

**M A S A R Y K O V A  
U N I V E R Z I T A**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Vliv časně imunitní  
odpovědi u myši  
opakovaně pobodaných  
flebotomy na průběh  
kožní leishmaniózy**

Diplomová práce

**KAROLÍNA POLÁKOVÁ**

Vedoucí práce: doc. RNDr. Andrea Bardůnek  
Valigurová, Ph.D.

Ústav botaniky a zoologie  
Program Zoologie

Brno 2022



**MUNI**  
**SCI**

## Bibliografický záznam

<b>Autor:</b>	Karolína Poláková Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita Ústav botaniky a zoologie
<b>Název práce:</b>	Vliv časné imunitní odpovědi u myší opakovaně pobodaných flebotomy na průběh kožní leishmaniózy
<b>Studijní program:</b>	Zoologie
<b>Vedoucí práce:</b>	doc. RNDr. Andrea Bardůnek Valigurová, Ph.D.
<b>Rok:</b>	2022
<b>Počet stran:</b>	96
<b>Klíčová slova:</b>	Leishmania, kožní leishmanióza, flebotomus, imunitní reakce, vektor, parazit, hostitel, imunohistochemie, histopatologie

## Bibliographic record

**Author:** Karolína Poláková  
Faculty of Science  
Masaryk University  
Department of Botany and Zoology

**Title of Thesis:** The effect of the early immune events of the mice repeatedly bitten by sand flies on the course of cutaneous leishmaniosis

**Degree Programme:** Zoology

**Supervisor:** doc. RNDr. Andrea Bardůnek Valigurová, Ph.D.

**Year:** 2022

**Number of Pages:** 96

**Keywords:** Leishmania, cutaneous leishmaniosis, sand fly, immunity response, vector, parasite, host, immunohistochemistry, histopathology

## Abstrakt

Leishmanióza je veterinárně a medicínsky významné onemocnění způsobené parazitickými prvky rodu *Leishmania*. Životní cyklus těchto parazitů zahrnuje obratlovčího hostitele (včetně člověka) a hmyzího vektora, jimiž jsou samice flebotomů (Diptera: Phlebotominae). Je známo, že během sání krve jsou vektorem do těla hostitele injikovány sliny s imunomodulačním účinkem, který zásadním způsobem ovlivňuje průběh leishmaniové infekce. Právě opakovaná imunizace hostitele slinami nenakažených flebotomů se stala v nedávné době fenoménem, uplatňujícím se při vývoji vakcíny proti leishmanióze. Cílem této diplomové práce je porovnání charakteru imunitní odpovědi proti slinám flebotomů u myší opakovaně pobodaných v oblasti ušního boltce a vyhodnocení vývoje infekce související s histopatologickými změnami po experimentální inokulaci myší původcem kožní leishmaniózy (*Leishmania major*). Nedílnou součástí pokusů bylo navrhnout protokol pro šetrnou fixaci a histologické zpracování ušního boltce, který by umožňoval zachovat tkáň a buňky v jejich přirozené podobě pro histopatologické hodnocení a zároveň v maximálně možné míře zachovat antigenicitu tkáňe pro imunohistochemické analýzy. Metodická část práce zahrnující podrobný popis použitých protokolů bude sloužit jako laboratorní manuál pro další studie. Rešeršní část shrnuje současné poznatky týkající se řešené problematiky.

## Abstract

Leishmaniasis is a veterinary and medically important disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. The life cycle of these parasites includes a vertebrate host (including humans) and an insect vector – the females of sand flies (Diptera: Phlebotominae). Recent studies have shown that during blood feeding vector injects saliva with an immunomodulatory effect into the host's body that significantly affects the course of leishmania infection. Repeated immunization of the host with non-infected sand flies' saliva has recently become a phenomenon applicable in the development of a leishmaniasis vaccine. The aim of this diploma thesis is to determine the character of the host immune response against vector's saliva in mice repeatedly bitten in the ear pinnae, and to compare the development of leishmania infection and related histopathological changes after experimental inoculation of mice with *Leishmania major*. An integral part of the experiments was to design a protocol for gentle fixation and histological processing of the ear pinnae allowing the simultaneous preservation of tissues and cells in their natural form for histopathological evaluation and tissue antigenicity for immunohistochemical analyses. The methodical part, including a detailed description of the protocols used, will serve as a laboratory manual for further studies. The literature review summarizes the recent knowledge on the thesis topic.





ZADÁNÍ  
DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2021/2022

Ústav:	Ústav botaniky a zoologie
Studentka:	Bc. Karolína Poláková
Program:	Zoologie
Specializace:	Zoologie

Ředitel ústavu PFF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce:	Vliv časně imunitní odpovědi u myši opakovaně pobodaných flebotomy na průběh kožní leishmaniózy
Název práce anglicky:	The effect of the early immune events of the mice repeatedly bitten by sand flies on the course of cutaneous leishmaniasis
Jazyk závěrečné práce:	čeština

