v procentu infikovaných samic ($\chi^2 = 32,4801$, $p < 0,001$). Leishmaniová infekce se tak uchytila pouze u 65 % samic a většina infekcí byla slabé případně střední intenzity, zatímco u kontrolní skupiny infikované z neředěné (100%) krve byly 1. i 2. den po sání všechny samice infekční a nákazy byly převážně silné. Mezi samicemi infikovanými z 5% krve se 1. i 2. den vyskytovala variabilita, některé samice přijatou potravu vůbec nezahustily a vše vyloučily během prvního dne, u těchto samic se infekce neuchytila. Jiné samice si v sobě část krve udržely, ale nevytvořila se pevná peritrofická matrix a krev s leishmaniemi se vyskytovala ve větší části střeva, v takových případech se jednalo o nízké intenzity nákazy. Zhruba u 40 % samic se krev zahustila, vytvořila se peritrofická matrix a krev s leishmaniemi se tak vyskytovala v podobě „hrudky“ v zadní části mesenteronu, infekce u těchto samic byly střední a silné.

V experimentech, kde byly samice flebotomů infikovány podáním 5% krve s promastigoty a za 24 h byly sány na kuřeti nebo na myši (viz kap. 4.4), byla tedy část infekcí potlačena ještě před sáním na zvířeti.

Tab. 4-6: Rozdíl v procentu infikovaných samic a intenzitě infekce po sání 5% nebo 100% krve s promastigoty leishmanií.

	den1		den2	
	5% krev	100% krev	5% krev	100% krev
silná infekce	7	29	4	34
střední infekce	6	11	8	6
slabá infekce	14	0	14	0
žádná infekce	13	0	14	0
celkem	40	40	40	40

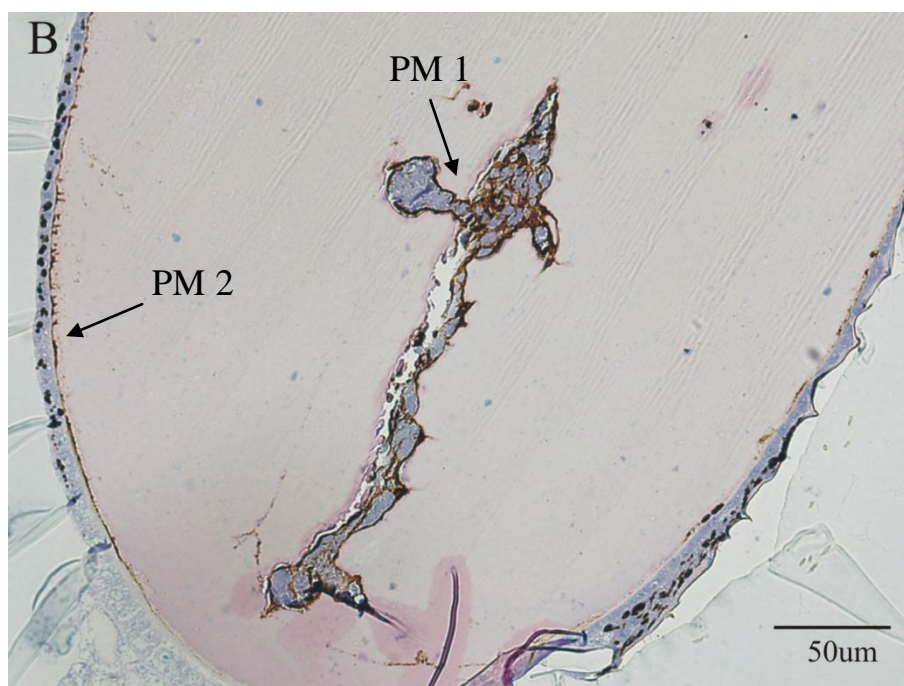
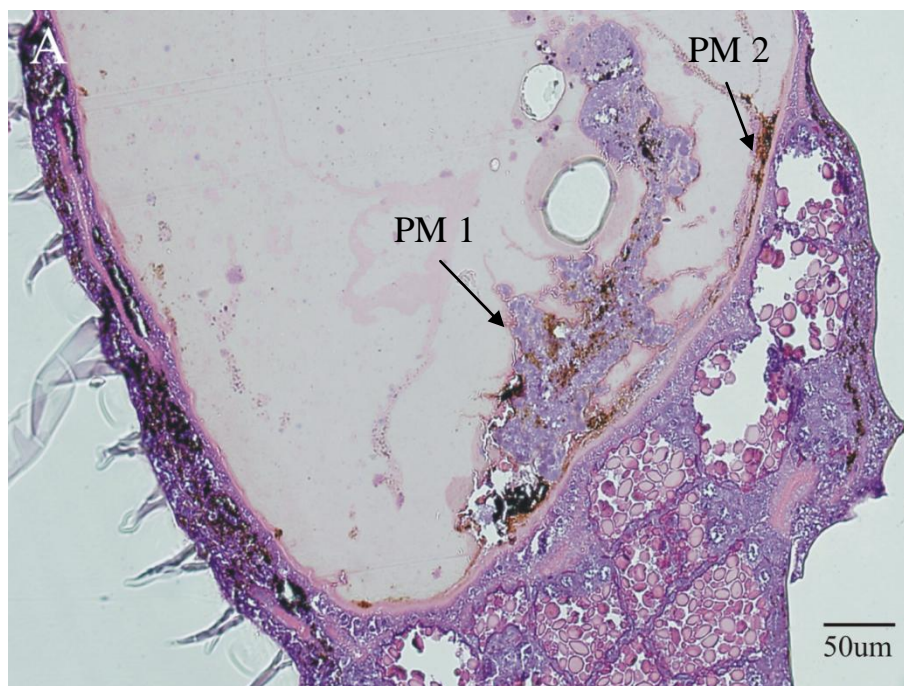


Obr. 4-13: Rozdíl v procentu infikovaných samic a intenzitě infekce po sání 5% nebo 100% krve s promastigoty leishmanií. Čísla nad sloupci značí počet vypytných samic.

4.7 Histologie peritrofické matrix

Samice *P. duboscqi* byly histologicky zpracovány 24 h po druhém sání, tedy 48 h po infekčním sání. Histologické řezy zobrazené na obrázku 4-14 ukazují průřez dvěma peritrofickými matrix – z prvního infekčního sání a z druhého sání na myši. Fotografie zobrazují příklady nalezeného umístění peritrofické matrix (PM). Zatímco u samice A se vnitřní PM nacházela v zadní části mesenteronu v blízkosti stěny vnější PM (obr. 4-14 A), u samice B se vnitřní matrix vyskytovala spíše uprostřed střeva a byla užšího protáhlého tvaru (obr. 4-14 B). Leishmanie se pravděpodobně nacházely uvnitř vnitřní PM, ale na fotografiích nelze jednotlivé buňky odlišit a identifikovat.

V experimentu, kde byly samice flebotomů infikovány sáním 5% krve s promastigoty a za 24 h sály na kuřeti nebo na myši, byl pozorován malý pokles procenta infikovaných samic též mezi druhým a šestým dnem po druhém sání (viz kap. 4.4). Tento pokles byl pravděpodobně způsoben tím, že u některých samic nebyly leishmanie včas uvolněny ze dvou peritrofických matrix a byly tak vydefekovány.



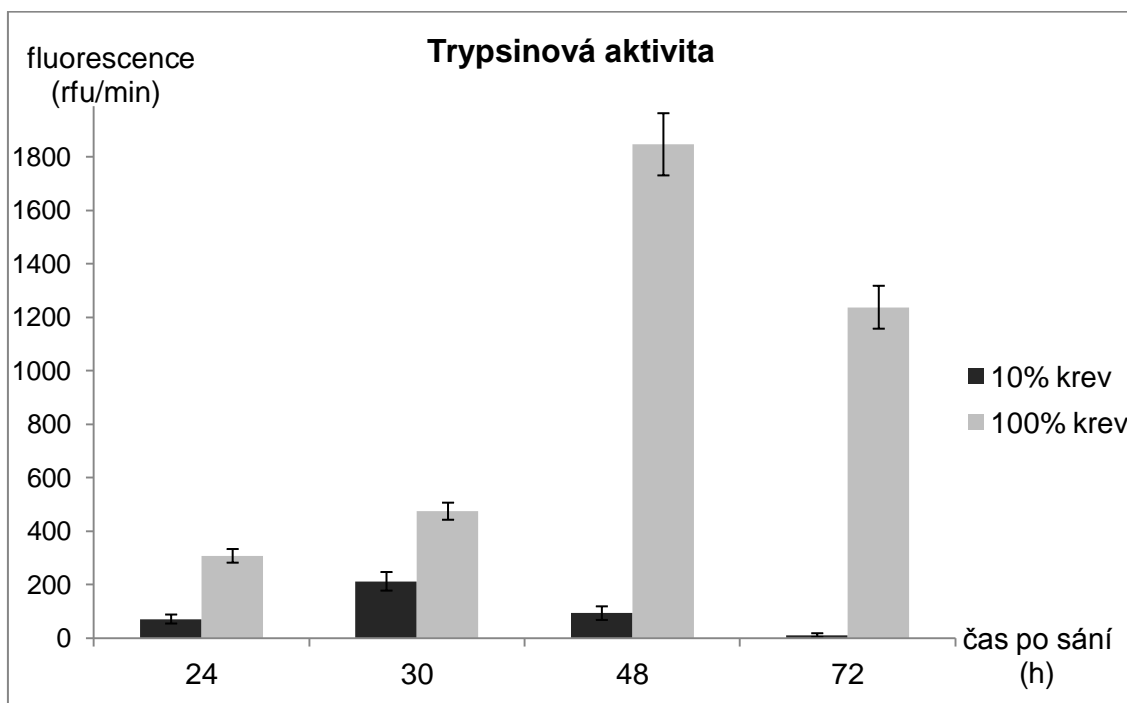
Obr. 4-14: Histologie trávicího traktu *P. duboscqi*, průřez dvěma peritrofickými matrix. **A:** vnitřní peritrofická matrix se nachází v zadní části mesenteronu v blízkosti stěny střeva a vnější peritrofické matrix (zvětšení 100x), **B:** vnitřní peritrofická matrix se nachází více ve středu mesenteronu a ve větší vzdálenosti od vnější peritrofické matrix (zvětšení 200x). PM1 – vnitřní peritrofická matrix vytvořená po prvním infekčním sání, PM2 – vnější peritrofická matrix vytvořená po druhém sání na zvířeti.