**Oficiální zadání:**

Leishmanióza je významné onemocnění člověka způsobené jednobuněčnými parazity rodu *Leishmania* (Kinetoplastea: Trypanosomatida), kteří jsou přenášeni krevsajícím hmyzem z podčeledi Phlebotominae. Je známo, že během sání krve jsou samicemi flebotomů do těla hostitele injikovány sliny s imunomodulačním účinkem, který zásadním způsobem ovlivňuje průběh leishmaniové infekce. Opakovaná imunizace hostitele slinami nenakažených flebotomů jej pak může chránit před závažnými projevy infekce, což je fenomén uplatňující se při vývoji vakcíny proti leishmanióze. Zadaná diplomová práce je součástí rozsáhlejší studie dvou týmů (A. Bardůnek Valigurová MU Brno, I. Kolářová UK Praha), která pomůže lépe pochopit charakter imunitní odpovědi hostitele proti slinám flebotomů ve vztahu k leishmanióze. Získané poznatky mohou najít uplatnění při zavádění účinnějších ochranných opatření v ohniscích leishmaniózy. Cíle práce: 1. Osvojit si a standardizovat metodické postupy vhodné pro histopatologické a (imuno)histochemické analýzy se zaměřením na ušní boltce myši. Příprava laboratorního manuálu. 2. Mikroskopická analýza imunitní reakce u myši opakovaně pobodaných vybraným druhem flebotoma v oblasti ušního boltce. 3. Určit histopatologické změny a vliv reakce u opakovaně pobodaných myši na vývoj leishmaniové infekce po experimentální inokulaci druhem *Leishmania major*. Literatura: 1. Humason, G. L. (1967). *Animal tissue techniques* (2nd ed.). San Francisco and London: W.H. Freeman and Company. 2. Burry, R.W. (2010). *Immunocytochemistry: A practical guide for biomedical research*. Springer. 3. Boulanger N. (2018). *Skin and Arthropod vectors*. Elsevier, Academic Press. 4. Bruschi F., Gradoni L. (2018). *The leishmaniasis: Old neglected tropical diseases*. Springer International Publishing. 5. Gillespie S.H., Pearson R.D. (2001). *Principles and practice of clinical parasitology*. John Wiley & Sons. 6. Lamb T. (2012). *Immunity to parasitic infection*. John Wiley & Sons.

Vedoucí práce:	doc. RNDr. Andrea Bardůnek Valigurová, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Iveta Hodová, Ph.D.
Datum zadání práce:	15. 9. 2020
V Brně dne:	3. 5. 2022

Zadání bylo schváleno prostřednictvím IS MU.

Bc. Karolína Poláková, 13. 11. 2020  
doc. RNDr. Andrea Bardůnek Valigurová, Ph.D., 16. 10. 2020  
prof. RNDr. Michal Horsák, Ph.D., 19. 11. 2020



## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Brně 4. května 2022

.....  
Karolína Poláková



## Poděkování

Největší poděkování patří mé vedoucí doc. RNDr. Andree Bardůnek Valigurové, Ph.D. a konzultantce RNDr. Ivě Kolářové, Ph.D. za ochotu, trpělivost, a hlavně možnost stát se členem jejich výzkumného týmu. Přes všechny překážky vynaložily veškeré úsilí a umožnily tak vznik této práce. Doktorce Kolářové tímto děkuji za seznámení se zajímavou problematikou tohoto tématu, odborné znalosti a zejména poskytnutí laboratorního materiálu, bez kterého by tato práce neměla možnost vzniknout. V neposlední řadě bych tímto ráda poděkovala i Mgr. Ivetě Hodové, Ph.D. za její pomoc a konzultace napříč celým mým studiem. Mé díky patří spolužačce a kamarádce Katce Hartmanové za maximální psychickou podporu, kterou mi po celou dobu studia poskytovala. V neposlední řadě děkuji mému partnerovi, rodině a přátelům, kteří mi vždy byli a jsou silnou oporou.



## Obsah

<b>Seznam pojmů a zkratk</b>	<b>15</b>
<b>1 Úvod</b>	<b>16</b>
<b>2 Přehled literatury</b>	<b>18</b>
2.1 Obecná charakteristika parazitů rodu <i>Leishmania</i> .....	18
2.2 Obecná charakteristika hmyzích vektorů přenášejících leishmaniózu .....	25
2.3 Charakteristika hostitele a jeho imunita.....	29
2.4 Interakce mezi jednotlivými činiteli .....	32
2.5 Cíle práce a odůvodnění řešené problematiky .....	37
<b>3 Materiál a metodika</b>	<b>39</b>
3.1 Popis pokusů.....	39
3.2 Příprava použitých roztoků .....	43
3.3 Dekalcifikace .....	44
3.4 Zalití vzorků do parafínu (dle Valigurová 2007) .....	45
3.5 Montování bločků, krájení, výroba preparátů .....	46
3.6 Deparafinizace řezů a histologické barvení.....	46
3.7 Deparafinizace a imunohistochemické barvení pro konfokální mikroskopii	49
<b>4 Výsledky</b>	<b>52</b>
4.1 Výběr vhodné kombinace fixáže a délky dekalifikace .....	52
4.2 Výběr vhodné fixáže pro souběžné histopatologické a imunohistochemické analýzy, a testování vlivu slin flebotoma na přítomnost imunitních složek v místě sání v závislosti na časovém odstupu mezi posledním sáním a odběrem tkáně .....	57