4.8 Rozdíl při trávení 10% a 100% krve

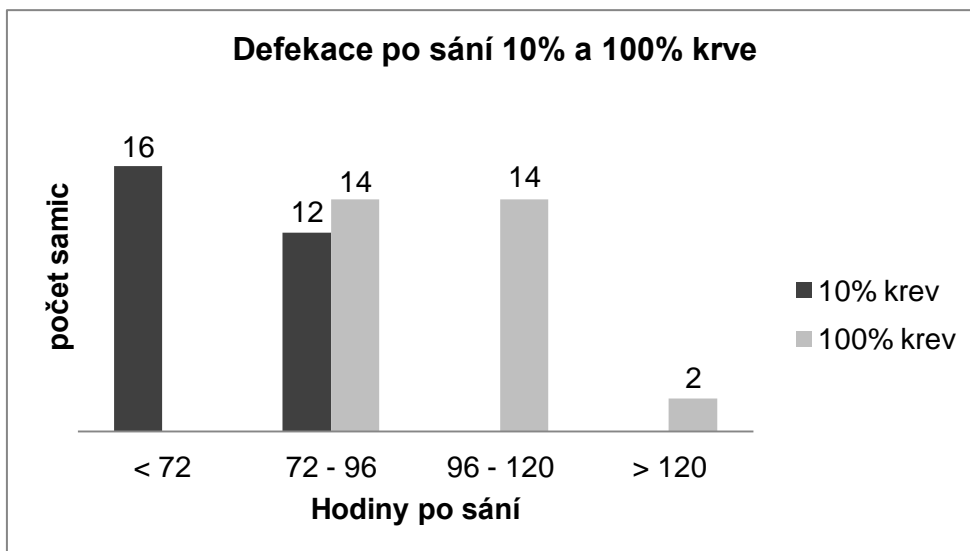
Samice infikované podáním 10% krve s promastigoty měly nižší procento nákaz než při standardních infekcích s neředěnou krví. Proto jsme se rozhodli otestovat rozdíl ve trávení 10% a 100% krve. Výsledky ze dvou pokusů jsou znázorněny na obrázku 4-15. Trypsinová aktivita po sání 10% krve je výrazně nižší a je ukončena dříve – nejvyšších hodnot dosahuje 30 h po sání a po 72 h je téměř nulová. Naproti tomu u samic sátých na 100% krvi dosahuje maxima po 48 h a i po 72 h je ještě poměrně vysoká. Maximum aktivity po sání 100% krve je téměř desetkrát vyšší, než po sání 10% krve.

U obou skupin jsme sledovali i den defekace. Výsledky znázorněné na obrázku 4-16 ukazují, že po sání 10% krve proběhne u většiny samic defekace o jeden i dva dny dříve než po sání neředěné krve. Zatímco samice sáté na 100% krvi defekují v nadpoloviční většině případů až 4. – 5. den, většina samic sátých na 10% krvi defekuje 3. den.

V experimentech, kde byly samice flebotomů infikovány podáním 10% krve s promastigoty a šestý den byly sány na kuřeti nebo na myši (viz kap. 4.5), nestihly leishmanie u některých samic včas uniknout z peritrofoické matrix a uchytit se ve střevě a proto byly vydefekovány. Část infekcí tak byla potlačena ještě před sáním na zvířeti.



Obr. 4-15: Porovnání trypsinové aktivity po sání 10% a 100% králičí krve, aktivita v homogenátu střev 24, 30, 48 a 72 h po sání krve.



Obr. 4-16: Doba defekace po sání 10% a 100% králíčí krve.

4.9 Efekt TMOF na trypsinovou aktivitu a vývoj vajec u *Lu. longipalpis*

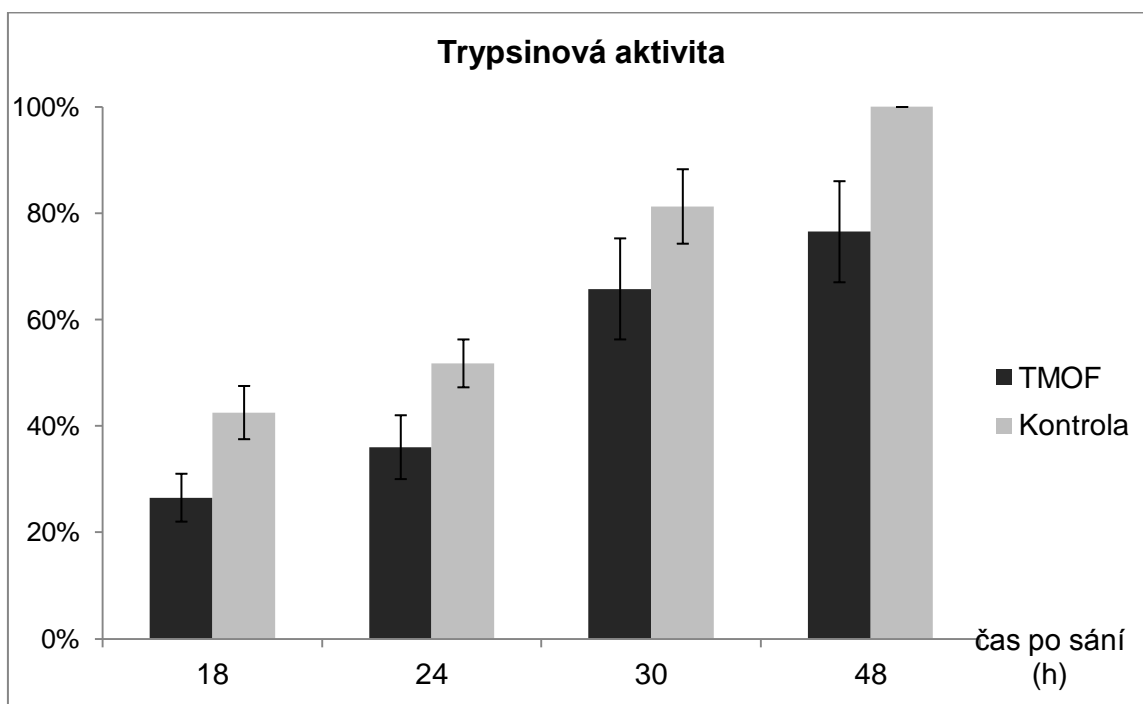
Jednu skupinu samic *Lutzomyia longipalpis* jsme nechali sát na krmítku s čistou králíčí krví a druhou na krmítku, kde bylo do krve přidáno TMOF. Ve čtyřech časových intervalech jsme měřili trypsinovou aktivitu ve vypitvaných střevech. Pokus byl opakován čtyřikrát s obdobnými výsledky, které jsou shrnuty a znázorněny na obrázku 4-17. Měření vzorků z jednotlivých pokusů ale probíhala zvlášť, proto výsledné hodnoty nemohou být vyjádřeny v relativních fluorescenčních jednotkách (rfu/min) a jsou převedeny na procenta.

U skupin TMOF byl zaznamenán pokles v trypsinové aktivitě ve všech časových intervalech o 15 – 35% oproti kontrolním skupinám, přičemž nejvýraznější rozdíl byl 18 a 24 h po sání krve. Výsledky byly otestovány pomocí Mann-Whitney U-testu a bylo zjištěno, že rozdíl mezi skupinami je statisticky průkazný ve všech časových intervalech ($p(18) = 0,0018$; $p(24) = 0,0018$; $p(30) = 0,0327$; $p(48) = 0,0496$).

Ve třech časových úsecích jsme také porovnávali velikost vajec. Nejprve jsme hodnotili, zda se vejce vyvíjela – čili obsahovala žloutek, nebo zda se nevyvíjela – tedy byla bez žloutku. U vyvíjejících se jsme pak měřili délku vajec a délku jejich žloutku. Výsledky čtyř pokusů jsou shrnuty v tabulce 4-7 a 4-8 a znázorněny na obrázcích 4-18 a 4-19.

Ve všech časových úsecích byl mezi skupinami shledán signifikantní rozdíl jak v poměru vajec vyvíjejících/nevyvíjejících se ($\chi^2(\text{celkem}) = 103,8$; $p(\text{celkem}) < 0,0001$; $\chi^2(24) = 62,1$; $p(24) < 0,0001$; $\chi^2(48) = 10,4$; $p(48) = 0,0012$; $\chi^2(72) = 38,7$; $p(72) < 0,0001$), tak i v měření délky u vyvíjejících se vajec (ANOVA: délka vajec - $F(1, 589) = 112,9$; $p < 0,0001$, délka žloutku - $F(1, 589) = 140,4$; $p < 0,0001$). U kontrolní skupiny se

vyvinulo 98 % vajec, zatímco u TMOF pouhých 70 %. Vejce ze skupiny TMOF se navíc vyvíjela pomaleji a byla o 12 – 24 % (13 – 58 µm) kratší než vejce kontrolní. Vliv TMOF nebyl u všech samic stejný, i u jedné samice se mezi vejci vyskytovala velká variabilita, zatímco u kontrolní skupiny se vejce vyvíjela rovnoměrně a u všech samic velmi podobně. Morfologické rozdíly vajec mezi skupinami jsou znázorněny na obrázcích 4-20 (24 h po sání) a 4-21 (72 h po sání).



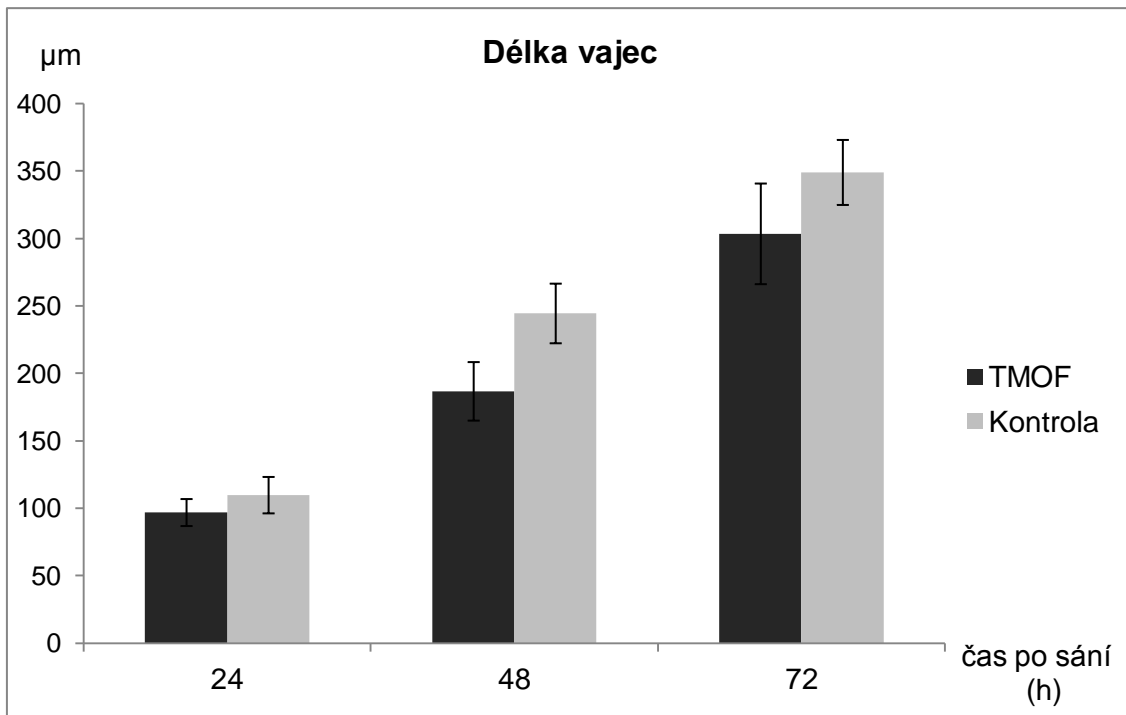
Obr. 4-17: Trypsinová aktivita *Lu. longipalpis* po sání krve s TMOF (28 mg/ml) a kontrolní krve bez TMOF, aktivita v homogenátu střev 18, 24, 30 a 48 h po sání krve.

Tab. 4-7: Poměr vajec *Lu. longipalpis* vyvíjejících se a nevyvíjejících se po sání krve s TMOF (28 mg/ml) a kontrolní krve (Kon) bez TMOF.

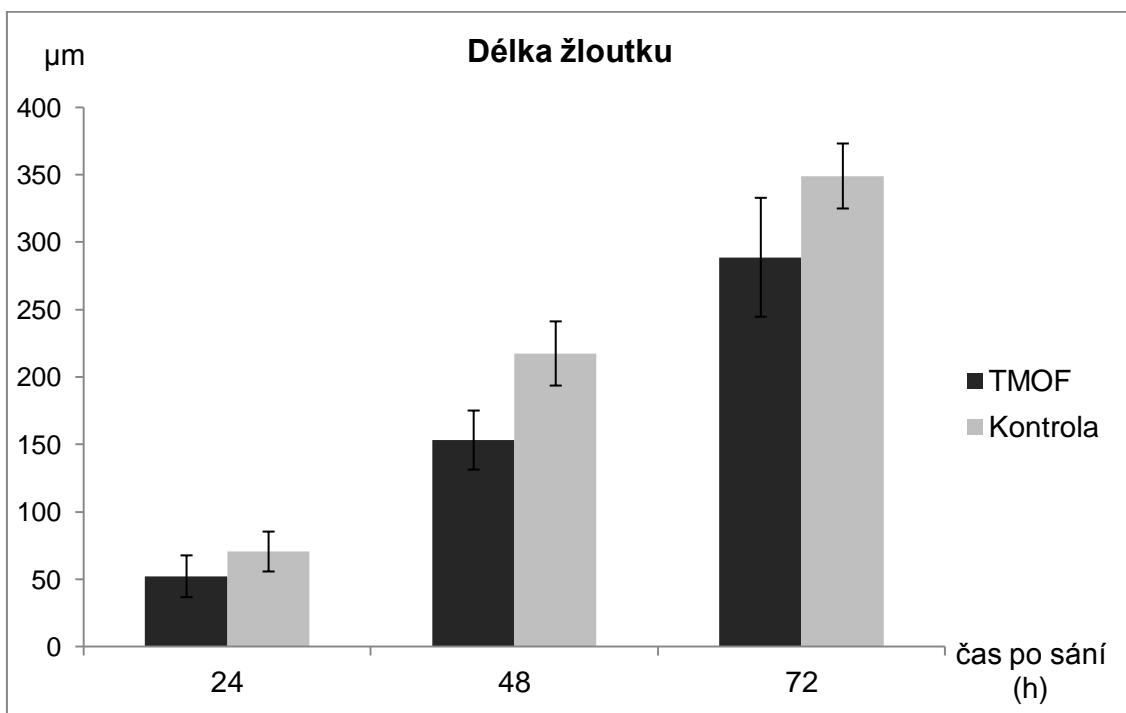
Poměr vajec vyvíjející/nevyvíjející	TMOF24	Kon24	TMOF48	Kon48	TMOF72	Kon72
	61/59	115/5	110/10	120/0	77/33	110/0

Tab. 4-8: Srovnání velikosti vyvíjejících se vajec *Lu. longipalpis* po sání krve s TMOF (28 mg/ml) a kontrolní krve bez TMOF.

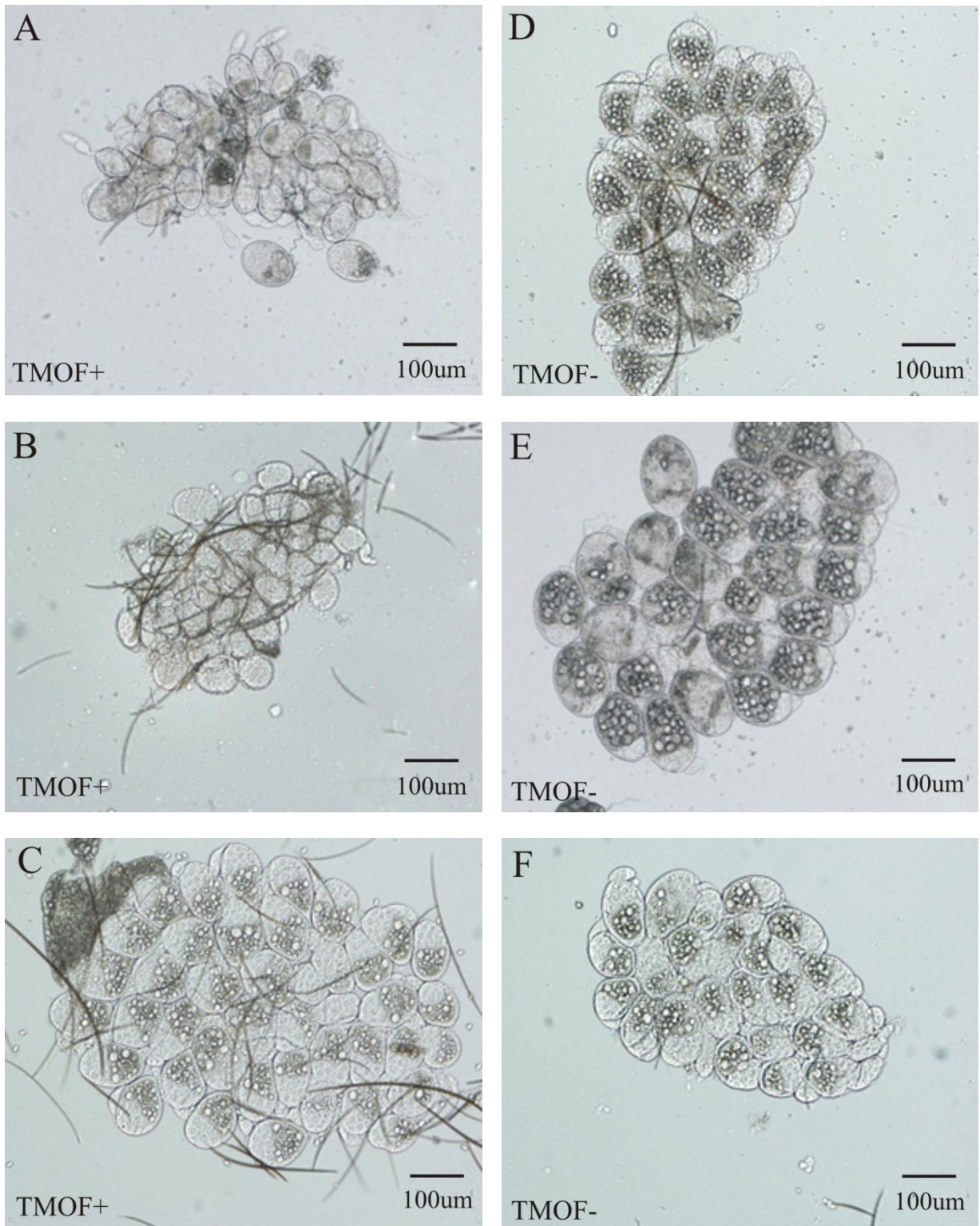
Čas (h)	Počet změřených vajec		Průměrná délka vejce		Průměrná délka žloutku	
	TMOF	Kontrola	TMOF	Kontrola	TMOF	Kontrola
24	61	115	97 µm	110 µm	52 µm	71 µm
48	110	120	187 µm	245 µm	153 µm	217 µm
72	77	110	304 µm	349 µm	289 µm	349 µm