4.3	Testování průběhu infekce druhem <i>Leishmania major</i> u myši infikovaných 48 hodin nebo 1 týden po posledním sání .....	66
<b>5</b>	<b>Diskuse</b>	<b>78</b>
5.1	Zhodnocení použitých metodických postupů .....	78
5.2	Imunomodulační vliv slin flebotoma na rozvoj kožní leishmaniózy.....	82
<b>6</b>	<b>Závěr</b>	<b>85</b>
	<b>Použité zdroje</b>	<b>87</b>



## Seznam pojmů a zkratk

WHO	- World health organization (Světová zdravotnická organizace)
PKDL	- post-kala-azar dermální leishmanióza
PRR	- pattern-recognition receptor (receptory pro rozpoznání primitivních vzorů)
PAMP	- pathogen-associated molecular pattern (patogen-asociované molekulární vzory)
CPV	- cytoplazmatická polyedróa
IFN	- interferon
IL	- interleukin
TNF	- tumor nekrotizující faktor
iNOS	- inducibilní syntáza oxidu dusnatého
IgG	- imunoglobulin G
DTH	- delayed type hypersensitivity (pozdní hypersenzitivní reakce)
LPG	- lipofosfoglykan
PSG	- promastigoty produkovaný sekret
fPPG	- filamentózní proteofosfoglykan promastigotů
IHC	- imunohistochemie
EDTA	- etyléndiamintetraoctové kyseliny
PFA	- paraformaldehyd

## 1 Úvod

Parazitičtí prvoci rodu *Leishmania* patří mezi medicínsky i veterinárně významné parazity vyskytující se napříč několika kontinenty. Leishmanióza, kterou tyto parazité svým hostitelům způsobují, ohrožuje až 350 milionů obyvatel ročně s potenciální úmrtností až 70 tisíc. Formy tohoto onemocnění se liší v závažnosti od poměrně snadno léčitelných kožních lézí po život ohrožující viscerální formu napadající vnitřní orgány. Průběh nemoci závisí zejména na druhu parazita a imunitní odpovědi hostitele.

Životní cyklus leishmanií zahrnuje obratlovčího hostitele a hematofágní hmyz. Hlavními vektory přenášejícími toto onemocnění jsou samičky z podčeledi Phlebotominae (Diptera), které leishmanie přijmou s krví při sání na infikovaném hostiteli. Úspěšnost infekce souvisí se schopností leishmanií manipulovat vektorem i imunitním systémem hostitele ve svůj prospěch. K ovlivnění interakce mezi parazitem a hostitelem dochází nejen prostřednictvím povrchových molekul leishmanií, ale také slinami flebotomů, které jsou spolu s leishmaniemi inokulovány do kůže obratlovčího hostitele. Slinné žlázy vektora obsahují mimo antihemostatické a vazodilatační složky i složky s imunomodulačními účinky, které hrají významnou roli při přenosu parazitů a rozvoji leishmaniózy. Schopnost slin vektora snižovat virulenci leishmanií na základě dřívějšího kontaktu hostitele s vektorem byla v anglické literatuře popsána jako tzv. „enhancing-effect“. Četné studie navíc prokázaly, že u opakovaně pobodaných hostitelů vyvolávají sliny flebotomů imunitní reakci, která znesnadňuje nebo dokonce znemožňuje uchycení leishmanií v hostiteli.

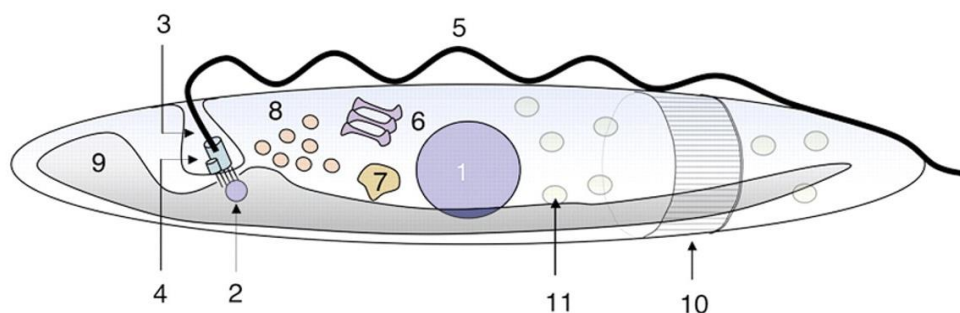
Hlavním důvodem pro zkoumání této problematiky je předpoklad, že jedním z důležitých faktorů ovlivňujících průběh leishmaniové infekce je načasování senzitivace hostitele slinami vektora. V rámci spolupráce dvou výzkumných týmů (UK Praha a MU Brno) se tato diplomová práce zaměřuje na pochopení charakteru imunitní reakce hostitele proti slinám flebotomů ve vztahu ke kožní leishmanióze na základě simulace situací v endemických oblastech, kdy je senzitivovaný hostitel znovu vystaven sání vektora 48 hodin nebo 1 týden před přenosem leishmaniové

infekce. Provedené pokusy, vyhodnocené mikroskopicky v této práci, slouží zejména pro standardizaci metod s cílem optimalizovat postupy a zpracování tkání pro efektivnější a úspornější využití laboratorních zvířat v rámci širšího spektra analýz. Součástí metodické části této práce je zároveň laboratorní manuál standardizující použité histopatologické a imunohistochemické postupy. Získané poznatky mohou sloužit jako základ pro plánování účinnějších kontrolních programů v ohniscích leishmaniózy, včetně vývoje leishmaniové vakcíny založené na slinách vektora.

## 2 Přehled literatury

### 2.1 Obecná charakteristika parazitů rodu *Leishmania*

Rod *Leishmania* spadající do Trypanosomatida Kent 1880 je významným řádem Kinetoplastea Honigberg 1963, spadajícím do kmene Euglenozoa Cavalier-Smith 1981 (Ghedini et al., 2004). Všechny známé druhy trypanosom jsou parazitičtí prvoci hmyzu, obratlovců nebo rostlin (Kaufer et al., 2017). Životní cykly zástupců této rozmanité skupiny jsou převážně monoxenní (tj. jednohostitelské), avšak původci závažných onemocnění, jako například zástupci rodu *Leishmania* nebo *Trypanosoma*, mají dixenní vývojové cykly (tj. dvouhostitelské) (Kaufer et al., 2020). Buňky těchto parazitů (obr. 1) se vyznačují charakteristickou morfologií a jejich tvar nabývá různých tvarů, od zavalité podoby po štíhlé, protáhlé buňky vyznačující se aktivním krouživým pohybem zajištěným jediným bičíkem, který volně vychází z malé úzké periflagelární kapsy nebo je pevně přichycen k povrchu těla a vytváří tak undulující membránu (Lom a Dyková, 1992; Varga et al., 2017). Na ultrastrukturální úrovni je hlavním rysem této skupiny kinetoplast, organela vznikající z části mitochondrie a obsahující mnoho molekul kruhové DNA (Grimstone, 1961; Yurchenko a Kolesnikov, 2001).

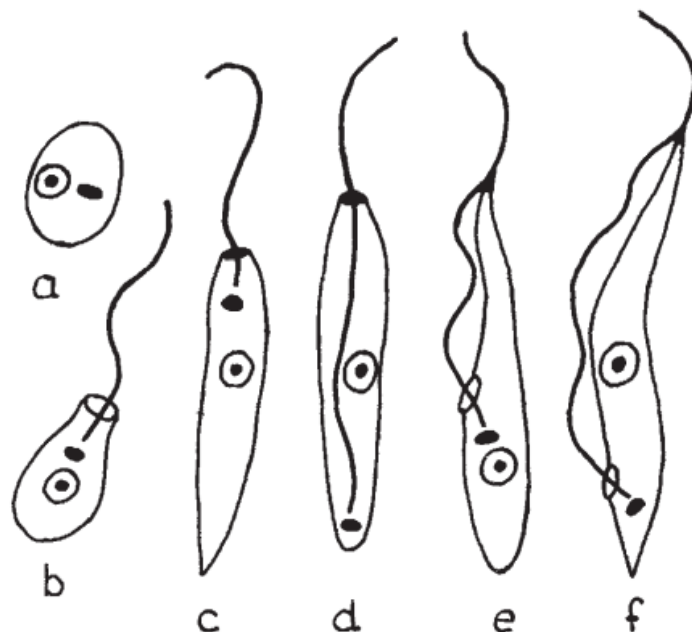


- |    |                      |     |                         |
|----|----------------------|-----|-------------------------|
| 1. | Jádro                | 7.  | Lysozom                 |
| 2. | Kinetoplast          | 8.  | Endozom                 |
| 3. | Periflagelární kapsa | 9.  | Mitochondrie            |
| 4. | Bazální tělísko      | 10. | Mikrotubuly cytoskeletu |
| 5. | Bičík                | 11. | Glykozomy               |
| 6. | Golgiho aparát       |     |                         |

**Obrázek 1.** Zjednodušená stavba buňky trypanosomu (převzato a upraveno podle Matthews 2005).

Součástí buněk trypanosom, podobně jako u ostatních kinetoplastida jsou tzv. glykozomy, nenápadné váčky uložené v cytoplasmě. Glykozomy jsou membránou ohraničené organely obsahující glykolytické enzymy, které se účastní mnoha procesů v buňce např. glykolýzy, odstranění purinů, beta oxidace mastných kyselin apod. (Scott a Still, 1968; Michels et al., 2000). Typicky je v buňkách přítomen Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum a také jedno, obvykle centrálně umístěné jádro s jadérkem.

Dalším charakteristickým znakem trypanosom je polymorfie (obr. 2), tedy schopnost měnit buněčnou morfologii během životního cyklu na základě čehož rozeznáváme několik morfologických forem, které se liší polohou kinetoplastu, délkou bičíku nebo přítomností undulující membrány.



**Obrázek 2.** Životní stádia trypanosomatid: **a** – amastigot, **b** – choanomastigot, **c** – promastigot, **d** – opisthomastigot, **e** – epimastigot, **f** – trypomastigot (převzato z Hoare a Wallace 1966).