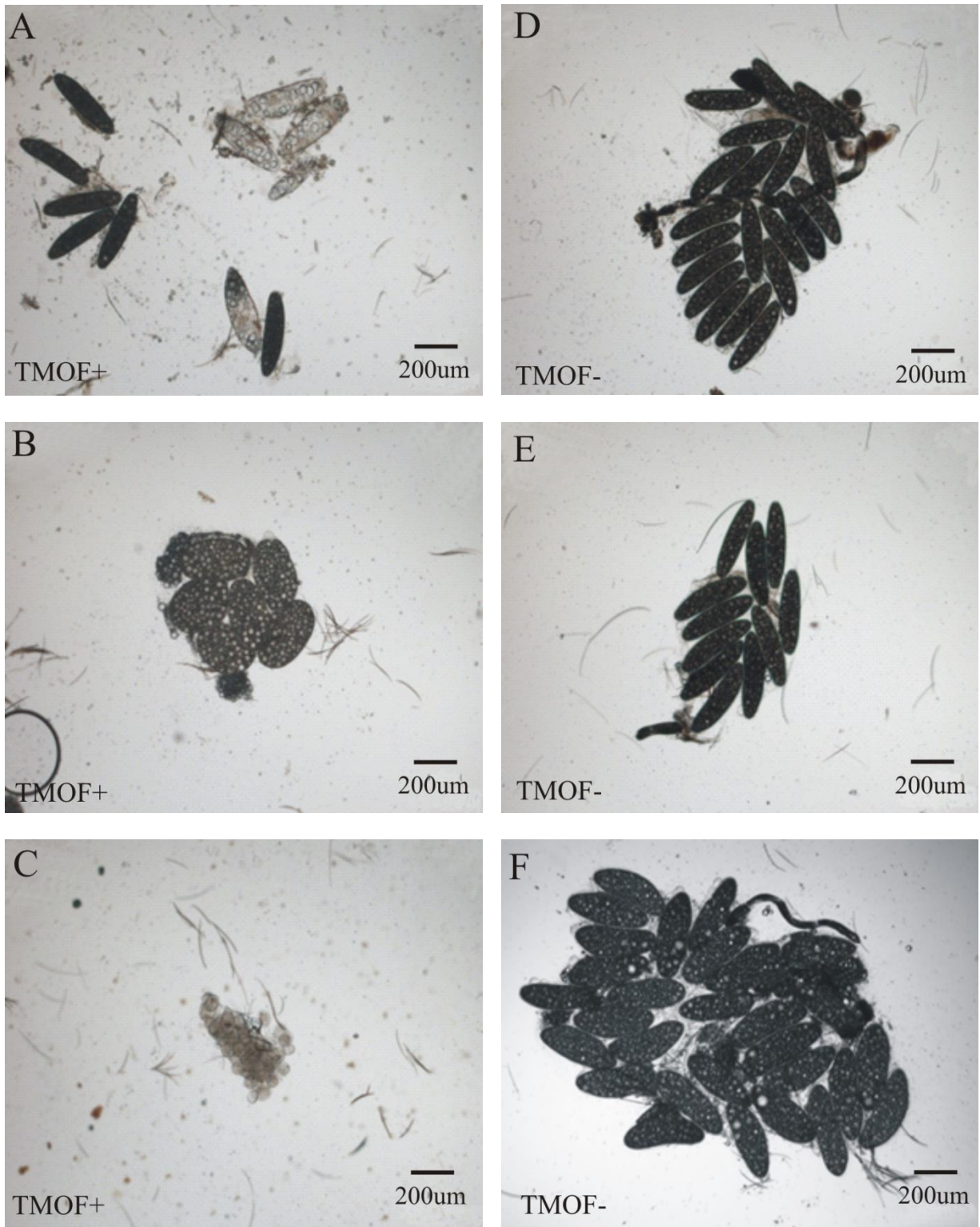
Obr. 4-18: Srovnání délky vyvíjejících se vajec *Lu. longipalpis* po sání krve s TMOF (28 mg/ml) a kontrolní krve bez TMOF.



Obr. 4-19: Srovnání délky žloutku u vyvíjejících se vajec *Lu. longipalpis* po sání krve s TMOF (28 mg/ml) a kontrolní krve bez TMOF.



Obr. 4-20: Vývoj vajec *Lu. longipalpis* 24 h po sání krve (zvětšení 10x). **A, B** a **C:** po sání krve s přidaným TMOF (28 mg/ml). **A, B:** vejce jsou menší a méně vyvinutá než v kontrolní skupině, **C:** vejce jsou vyvinutá obdobně jako vejce kontrolní. **D, E** a **F:** po sání kontrolní krve bez přidaného TMOF.



Obr. 4-21: Vývoj vajec *Lu. longipalpis* 72 h po sání krve (zvětšení 4x). **A, B a C:** po sání krve s přidaným TMOF (28 mg/ml), **A:** vejce se vyvinula do normálních tvarů, ale u některých se vůbec nevytvořil žloutek, **B:** vejce zůstala menší a kulatější, **C:** vejce se nevyvinula vůbec. **D, E a F:** po sání kontrolní krve bez přidaného TMOF, vejce normálního tvaru.

5 DISKUZE

Vývoj leishmanií v trávicí soustavě samic flebotomů úzce souvisí s trávením nasáté krve. Na průběh trávení mohou mít vliv různé exogenní a endogenní faktory a zároveň tak může být ovlivněn i vývoj a přenos leishmanií. Ve své práci jsem se zabývala faktory, které mohou mít efekt jak na trávení, tak na vývoj leishmanií ve střevě přenašeče.

Krev od různých druhů hostitelů se může nutritivně lišit a fekundita samic tak závisí na množství proteinů a aminokyselin v nasáté krvi (Ready 1979). Druh nasáté krve tak má vliv na průběh trávení, dobu kladení a množství nakladených vajec (Ward 1977, Benito-De Martin a kol. 1994, Hanafí a kol. 1999, Noguera a kol. 2006). My jsme se v našich experimentech rozhodli porovnat savčí (králičí) a ptačí (kuřecí) krev. Nejprve jsme hodnotili množství proteinů v plně nasátém střevě samic *P. duboscqi*. Podle Sant'Anna a kol (2010) je v 1 ml králičí krve dvakrát tolik proteinů než v 1 ml kuřecí krve, ale po nasátí krve samicemi *Lu. longipalpis* je ve střevech po sání králičí krve naopak o něco nižší koncentrace proteinů než po sání kuřecí krve. Podle autorů jsou samice *Lu. longipalpis* schopné kompenzovat nižší obsah živin v krvi tím, že krev při sání výrazně zahustí mechanismem prediuréze (Sant'Anna a kol. 2010). My jsme ve střevěch *P. duboscqi* naměřili dvakrát vyšší proteinovou koncentraci po sání na králíkovi než po sání na kuřeti, což zhruba odpovídá poměru koncentrací proteinů v králičí a kuřecí krvi (viz výše). Ačkoli je prediuréza popsána i u samic *P. duboscqi* (Sadlova a kol. 1998, Sadlova a Volf 1998), zdá se, že tento druh není schopen zahustit ptačí krev tak výrazně jako *Lu. longipalpis*.

V práci jsme dále měřili rozdíl v trypsinové aktivitě a ve vývoji vajec po sání na králíkovi nebo na kuřeti. Ukázalo se, že nižší obsah proteinů v kuřecí krvi měl vliv na trypsinovou aktivitu, která byla 18, 24, 30 a 72 h po sání signifikantně nižší než u samic sátých proteinově bohatší králičí krve. Nejvýraznější rozdíl byl zaznamenán v průběhu prvních 24 h, kdy byla po sání na kuřeti trypsinová aktivita nižší o 40 – 55%, zatímco 48 h po sání byl rozdíl pouze 8 % a hodnoty už tedy nebyly signifikantní. Naše výsledky jsou ve shodě se studii o závislosti enzymatické aktivity na proteinové koncentraci u komárů, kde bylo prokázáno, že proteolytická aktivita je spouštěna proteiny (Briegel a Lea 1975) a že míra syntézy trypsinu pozitivně koreluje s koncentrací solubilních proteinů v přijaté potravě (Felix a kol. 1991). Koncentrace proteinů v potravě ovlivňuje také sekreci hemaglutininů, kdy se při vyšší proteinové koncentraci zvyšuje hemaglutinační aktivita *P. duboscqi* (Volf a Palanova 1996).

Nižší obsah proteinů a pokles trypsinové aktivity zároveň koreloval s vývojem vajec, kdy jsme u samic sátých na kuřeti pozorovali částečné zpomalení vývoje – vejce byla v průměru o 10 % kratší než u samic sátých na králíkovi. Naše výsledky jsou částečně ve shodě se studií Noguera a kol. (2006), kde autoři u *Lu. ovallesi* pozorovali po sání kuřecí krve kratší dobu trávení a zároveň delší vývoj vajec než po sání různých druhů savčí krve.

V části práce jsme zjišťovali efekt TMOF na trávení a vývoj vajec flebotomů. „Trypsin modulating oostatic factor“ (TMOF) je komáří hormon, který je syntetizovaný ve folikulárních buňkách vaječnicku a vazbou na specifické receptory střevních epitelálních buněk ukončuje syntézu trypsinu (Borovsky 1985, 1988, Borovsky a kol. 1990, 1996). Experimentální podání TMOF samicím nebo larvám komárů má výrazné inhibiční účinky na syntézu trypsinu a vitelogenezi (Borovsky a kol. 1993, Borovsky a Mahmood 1995) i na růst a vývoj larev (Borovsky a Meola 2004, Lau a kol. 2011). Jelikož experimentálně podaný TMOF má účinky i na jiné druhy parazitického hmyzu (Borovsky a kol. 1993, Nauen a kol. 2001), rozhodli jsme se na základě podobnosti komárů a flebotomů otestovat efekt tohoto hormonu na samice *Lu. longipalpis*.

Prokázali jsme, že přidání TMOF do krve při sání samic přes membránu mělo vliv jak na trypsinovou aktivitu, tak na vývoj vajec a žloutku. Ve všech měřených intervalech (18, 24, 30 a 48 h po sání krve) jsme zaznamenali signifikantní pokles trypsinové aktivity o 15 – 35 %, přičemž nejvýraznější rozdíl byl pozorován v průběhu prvních 24 h. Zároveň jsme shledali ve sledovaných intervalech (24, 48 a 72 h po sání krve) signifikantní rozdíl ve vývoji vajec. U samic sátých krev s přidáním TMOF se vyvíjelo téměř o 30 % méně vajec a vyvíjející se vejce byla navíc v průměru o 15 – 20 % kratší než v kontrolní skupině. K dosažení tohoto efektu bylo ale zapotřebí vysoké koncentrace hormonu a efekt byl méně výrazný než u komárů. Zatímco u flebotomů jsme po podání TMOF o koncentraci 28 mg/ml krve dosáhli maximální inhibice trypsinové aktivity o 35 % a vitelogeneze byla potlačena jen částečně, u komárů 6,7 mg TMOF/ml krve způsobilo inhibici trypsinu o 80 % a vývoj vajec se téměř úplně zastavil (Borovsky a Mahmood 1995). V prvotních experimentech, kde jsme zvolili nižší koncentraci TMOF, se efekt prakticky neprojevil. Po zjištění takto nízkého efektu jsme se rozhodli s experimenty dále nepokračovat a netestovat ani případný vliv TMOF na vývoj leishmanií.

V pilotních studiích jsme v naší laboratoři zkoušeli hormon podávat i larvám. Larvy byly krmeny rekombinantními kvasinkami produkujícími TMOF, ale na rozdíl od komářích

larev, které žijí ve vodě a živí se filtrováním vody, odmítaly larvy flebotomů tento druh potravy přijmout. Flebotomí larvy nepřijímaly ani rekombinantní kvasinky ani kontrolní kvasinky bez TMOF. Lze tedy shrnout, že TMOF není pro biologický boj s flebotomy vhodný.

Nejdůležitější část předkládané práce byla věnována experimentálním infekcím. Nejprve jsme testovali, zda jsou samice *P. duboscqi* stejně náchylné k infekci *L. major* při prvním i druhém sání krve. U glosin bylo totiž zjištěno, že jedinci jsou více náchylní k infekci trypanosomami při prvním sání, než když sají infekční krev až při dalších sání (Welburn a Maudlin 1992). Pozdější studie ukázaly, že vyšší vnímavost k infekci je dána spíše stářím dospělců. Mladí jedinci, kteří jsou čerstvě vylíhli z kukly (do 24 h), jsou více vnímaví k infekci trypanosomami než starší dospělci (Kubi a kol. 2006, Walshe a kol. 2009). Zdá se, že vyšší vnímavost k infekci čerstvě vylíhlych jedinců je dána fyziologickou nevypěstostí (např. neúplně vytvořenou peritrofickou matrix), omezenými energetickými rezervami a nedokonalou imunitní odpovědí (Kubi a kol. 2006). Pokud je mi známo, u jiných krevsajících dipter není rozdíl v náchylnosti k infekci popisován. My jsme se rozhodli otestovat, zda podobný vliv stáří nebo počtu sání na míru infekce nemůže existovat u flebotomů.

Flebotomové se ale od glosin liší způsobem trávení krve a typem peritrofické matrix. Flebotomové stejně jako komáři tráví krev diskontinuálně a tvoří peritrofickou matrix typu I, tedy až po nasátí krve. Peritrofická matrix flebotomů se po strávení krve rozpadá a spolu se zbytky krve je vydefekována. Naproti tomu glosiny tráví krev kontinuálním způsobem, kdy krev nashromážděná v divertikulu je postupně trávena mesenteronem. Peritrofická matrix glosin je typu II a je tvořena kontinuálně a nezávisle na příjmu krve. Zatímco peritrofická matrix typu I je syntetizována všemi buňkami střevního epitelu obklopujícím přijatou krev, peritrofická matrix typu II je produkována specializovanými buňkami v oblasti kardie (shrnuto v Lehane 1997).

V experimentech jsme samice flebotomů infikovali při prvním nebo až při druhém sání, přičemž samice, kterým byla podána infekční krev při prvním sání, byly o týden mladší. Mezi skupinami jsme ale nezjistili žádné rozdíly. U obou skupin bylo nakaženo téměř 100 % samic, po defekaci se ve většině případů (zhruba 80 %) jednalo o silné nákazy a u naprosté většiny samic leishmanie kolonizovaly stomodeální valvu od šestého dne po infekci. Mohli jsme tedy vyloučit vliv stáří a pořadí sání samic na naše následující pokusy, ve kterých jsme zjišťovali vliv ptačí krve na vývoj leishmanií v přenašeči.

Při vývoji leishmanií ve střevě flebotoma hraje důležitou roli trávení nasáté krve. Některými autory je popisováno, že trávení krve od některých hostitelů může negativně ovlivnit vývoj leishmanií (Adler 1964 podle Schlein a kol. 1983). V literatuře existují rozdílné názory ohledně vlivu ptačí krve na vývoj leishmanií ve flebotomech. Podle Schlein a kol. (1983) je infekce leishmanií (*L. major*) ve střevech *P. papatasi* výrazně redukována, pokud samice jeden den před infekčním sáním nebo jeden den nebo i jeden týden po infekčním sání sají na krocanech. Infekce *L. major* byla prý potlačena i v experimentech, kdy samice sály jeden den po infekčním sání kuřecí krev (Schlein a Jacobson 1994). Podle autorů jsou infekce signifikantně redukovány následkem vysoké DNAsové aktivity, která je indukována přítomností jader v ptačích erytrocytech (Schlein a kol. 1983). Naproti tomu u novosvětského druhu *Lu. longipalpis* nebylo pozorováno, že by trávení kuřecí krve potlačovalo infekci *L. braziliensis*, *L. amazonensis* nebo *L. mexicana* (Nieves a Pimenta 2002, Sant'Anna kol. 2010). Nieves a Pimenta (2002) sice zaznamenali o něco nižší procento infikovaných samic po sání kuřecí krve s amastigoty *L. braziliensis* nebo *L. amazonensis* než po infekčním sání savčí krve (např. krysí nebo myší), ale infekce nebyla eliminována tak, jak pozorovali Schlein a kol. (1983) a Schlein a Jacobson (1994). Redukci infekce ve střevech samic *Lu. longipalpis* nezaznamenali ani Sant'Anna a kol. (2010). Autoři naopak uvádějí, že u samic infikovaných sáním kuřecí krve s amastigoty *L. mexicana* bylo vyšší procento infikovaných samic i vyšší intenzity nákaz než u samic, které byly infikovány z králičí krve. Je nutné podotknout, že Sant'Anna a kol. (2010) a Nieves a Pimenta (2002) v experimentech použili amastigotní infekce, což více odpovídá přírodním podmínkám, ale infikovali samice přímo z kuřecí krve, což metodu naopak zjednodušuje, jelikož v přírodě se leishmanie v ptačí krvi nenacházejí.

Jelikož je tedy vliv ptačí krve na vývoj leishmanií diskutabilní a různí autoři se ve svých teoriích neshodují, rozhodli jsme se tyto názory ověřit. Nejprve jsme zjišťovali, zda podání kuřecí krve před infekčním sáním ovlivní vývoj promastigotů *L. major* ve střevě *P. duboscqi*. Podle Schlein a kol. (1983) je infekce leishmaniemi (*L. major*) redukována zhruba o 75 %, pokud samice (*P. papatasi*) sají jeden den nebo i jeden týden před infekčním sáním na krocanech. V našich pokusech nebyly samice ochotné znovu sát, dokud se po prvním sání nevykladly, proto jsme infekční sání uskutečnili devátý den od sání na kuřeti nebo na myši. Samice nesály na kuřeti tak dobře jako na myši, proto jsme do kuřecí skupiny museli zařadit více samic. Na kuřeti jsme při každém opakování pokusu nechali sát cca 800 samic, ze kterých se nasálo přibližně 150 – 200, zatímco myší skupina obsahovala cca 300 samic, ze kterých se vždy nasály téměř všechny. V koloniích držených v laboratoři je po vykladení značně vysoká mortalita. V našich experimentech s *P. duboscqi* se nám dařilo držet mortalitu

při kladení zhruba na 50 %, a jen proto nám do druhé části experimentu, kdy jsme flebotomy infikovali sáním králičí krve s promastigoty *L. major*, zbývalo dostatečné množství samic. Nicméně, přestože byly samice již vykladené, vždy se jich při druhém (infekčním) sání nasálo jen málo (přibližně po dvaceti v obou skupinách).

V našem experimentu jsme, na rozdíl od Schleina a kol. (1983), nepozorovali po sání ptačí krve žádnou redukci infekce. U skupin sátých na myši nebo na kuřeti bylo před i po defekaci nakaženo shodně 100 % samic a ve většině případů (70 – 80 %) se jednalo o silné infekce, u 95 % samic leishmanie šestý den po infekci kolonizovaly stomodeální valvu. Lze tedy shrnout, že kuřecí krev podaná devět dní před infekčním sáním nemá žádný vliv na vývoj *L. major* ve střevech *P. duboscqi*.