Amastigot je kulatá forma s velmi krátkým bičíkem nevyčnívajícím z periflagelární kapsy. Podlouhlá buňka s bazálním tělískem a kinetoplastem umístěným na zadním konci buňky za jádrem se nazývá trypomastigot. Bičík trypomastigota vychází z velmi krátké periflagelární kapsy a vede podél celé buňky, se kterou je spojen undulující membránou (konec bičíku může, ale nemusí být

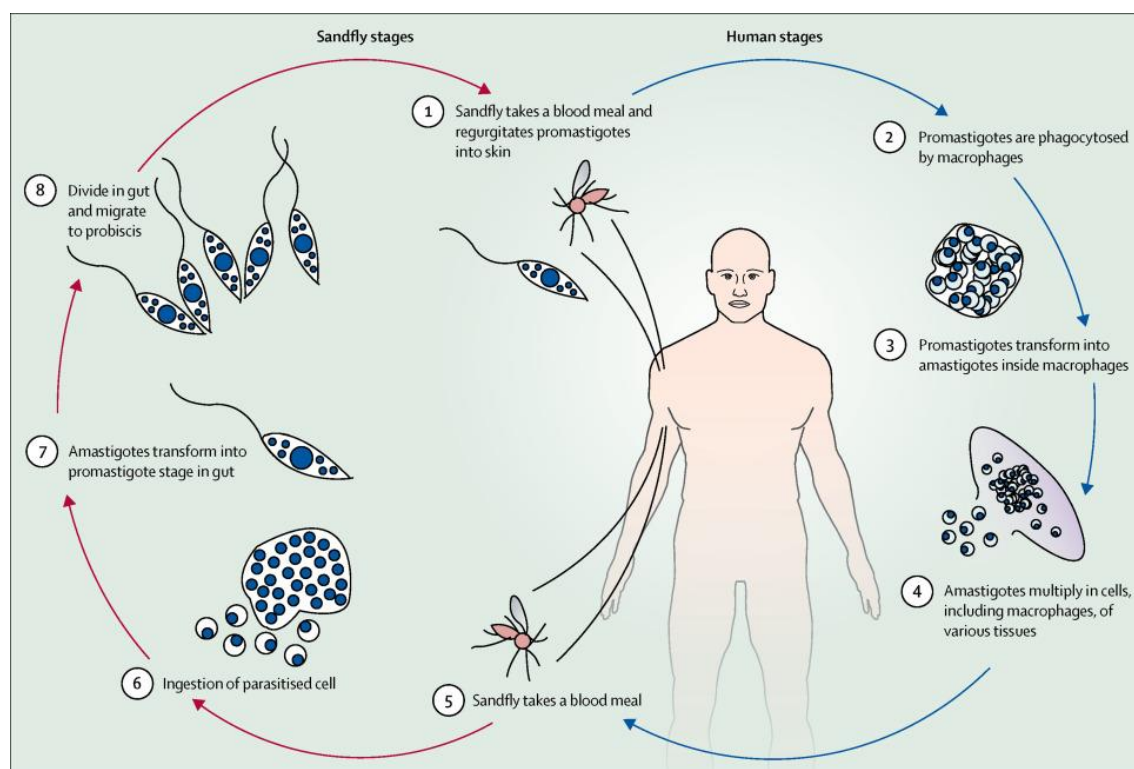
volný). Ve štíhlé buňce promastigota, s bičíkem vycházejícím z přední části buňky, je kinetoplast umístěn v blízkosti předního konce buňky, daleko od jádra. Epimastigot představuje tenkou, štíhlou životní formu trypanosom, ve které je bazální tělísko a kinetoplast umístěno v bezprostřední blízkosti jádra. Bičík epimastigota vychází z úzké periflagelární kapsy ve středu buňky a obvykle tvoří krátkou zvlněnou membránu, než se stane volným. Opistomastigot je stádium charakteristické bičíkem, táhnoucím se podél celé délky buňky ve velmi dlouhé periflagelární liště, vyčnívajícím pouze z předního konce buňky. Posledním stádiem je choanomastigot, pro kterého je typický límcový okraj periflagelární kapsy (Kaufer et al., 2017).

Mezi významné rody kinetoplastid patří parazitičtí i volně žijící *Bodonida* Hollande, 1952 a výhradně parazitičtí *Trypanosomatida* Kent, 1880. Zástupci rodu *Bodo* disponují dvěma bičíky, které používají k lokomoci a dokážou přežít v místech s nižším obsahem kyslíku. Trypanozomy jsou původci závažných lidských i dobytčích onemocnění a jsou proto medicínsky i veterinárně významným parazitickým druhem. Mezi trypanozomy mimo jiné řadíme i zástupce rodu *Leishmania* s dvouhostitelským vývojovým cyklem, kterým se věnuje tato diplomová práce.

Rod *Leishmania* zahrnuje několik druhů parazitů obratlovců včetně člověka a patří do jednoho ze dvou podrodů: *Leishmania* a *Viannia*, jejichž taxonomický rozdíl je založen na místě vývoje a připojení promastigotů ke stěně střeva flebotoma (Lainson a Shaw, 1987). Tito parazité jsou přenášeni krevsajícím hmyzem rodu *Phlebotomus* ve Starém Světě (Afrika, Asie, Evropa) a *Lutzomyia* v Novém světě (Severní a Jižní Amerika). Během životního cyklu procházejí leishmanie různými morfologickými změnami. Všechny druhy leishmanií se množí v buňkách mononukleárního fagocytárního systému. V těle obratlovců se nachází ve formě obligátně intracelulárních amastigotů napadající monocyty a makrofágy, zatímco ve střevě hmyzího přenašeče se vyskytují jako extracelulární pohybliví promastigoti.

### 2.1.1 Životní cyklus leishmanií

Životní cyklus leishmanií zahrnuje fázi vývoje parazita v obratlovčím hostiteli a fázi v hmyzím přenašeči, přičemž se uplatňují dvě základní formy parazita – promastigoti a amastigoti (obr. 3).



**Obrázek 3.** Životní cyklus leishmanií (převzato z Reithinger et al., 2007). **1)** Krevní síť flebotoma a inokulace promastigotů do kůže. **2)** Promastigoti jsou fagocytováni makrofágy. **3)** Transformace promastigotů na amastigoty uvnitř makrofágů. **4)** Amastigoti se množí uvnitř makrofágů v různých tkáních. **5)** Krevní síť flebotomem. **6)** Požití parazitované buňky. **7)** Amastigoti se transformují uvnitř střeva flebotoma na promastigoty. **8)** Dělení parazitů uvnitř střeva a migrace do proboscis.

Samičky flebotomů nasají nepohyblivé amastigoty během krevního sání na obratlovčím hostiteli. V trávicím traktu flebotoma dochází k poměrně složitému vývoji parazita, doprovázenému nejen funkčními ale i morfologickými změnami, jehož výsledkem je vznik metacyklických stádií, která jsou při dalším sání schopna infikovat dalšího hostitele (Rogers et al., 2002; Stuart et al., 2008). Morfologické změny jsou doprovázeny molekulárními modifikacemi. Například změny na

povrchu parazita umožňují interakci se střevem hmyzu, což je základní krok pro přežití parazita, vývoj a následnou infekčnost vůči obratlovčímu hostiteli (Bates 2008). Lainson a Shaw (1987) dělí leishmanie dle způsobu vývoje ve střevě flebotomů na tři skupiny: hypopylaria, peripylaria a suprapylaria. Skupina hypopylaria je charakteristická vývojem v zadní části střeva, přičemž hostitelem jsou plazi, jenž se infikují pozřením infikovaného vektora. Zástupci skupiny peripylaria, s převážně savčím hostitelem, se v počáteční fázi infekce vyvíjí v zadní části střeva flebotomů a později dochází k migraci do ostatních částí střeva. Vývoj skupiny suprapylaria probíhá ve střední a přední části střeva přenašeče a spolu se skupinou peripylaria jsou do těla obratlovčího hostitele přenášeni inokulativně během sání flebotomů (Rogers et al., 2002; Gossage et al., 2003). Infekce savců začíná, když jsou metacyklická, extracelulární stádia promastigotů, injikována do dermis hostitele během krevního sání. Parazité sídlící za stomodeální chlopní (spojení mezi předním střevem a předžaludkem) jsou regurgitováni zpětným tokem požitá krve (Rogers et al., 2004). Zároveň se do těla hostitele dostávají i sliny flebotomů, které mají hemostatické a imunomodulační účinky a hrají významnou roli v nákaze hostitele (Killick-Kendrick et al., 1996; Rohoušová a Volf 2006). Do místa inokulace parazita jako první migrují neutrofilové a poskytují tak leishmaniím možnost dočasného úkrytu před imunitní odpovědí hostitele (Beil et al., 1992; Peters et al., 2008). Ačkoliv se neutrofilové účastní se prvních fází infekce vyznačují krátkou životností (6-12 hodin), u infekce *L. major* byla popsána schopnost těchto parazitů oddálit apoptózu lidských neutrofilů až na 42 hodin. Infikované neutrofilové jsou stimulovány ke zvýšené produkci chemokinu MIP-1 $\beta$ , který představuje známý chemoatraktant atrahující monocyty do místa infekce (van Zandbergen et al., 2004). Apoptotizující neutrofilové jsou pak rychle pohlceny makrofágy, čímž se leishmanie dostanou do cílové hostitelské buňky. Nákaza skrze neutrofilové zajišťuje, že nedochází k přímému kontaktu leishmanií s receptory makrofágů, čímž nedochází ke spuštění efektorových mechanismů (van Zandbergen et al., 2004). Alternativní cestou, jakou se mohou parazité do makrofágu dostat, je únik z neutrofilů podléhajících apoptóze a s tím související následné pohlcení makrofágy (Peters et al., 2008). Promastigoti invadují makrofágy a dochází k tvorbě parazitoforní



vakuoly, uvnitř které se promastigoti transformují na amastigoty, aktivně se množí binárním dělením. Parazit inhibuje oxidativní vzplanutí (tvorba reaktivních kyslíkových radikálů přes enzym NADPH-oxidázu), které mu umožní přežití v makrofágu. Fúze s lysozomem proběhne normálně a parazit přežívá ve fagolysozomu, transformuje se a množí se. Poškození parazita lysozomálními enzymy brání povrchové molekuly buňky metacyklických promastigotů (lipofosfoglykan a protein gp63), které interferují s funkcí hostitelských enzymů. Proliferace parazitů vede k prasknutí makrofágů a uvolnění parazitů do okolí. Volní amastigoti interagují s jinými makrofágy nebo se šíří oběhovou či lymfatickou soustavou a infikují orgány bohaté na tyto imunitní buňky (játra, slezina nebo kostní dřeň) (Kaye a Scott, 2011; Berenguer, 2021). Leishmanie jsou schopny infikovat kromě fagocytů i jiné buňky, například fibroblasty, v nichž se ale nemohou množit.