Ve druhém typu experimentu jsme, stejně jako Schlein a kol. (1983), infikovali samice podáním 5% krve s promastigoty a za 24 h jsme je sáli na kuřeti nebo na myši. K infekci flebotomů byla použita ředěná (5%) krev z toho důvodu, aby samice byly ochotné sát znovu již za 24 h po infekčním sání. V tomto typu experimentu jsme opět mezi skupinami samic sátých na myši nebo na kuřeti nepozorovali signifikantní rozdíly. Procento infikovaných samic bylo u obou skupin velmi podobné (mezi 50 a 70 %); devátý den po sání bylo dokonce shodné (50 %). Rozdíl nebyl ani v intenzitách nákaz a jejich lokalizaci. Mikroskopické pozorování jsme zároveň potvrdili metodou kvantitativní PCR: devátý den po druhém sání bylo u obou skupin infikováno shodně 60 % samic, infekce byly obdobně silné a samice sáté na kuřeti byly dokonce více infikované než samice sáté na myši. Můžeme tedy shrnout, že kuřecí krev podaná 24 h po infekčním sání neredukuje infekci *L. major* v přirozeném přenašeči.

V obou typech experimentů jsme tedy po sání kuřecí krve nepozorovali redukci leishmaniové infekce ve srovnání s kontrolní skupinou, čímž se zásadně lišíme od poznatků, které publikovali Schlein a kol. (1983). Domníváme se, že tento rozdíl je způsoben skutečností, že autoři ve zmiňované publikaci nepoužili k experimentům adekvátní pozitivní kontroly. Schlein a kol. (1983) testovali pouze jednu skupinu samic, které před nebo po infekčním sání sály na krocanech. V experimentu tedy nebyla použita kontrolní skupina samic, které by před nebo po infekčním sání sály na savčím hostiteli. V publikaci je uveden pouze dlouhodobý průměr z předešlých infekčních experimentů, se kterým jsou srovnávány výsledky z pokusů s krocání krví. My jsme s použitím stejné metody, kdy jsme samice infikovali podáním 5% králičí krve s promastigoty a za 24 h jsme je sáli na zvířeti, také zaznamenali nižší procenta infikovaných samic, než je obvyklé u standardních infekčních pokusů s neředěnou králičí krví. Pokles o 30 – 50 % jsme ale pozorovali jak ve skupině sáté

na kuřeti, tak u kontrolních samic sátých na myši. Domníváme se tedy, že redukce infekce v experimentech Schlein a kol. (1983) byla způsobena zvoleným schématem pokusu a ne sáním krocaní krve.

Abychom svou domněnku potvrdili, provedli jsme další pozorování, kde jsme u samic infikovaných sáním 5% krve s promastigoty zjišťovali procenta a intenzity infekcí v rané fázi infekce (1. a 2. den po sání), tedy v době, kdy samice v předešlém experimentu sály na myši nebo na kuřeti. Ukázalo se, že u některých samic sátých na infekční 5% krvi nedošlo k zahuštění krve, nevytvořila se peritrofická matrix a promastigoti byli pravděpodobně vyloučeni spolu s fyziologickým roztokem během prvních 24 h po infekčním sání. Leishmanie se tak uchytily pouze u 65 % samic, u kterých navíc byly infekce slabé případně střední intenzity. Naproti tomu v kontrolní skupině infikované z neředěné krve byly všechny samice infekční a nákazy byly ve většině případů silné. V experimentu, kde byly samice flebotomů infikovány sáním 5% krve s promastigoty leishmanií a za 24 h sály na kuřeti nebo na myši, byla tedy část infekcí potlačena ještě před sáním na zvířeti. Zároveň byl v tomto typu experimentu pozorován malý pokles procenta infikovaných samic mezi druhým a šestým dnem po druhém sání. Ten byl pravděpodobně způsoben neschopností některých leishmanií uniknout včas ze dvou peritrofických matrix, které se vytvořily po prvním a po druhém sání.

Při druhém sání, které následovalo již za 24 h, byla první peritrofická matrix s promastigoty obklopena nasátou krví a další peritrofickou matrix. Tyto dvě různé peritrofické matrix jsme se pokusili dokumentovat pomocí histologických řezů. Na řezech je ukázán průřez těmito dvěma matrix, ale bohužel nejsou vidět leishmanie, protože prostor vnitřní peritrofické matrix je malý a zbytky s leishmaniami jsou v něm velmi nahuštěné a nelze od sebe rozpoznat jednotlivé buňky. V budoucnu bude proto zapotřebí dalšího testování, aby se nám podařilo leishmanie na histologických řezech lépe zachytit. Předpokládáme, že při zvýšení podílu krve na 10 – 20 % bude prostor vnitřní peritrofické matrix větší a leishmanie budou lépe viditelné na řezech.

Z našich výsledků tedy vyplývá, že při použití metody, kdy jsou samice infikovány sáním 5% krve s promastigoty a za 24 h sáty na zvířeti, je redukce infekce způsobena právě zvoleným schématem pokusu a ne trávením ptačí krve. Schlein a kol. (1983) zaznamenali nejvyšší redukci infekce (o 95 %), pokud samice před sáním na krocanech infikovali pouze z fyziologického roztoku. Tento způsob jsme netestovali, ale domníváme se, že eliminace infekce byla způsobena vyloučením leishmanií spolu s fyziologickým roztokem do 24 h po infekčním sání.

V přírodě se flebotomové mohou nakazit leishmaniami jen ze savčí krve, ale po vykladení mohou infekční samice sát na ptákoví. Abychom se více přiblížili přírodním podmínkám, chtěli jsme otestovat vliv kuřecí krve na leishmanie i v pozdější fázi infekce. Nejprve jsme samice *P. duboscqi* infikovali sáním králičí krve s promastigoty *L. major* a devátý den, kdy už byly samice vykladeny, jsme je zkoušeli sát na kuřeti nebo na myši. Infekční samice ale nebyly ochotné znovu sát. Vždy se nasálo jen malé množství samic, u kterých byla navíc velmi vysoká mortality. Pokus jsme opakovali třikrát pokaždé se šesti sty samicemi, ale defekaci po druhém sání přežily pouze tři samice z kuřecí skupiny a dvě samice z myší skupiny. Všechny tyto samice byly infikovány silně nebo středně. Z důvodu náročnosti pokusu a vysoké mortality samic jsme tento typ experimentu dále neopakovali, ale zvolili jsme zjednodušený postup, který nám poskytl reprodukovatelné výsledky. Samice jsme infikovali sáním 10% králičí krve s promastigoty a šestý den po infekci jsme je sály na kuřeti nebo na myši. Jelikož 10% krev neposkytla samicím dostatečné množství živin pro vývoj vajec, byly samice ochotné podruhé sát, aniž by se mezi tím vykladly. Ani v tomto typu experimentu jsme nezaznamenali, že by trávení kuřecí krve mělo vliv na leishmanie. Druhý i šestý den po sání infikovaných flebotomů na myši nebo kuřeti bylo u obou skupin infikováno shodně mezi 80 – 85 % samic a u většiny jedinců se jednalo o silné infekce, kdy leishmanie kolonizovaly stomodeální valvu. Tato pozorování ve světelném mikroskopu jsme opět potvrdili metodou kvantitativní PCR, jejíž výsledky rovněž neukázaly žádné rozdíly mezi skupinami samic. Lze tedy shrnout, že kuřecí krev nemá vliv na průběh infekce *L. major*, ani pokud je podána v pozdější fázi infekce, konkrétně šestý den po infekčním sání. Pokud je mi známo, tento typ pokusu nikdo jiný netestoval, proto nelze naše výsledky porovnat s jinou publikací.

Jak si lze všimnout, v experimentu, kde jsme k infekci flebotomů použili 10% krev, jsme opět po druhém sání zaznamenali o něco nižší procento infikovaných samic (o 15 – 20 %) než u standardních infekcí s neředěnou krví. Tento pokles je pravděpodobně způsoben rychlejším trávením a dřívější defekací. U samic sátých na 10% krvi dosahuje trypsinová aktivita maxima 30 h po sání a po 72 h je téměř nulová, zatímco po sání neředěné (100%) krve má trypsinová aktivita své maximum po 48 h po sání a i po 72 h je poměrně vysoká. Maximum aktivity po sání 100% krve je navíc téměř desetkrát vyšší, než po sání 10% krve. Nižší trypsinová aktivita a rychlejší trávení odpovídá údajům z experimentů o závislosti enzymatické aktivity na koncentraci proteinů v potravě komárů (Briegel a Lea 1975, Felix a kol. 1991). U samic sátých ředěnou krví také probíhá defekace o jeden i dva dny dříve, čímž je zkrácen čas leishmanií na uvolnění z peritrofické matrix a uchycení se ve střevě.

V experimentu, kde byly samice flebotomů infikovány podáním 10% krve s promastigoty a šestý den byly sány na kuřeti nebo na myši, tak nestihly leishmanie u některých samic včas uniknout z peritrofické matrix a byly vydefekovány. Část infekcí tak byla potlačena ještě před sáním na zvířeti.

V žádném typu experimentu, kde jsme testovali vliv trávení kuřecí krve na vývoj *L. major* ve střevě *P. duboscqi*, jsme nezaznamenali redukci infekce tak, jak popisují Schlein a kol. (1983) u *P. papatasi* a *L. major*. Shodujeme se naopak s výsledky z pokusů se druhy *Lu. longipalpis* a *L. mexicana*, kde kuřecí krev neměla vliv na vývoj leishmanií (Sant'Anna a kol. 2010). Vzhledem k tomu, že *P. papatasi* a *P. duboscqi* jsou velmi příbuzné druhy a oba jsou přirozenými přenašeči *L. major*, je rozpor mezi našimi výsledky a výsledky Schlein a kol. (1983) na první pohled zarážející. Při detailnější analýze je však lze snadno vysvětlit chybným experimentálním designem, který tito autoři použili. Chybné údaje o vlivu ptačí krve na leishmanie jsou tak učebnicovým příkladem toho, jak zavádějící mohou být experimenty bez správně zvolených kontrol.