### 2.1.2 Leishmanióza a její klinické příznaky

Nejméně 20 druhů rodu *Leishmania* způsobuje různě závažné onemocnění zvané leishmanióza. Toto onemocnění se vyskytuje v tropech a subtropích napříč Asií, Afrikou, Amerikou a v oblasti Středomoří. Každoroční výskyt je 1,5-2 miliony případů, 350 milionů obyvatel je vystaveno riziku nákazy a ročně způsobí toto onemocnění 70 tisíc úmrtí (Reithinger et al., 2007; Bravo a Sanchez, 2003). Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je leishmanióza jedním ze sedmi nejvýznamnějších tropických onemocnění a představuje závažný zdravotní problém, projevující se širokým spektrem klinických projevů s potenciálně smrtelnými následky (Vera-Izaguirre et al., 2006). Stupeň závažnosti se odvíjí od druhu leishmanie a imunitní odpovědi hostitele (Andrade-Narváez et al., 2001). Leishmaniózy lze dle klinických projevů rozdělit na tři hlavní formy: kožní (kutánní), kožně slizniční (muko-kutánní) a útrobní (viscerální) (WHO 2022).

Kožní leishmanióza není život ohrožující a většinou se projevuje výskytem vředů (lézí) na exponovaných částech těla, tedy na končetinách a obličeji. Podle WHO ročně postihuje 700 tisíc až 1 milion obyvatel. Léze mohou mít různou podobu od nehnisajících a hnisajících vředů, přes erytématózní ložiska, až po léze pokryté strupem. Pokud nedochází k sekundárním infekcím, nebolestivé vředy se často

spontánně vyhojí během 3-18 měsíců, ale mohou zanechat jizvy. V závislosti na druhu parazita, však může až 10 % kožní leishmaniózy postupovat k závažnějším projevům, zejména mukokutánní leishmanióze, diseminované kožní leishmanióze nebo leishmanióze recidivans, které korelují se základním spektrem imunitních odpovědí hostitele. Kožní leishmanióza může také u pacientů s oslabenou buněčnou imunitou probíhat tzv. difúzní formou (Markle a Makhoul, 2004; Akilov et al., 2007).

U difúzní kožní leishmaniózy se kožní ložiska plošně šíří po celém těle a v tomto případě nedochází ke spontánnímu vyhojení lézí, dokonce může docházet k recidivám. Dermis pacientů je typicky silně infiltrovaná parazity. Diseminovaná kožní leishmanióza je definovaná lézemi smíšeného typu, umístěnými na dvou nebo více částech těla. Histologicky se v lézích nachází velmi málo parazitů a na rozdíl od běžné kožní leishmaniózy se vyznačuje lézemi s nejasným ohraničením (Convit et al., 1972; Bittencourt et al., 1996). Turetz et al. 2002 dále zaznamenali hlavní rozdíly mezi diseminovanou a difúzní formou kožní leishmaniózy v přítomnosti neulcerativních nodulárních lézí, špatnou reakcí T-buněk na antigen parazita a vysokým počtem fagocytovaných leishmanií v makrofázích nacházejících se u difúzní formy, ale ne formy diseminované. Imunosuprese je rizikovým faktorem pro difúzní i diseminované kožní leishmaniózy (van Griensven et al., 2014).

Leishmanióza recidivans, nazývaná také recidivující nebo lupoidní leishmanióza, způsobená např. druhem *L. tropica*, je chronický projev s pomalu se zvětšujícími nebo šířícími se lézemi, které se hojí centrálně, ale nadále rostou jako uzlíky, které ulcerují, hojí se a znovu se objevují (Dassoni et al., 2017; Gitari et al., 2018).

K nejčastějším původcům kožní leishmaniózy ve Starém Světě patří *L. major*, *L. tropica* a *L. aethiopica*, v Novém světě potom *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, a další druhy, včetně *L. infantum chagasi*, která však častěji způsobuje viscerální formu leishmaniózy (Gramiccia a Gradoni, 2005). Přestože se kožní leishmanióza projevuje mírnými příznaky, u 1-10 % pacientů nakažených kmenem *Vianna* (*L. braziliensis*) se vyvine v závažnější mukokutánní formu (David a Craft, 2009).

Mukokutánní leishmanióza je potenciálně život ohrožující onemocnění způsobující masivní znetvoření v důsledku pokročilého stádia destrukce

oronasofaryngeální sliznice a chrupavky, občas ovlivňující hrtan a vedoucí k aspirační pneumonii. Je to způsobeno silnou imunopatologickou odpovědí a obvykle se vyskytuje po zjevném vyřešení kožní infekce a začíná výskytem lézí u nosních děr a rtů a je běžně spojena s nosní kongescí, epistaxí nebo výtokem (Cincurá et al., 2017). Mukokutánní leishmanióza je považována za častější u imunokompromitovaných jedinců (Zijlstra, 2014). Dalšími rizikovými faktory jsou primární léze nad úrovní pasu, mnohočetné nebo velké primární léze nebo opožděné hojení primárních lézí (WHO, 2010).