6 SHRNU TÍ

- Druh přijaté krve ovlivňuje trávení a aktivitu trávicích enzymů. Po sání na kuřeti je ve střevě nasátých samic *P. duboscqi* nižší proteinová koncentrace, nižší trypsinová aktivita a vejce se vyvíjejí pomaleji než po sání na králíkovi.
- Komáří hormon TMOF má částečný vliv na trypsinovou aktivitu a vývoj vajec u *Lu. longipalpis*, pouze ale při velmi vysoké koncentraci (28 mg/ml krve). Pozorovaný efekt TMOF byl sice signifikantní, nicméně byl méně výrazný než u komárů
- Náchylnost k infekci *L. major* je stejná jak při prvním tak při druhém sání *P. duboscqi*. Mezi sledovanými skupinami nebyl zaznamenán rozdíl v procentu infikovaných samic, intenzitě infekce ani v lokalizaci.
- Prostudovali jsme efekt ptačí krve na vývoj *L. major* v *P. duboscqi*. Kuřecí krev podaná před infekčním sáním nemá vliv na průběh infekce. Mezi samicemi sátými na kuřeti nebo na myši devět dní před infekčním sáním nebyly v procentu ani intenzitách nálezů pozorovány signifikantní rozdíly. Rozdíly nebyly zaznamenány ani v lokalizaci infekce, ve většině případů leishmanie kolonizovaly stomodeální valvu.
- Kuřecí krev nemá vliv na průběh infekce *L. major* u *P. duboscqi*, ani když je podána po infekčním sání. Mezi samicemi sátými na kuřeti nebo na myši jeden den nebo šest dní po infekčním sání nebyly pozorovány signifikantní rozdíly v procentu, intenzitě ani lokalizaci infekce. U většiny samic leishmanie kolonizovaly stomodeální valvu.
- V experimentech, kde byla k infekci flebotomů použita 5% krev, byl oproti standardním infekcím s neředěnou krví zaznamenán výrazný pokles procenta infikovaných samic. Tento pokles byl způsoben vyloučením zbytků krve s leishmaniemi v průběhu prvních 24 h po sání. Zhruba u 35 % samic tak byla infekce eliminována ještě před sáním na kuřeti nebo na myši. Část infekcí byla potlačena také při defekaci po druhém sání, kdy se patrně leishmaniím nepodařilo uniknout ze dvou peritrofických matrix.
- V experimentech, kde byla k infekci flebotomů použita 10% krev, byl také pozorován mírný pokles procenta infikovaných samic. Toto snížení o 15 – 20 % bylo způsobeno dřívější defekací.
- Prokázali jsme tedy, že redukce infekce *L. major* ve studii Schlein a kol. (1983) nebyly způsobeny ptačí krví, ale zvoleným postupem pokusu.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adler S, 1938.** Factors determining the behaviour of *Leishmania* sp. in sandflies. Harefuah 14: 1-6.
- Adler S, 1964.** *Leishmania*. Advances in Parasitology 2: 35-96.
- Anez N, Nieves E, Cazorla D, 1989.** The validity of the developmental pattern in the sandfly gut for classification of *Leishmania*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 83: 634-5.
- Bates PA a Rogers ME, 2004.** New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. Current Molecular Medicine 4: 601-9.
- Benito-De Martin MI, Gracia-Salinas MJ, Molina-Moreno R, Ferrer-Dufol M, Lucientes-Curdi J, 1994.** Influence of the nature of the ingested blood on the gonotrophic parameters of *Phlebotomus perniciosus* under laboratory conditions. Parasite 1: 409-11.
- Benkova I a Volf P, 2007.** Effect of temperature on metabolism of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). Journal of Medical Entomology 44: 150-4.
- Borovsky D, 1985.** Isolation and characterization of highly purified mosquito oostatic hormone. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 2: 333-349.
- Borovsky D, 1988.** Oostatic hormone inhibits biosynthesis of midgut proteolytic-enzymes and agg development in mosquitos. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 7: 187-210.
- Borovsky D, 2003.** Trypsin-modulating oostatic factor: a potential new larvicide for mosquito control. The Journal of Experimental Biology 206: 3869-75.
- Borovsky D, Carlson DA, Griffin PR, Shabanowitz J, Hunt DF, 1990.** Mosquito oostatic factor: a novel decapeptide modulating trypsin-like enzyme biosynthesis in the midgut. The FASEB Journal 4: 3015-20.
- Borovsky D, Carlson DA, Griffin PR, Shabanowitz J, Hunt DF, 1993.** Mass spectrometry and characterization of *Aedes aegypti* trypsin modulating oostatic factor (TMOF) and its analogs. Insect Biochemistry and Molecular Biology 23: 703-12.
- Borovsky D, Janssen I, Vanden Broeck J, Huybrechts R, Verhaert P, De Bondt HL, Bylemans D, De Loof A, 1996.** Molecular sequencing and modeling of *Neobellieria bullata* trypsin. Evidence for translational control by *Neobellieria* trypsin-modulating oostatic factor. European Journal of Biochemistry 237: 279-87.

- Borovsky D, Khasdan V, Nauwelaers S, Theunis C, Bertier L, Ben-Dov E, Zaritsky A, 2010.** Synergy between *Aedes aegypti* trypsin modulating oostatic factor and δ -endotoxins. *The Open Toxinology Journal* 3: 141-150.
- Borovsky D a Mahmood F, 1995.** Feeding the mosquito *Aedes aegypti* with TMOF and its analogs; effect on trypsin biosynthesis and egg development. *Regulatory Peptides* 57: 273-81.
- Borovsky D a Meola SM, 2004.** Biochemical and cytoimmunological evidence for the control of *Aedes aegypti* larval trypsin with *Aea*-TMOF. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 55: 124-39.
- Borovsky D, Powell CA, Dawson WO, Shivprasad S, Lewandowski DJ, DeBondt HL, DeRanter C, DeLoof A, 1998.** Trypsin modulating oostatic factor (TMOF): a new biorational insecticide against mosquitoes. In *Insects, Chemical, Physiological and Environmental Aspects* (ed. D. Konopinska, G. Goldsworthy, R. J. Nachman, J. Nawrot, I. Orchard, G. Rosinski), Wroclaw, Poland: University of Wroclaw, 131-140.
- Borovsky D, Powell CA, Nayar JK, Blalock JE, Hayes TK, 1994a.** Characterization and localization of mosquito-gut receptors for trypsin modulating oostatic factor using a complementary peptide and immunocytochemistry. *The FASEB Journal* 8: 350-5.
- Borovsky D, Rabindran S, Dawson WO, Powell CA, Iannotti DA, Morris TJ, Shabanowitz J, Hunt DF, DeBondt HL, DeLoof A, 2006.** Expression of *Aedes* trypsin-modulating oostatic factor on the virion of TMV: A potential larvicide. *Proceedings of National Academy of Science U S A* 103: 18963-8.
- Borovsky D a 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: 235-42.
- Borovsky D, Song QS, Ma MC, Carlson DA, 1994b.** Biosynthesis, secretion, and immunocytochemistry of trypsin modulating oostatic factor of *Aedes aegypti*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 27: 27-38.
- Bradford MM, 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54.
- Briegel H a Lea AO, 1975.** Relationship between protein and proteolytic activity in the midgut of mosquitoes. *Journal of Insect Physiology* 21: 1597-604.
- Bylemans D, Borovsky D, Hunt DF, Shabanowitz J, Grauwels L, De Loof A, 1994.** Sequencing and characterization of trypsin modulating oostatic factor (TMOF) from the

ovaries of the grey fleshfly, *Neobellieria (Sarcophaga) bullata*. *Regulatory Peptides* 50: 61-72.

Clements AN, 2000. The biology of Mosquitoes. CABI Publishing, 511 str.

Curto EV, Jarpe MA, Blalock JE, Borovsky D, Krishna NR, 1993. Solution structure of trypsin modulating oostatic factor is a left-handed helix. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 193: 688-93.

Dillon RJ a Lane RP, 1993a. Bloodmeal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. *Medical and Veterinary Entomology* 7: 225-32.

Dillon RJ a Lane RP, 1993b. Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni*. *Parasitology Research* 79: 492-6.

Dostalova A, Votypka J, Favreau AJ, Barbian KD, Volf P, Valenzuela JG, Jochim RC, 2011. The midgut transcriptome of *Phlebotomus (Larrousius) perniciosus*, a vector of *Leishmania infantum*: comparison of sugar fed and blood fed sand flies. *BMC Genomics* 12: 223.

Eschenlauer SC, Faria MS, Morrison LS, Bland N, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Coombs GH, Lima AP, Mottram JC, 2009. Influence of parasite encoded inhibitors of serine peptidases in early infection of macrophages with *Leishmania major*. *Cellular Microbiology* 11: 106-20.

Felix CR, Betschart B, Billingsley PF, Freyvogel TA, 1991. Post-feeding induction of trypsin in the midgut of *Aedes aegypti* L (Diptera, Culicidae) is separable into 2 cellular-phase. *Insect Biochemistry* 21: 197-203.

Fiandra L, Terracciano I, Fanti P, Garonna A, Ferracane L, Fogliano V, Casartelli M, Giordana B, Rao R, Pennacchio F, 2010. A viral chitinase enhances oral activity of TMOF. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 533-40.

Guha-Niyogi A, Sullivan DR, Turco SJ, 2001. Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology* 11: 45R-59R.

Guzman H a Tesh RB, 2000. Effect of temperture and diet on the growth and longevity of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Biomedica* 20: 190-199.

Hanafi HA, Kanour WW, Jr., Beavers GM, Tetreault GE, 1999. Colonization and bionomics of the sandfly *Phlebotomus kazeruni* from Sinai, Egypt. *Medical and Veterinary Entomology* 13: 295-8.

- Harre JG, Dorsey KM, Armstrong KL, Burge JR, Kinnamon KE, 2001.** Comparative fecundity and survival rates of *Phlebotomus papatasi* sandflies membrane fed on blood from eight mammal species. *Medical and Veterinary Entomology* 15: 189-96.
- Jochim RC, Teixeira CR, Laughinghouse A, Mu J, Oliveira F, Gomes RB, Elnaiem DE, Valenzuela JG, 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: 15.
- Kamhawi S, 2006.** Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology* 22: 439-45.
- Kasap OE a Alten B, 2005.** Laboratory estimation of degree-day developmental requirements of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Vector Ecology* 30: 328-33.
- Kubi C, van den Abbeele J, R DED, Marcotty T, Dorny P, van den Bossche P, 2006.** The effect of starvation on the susceptibility of teneral and non-teneral tsetse flies to trypanosome infection. *Medical and Veterinary Entomology* 20: 388-92.
- Lainson R, Ward RD, Shaw JJ, 1977.** *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 199: 309-20.
- Lau YS, Sulaiman S, Othman H, 2011.** The effectiveness of Trypsin Modulating Oostatic Factor (TMOF) and combination of TMOF with *Bacillus thuringiensis* against *Aedes aegypti* larvae in the laboratory. *Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases* 5: 13-19.
- Leaney AJ, 1977.** The effect of temperature on *Leishmania* in sandflies. *Parasitology* 75: 28-29.
- Lehane MJ, 1994.** Digestive enzymes, haemolysins and symbionts in the search for vaccines against blood-sucking insects. *International Journal for Parasitology* 24: 27-32.
- Lehane MJ, 1997.** Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology* 42: 525-50.
- Mahmood F a Borovsky D, 1992.** Biosynthesis of trypsinlike and chymotrypsinlike enzymes in immature *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 29: 489-95.
- Mahmood F a Borovsky D, 1993.** Biosynthesis of serine proteases in *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 30: 683-8.

- McConville MJ a Ferguson MA, 1993.** The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochemical Journal* 294: 305-24.
- Myskova J, Svobodova M, Beverley SM, Volf P, 2007.** A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes and Infection* 9: 317-324
- Myskova J, Votypka J, Volf P, 2008.** *Leishmania* in sand flies: comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. *Journal of Medical Entomology* 45: 133-8.
- Nauen R, Sorge D, Sterner A, Borovsky D, 2001.** TMOF-like factor controls the biosynthesis of serine proteases in the larval gut of *Heliothis virescens*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47: 169-80.
- Nieves E a Pimenta PF, 2002.** Influence of vertebrate blood meals on the development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67: 640-7.
- Noguera P, Rondon M, Nieves E, 2006.** Effect of blood source on the survival and fecundity of the sandfly *Lutzomyia ovallesi* Ortiz (Diptera: Psychodidae), vector of *Leishmania*. *Biomedica* 26 Suppl 1: 57-63.
- Pimenta PF, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL, 1997.** A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* 115: 359-69.
- Ralton JE, Mullin KA, McConville MJ, 2002.** Intracellular trafficking of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins and free GPIs in *Leishmania mexicana*. *Biochemical Journal* 363: 365-75.
- Ramalho-Ortigao M, Jochim RC, Anderson JM, Lawyer PG, Pham VM, Kamhawi S, Valenzuela JG, 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 JM, Kamhawi S, Rowton ED, Ribeiro JMC, Valenzuela JG, 2003.** Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33: 163-171.
- Ready PD, 1979.** Factors affecting egg production of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 16: 413-23.

- Ready PD a Croset H, 1980.** Diapause and laboratory breeding of *Phlebotomus perniciosus* Newstead and *Phlebotomus ariasi* Tonnoir (Diptera: Psychodidae) from southern France. *Bulletin of Entomological Research* 70: 511-523.
- Rioux JA, Aboulker JP, Lanotte G, Killick-Kendrick R, Martini-Dumas A, 1985.** Ecology of leishmaniasis in the south of France. 21. Influence of temperature on the development of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 in *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Experimental study. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 60: 221-9.
- Rogers ME, Chance ML, Bates PA, 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.
- Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA, 2004.** Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430: 463-7.
- Sacks D a Kamhawi S, 2001.** Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology* 55: 453-83.
- Sacks DL, Modi G, Rowton E, Spath G, Epstein L, Turco SJ, Beverley SM, 2000.** The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proceedings of National Academy of Science USA* 97: 406-11.
- Sadlova J, 1999.** The life history of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta Societate Zoologicae Bohemicae* 63: 331-366.
- Sadlova J, Reishig J, Volf P, 1998.** Prediuresis in female *Phlebotomus sandflies* (Diptera : Psychodidae). *European Journal of Entomology* 95: 643-647.
- Sadlova J a Volf P, 1999.** Occurrence of *Leishmania major* in sandfly urine. *Parasitology* 118: 455-60.
- Sadlova J a Volf P, 2009.** Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. *Cell and Tissue Research* 337: 313-25.
- Sant'Anna MRV, Diaz-Albiter H, Mubaraki M, Dillon RJ, Bates PA, 2009.** Inhibition of trypsin expression in *Lutzomyia longipalpis* using RNAi enhances the survival of *Leishmania*. *Parasites & Vectors* 2: 62.
- Sant'Anna MRV, Nascimento A, Alexander B, Dilger E, Cavalcante RR, Diaz-Albiter HM, Bates PA, Dillon RJ, 2010.** Chicken blood provides a suitable meal for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* and does not inhibit *Leishmania* development in the gut. *Parasites & Vectors* 3: 11.

- Secundino N, Kimblin N, Peters NC, Lawyer P, Capul AA, Beverley SM, Turco SJ, Sacks D, 2010.** Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. *Cellular Microbiology* 12: 906-18.
- Shakarian AM a Dwyer DM, 1998.** The Ld Cht1 gene encodes the secretory chitinase of the human pathogen *Leishmania donovani*. *Gene* 208: 315-22.
- Shakarian AM a Dwyer DM, 2000.** Pathogenic *Leishmania* secrete antigenically related chitinases which are encoded by a highly conserved gene locus. *Experimental Parasitology* 94: 238-42.
- Shen HY, Brandt A, Witting-Bissinger BE, Gunnoe TB, Roe RM, 2009.** Novel insecticide polymer chemistry to reduce the enzymatic digestion of a protein pesticide, trypsin modulating oostatic factor (TMOF). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 93: 144-152.
- Schlein Y a Jacobson RL, 1994.** Some sandfly food is a *Leishmania* poison. *Bulletin of the Society of Vector Ecology* 19: 82-86.
- Schlein Y a Jacobson RL, 1998.** Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal. *Parasitology* 117: 467-73.
- Schlein Y, Jacobson RL, Messer G, 1992.** *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proceedings of National Academy of Science USA* 89: 9944-8.
- Schlein Y, Jacobson RL, Shlomai J, 1991.** Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 245: 121-6.
- Schlein Y a Romano H, 1986.** *Leishmania major* and *L. donovani*: effects on proteolytic enzymes of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae). *Experimental Parasitology* 62: 376-80.
- Schlein Y, Warburg A, Schnur LF, Shlomai J, 1983.** Vector compatibility of *Phlebotomus papatasi* dependent on differentially induced digestion. *Acta Tropica* 40: 65-70.
- Svarovska A, 2006.** Střevní proteázy flebotomů, proteázové inhibitory leishmanií a jejich vliv na vývoj v přenašeči, Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, katedra parazitologie, 71 str.
- Svarovska A, Ant TH, Seblova V, Jecna L, Beverley SM, Volf P, 2010.** *Leishmania major* glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2-) but not lipophosphoglycan

(lpg1-) for survival in permissive sand fly vectors. PLoS Neglected Tropical Diseases 4: e580.

Telleria EL, de Araujo AP, Secundino NF, d'Avila-Levy CM, Traub-Cseko YM, 2010. Trypsin-like serine proteases in *Lutzomyia longipalpis*--expression, activity and possible modulation by *Leishmania infantum chagasi*. PLoS One 5: e10697.

Telleria EL, Pitaluga AN, Ortigao-Farias JR, de Araujo AP, Ramalho-Ortigao JM, Traub-Cseko YM, 2007. Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Lutzomyia longipalpis*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 66: 53-63.

Theodor O, 1936. On the relation of *Phlebotomus papatasi* to the temperature and humidity of environment. Bulletin of Entomological Research 27: 653-671.

Vaidyanathan R, 2004. *Leishmania* parasites (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) reversibly inhibit visceral muscle contractions in hemimetabolous and holometabolous insects. Journal of Invertebrate Pathology 87: 123-8.

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: 142-52.

Volf P, Hajmova M, Sadlova J, Votypka J, 2004. Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. International Journal for Parasitology 34: 1221-7.

Volf P a Myskova J, 2007. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. Trends in Parasitology 23: 91-2.

Volf P a Palanova L, 1996. The relationship between protein content of the meal and lectin secretion in the midgut of *Phlebotomus duboscqi*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 90: 567-570

Volf P, Svobodova M, Dvorakova E, 2001. Bloodmeal digestion and *Leishmania major* infections in *Phlebotomus duboscqi*: effect of carbohydrates inhibiting midgut lectin activity. Medical and Veterinary Entomology 15: 281-6.

Volf P a Volfova V, 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. Journal of Vector Ecology 36 Suppl 1: S1-9.

Walshe DP, Lehane MJ, Haines LR, 2009. Post eclosion age predicts the prevalence of midgut trypanosome infections in *Glossina*. Plos One 6: e26984.

Ward RD, 1977. The colonization of *Lutzomyia flaviscutellata* (Diptera: Psychodidae), a vector of *Leishmania mexicana amazonensis* in Brazil. *Journal of Medical Entomology* 14: 469-76.

Welburn SC a Maudlin I, 1992. The nature of the teneral state in *Glossina* and its role in the acquisition of trypanosome infection in tsetse. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 86: 52