Viscerální leishmanióza, jinak nazývaná nemoc kala-azar zasahuje játra, slezinu, kostní dřeň a další orgány. Toto neznetvořující onemocnění ohrožuje ročně 400 tisíc obyvatel a s jeho 10 % mortalitou neléčených případů se hned po malárii jedná o druhé nejčastěji smrtelné tropické onemocnění (Mathers et al., 2007; Alvar et al., 2012). Klinický průběh viscerální leishmaniózy je provázen horečnatými záchvaty, ztrátou hmotnosti, zvětšením sleziny a jater (splenomegalie), anemií a pancytopenií, tedy poklesem všech druhů krvinek v periferní krvi (Jhingran et al. 2008). Během léčby nebo několik měsíců po ní se na obličeji a horních končetinách objevuje papulární vyrážka (Rashid et al., 1986). Současně se může objevit přidružené kožní onemocnění označované jako post-kala-azar dermální leishmanióza (PKDL), která je kvůli svým klinickým příznakům často zaměňována s malomocenstvím. Viscerální leishmanióza je obvykle způsobena druhy *L. donovani*, *L. infantum* a *L. chagasi*, jenž je identická s druhem *L. infantum*, vyskytující se v Novém světě (Guerin et al. 2002; Sundar a Rai, 2002).

Průběh a intenzitu onemocnění ovlivňuje zejména počet promastigotů v infekčním inokulu, stav imunity před infekcí, druh parazita, počet a místo bodnutí nebo genetické pozadí hostitele (Griffiths, 1987).

## 2.2 Obecná charakteristika hmyzích vektorů přenášejících leishmaniózu

Hlavními vektory přenášejícími leishmaniózu jsou samičky flebotomů; krevsajícího hmyzu z čeledi Psychodidae, podčeledi Phlebotominae (Diptera). Přibližně 800 druhů flebotomů lze rozdělit do pěti hlavních rodů: *Phlebotomus* (94

druhů), *Sergentomyia* (258 druhů) ve Starém světě a *Lutzomyia* (379 druhů), *Brumptomyia* (23 druhů) a *Warileya* (5 druhů) v Novém světě, z nichž jsou prokazatelní přenašeči medicínsky a veterinárně významných druhů leishmanií zařazeni do rodů *Phlebotomus*, *Sergentomyia* a *Lutzomyia* (Killick-Kendrick, 1999; Sádlová, 1999). Ostatní druhy pravděpodobně nehrají v přenosu leishmaniózy tak významnou roli například z těchto důvodů: tito jedinci nesají krev potenciálních rezervoárových hostitelů, popřípadě nejsou schopni ve svém těle podporovat vývoj leishmanií (Killick-Kendrick, 1999; Munstermann et al. 2004). Méně než 10 % flebotomů bylo označeno jako vektorové druhy lidské leishmaniózy a u pouze 30 druhů byla prokázána vektorová kapacita (Bates, 2007). Každý druh vektora může navíc podporovat vývoj a následně přenášet pouze určitý druh leishmanií (Young a Duncan, 1994). Promastigoti leishmanií jsou přichyceni k epitelu střední části střeva hmyzího hostitele, což je zásadní pro dokončení jejich životního cyklu a zároveň tak nedochází k vyloučení spolu se zbytky strávené krve. Délka těla flebotomů je přibližně 2-3 mm a liší se barvou od stříbrnošedé po černou. Jejich křídla jsou v klidovém stavu složena do charakteristického tvaru písmena V. Zástupci těchto druhů vykazují nocturnální aktivitu a během dne se ukrývají v domech, jeskyních apod. Na rozdíl od komárů se jedná o tiché letce a jejich kousnutí je obvykle bolestivé (Killick-Kendrick, 1999).

Stěžejním faktorem pro přenos nejen leishmanií je vektorová kompetence, tedy schopnost vektora přenášet daného parazita (Volf a Horák, 2007). Na základě dlouhodobých terénních i laboratorních výzkumů a pozorování byla stanovena určitá kritéria vektorové kompetence, která musí zkoumaný druh splňovat, aby mohl být prokazatelným přenašečem (Killick-Kendrick, 1990, 1999; Lawyer a Perkins, 2000; Ready, 2013). Jedním z kritérií je, že výskyt vektora je úzce svázán s výskytem hostitele a je mezi nimi silný ekologický vztah, což v praxi znamená, že je vektor přitahován rezervoárovým hostitelem a běžně na něm saje. Vektor dále musí podporovat vývoj parazita a umožnit jeho přenos do rezervoárového hostitele. V posledních letech dochází především díky rozvoji molekulárních metod k rozvoji hypotéz, že flebotomové nemusejí být jedinými přenašeči leishmaniové infekce.

Zkoumané jsou zejména blechy, klíšťata a típlíci (Paz et al., 2010b; Dougall et al., 2011).

### **2.2.1 Charakteristika imunity vektora a jeho ochrana proti parazitům**

Nespecifická imunita hmyzu je rozdělena na humorální a buněčnou obrannou reakci zajišťující obranu zejména proti mikroorganismům, parazitům a cizorodým částicím (Lavine a Strand, 2002). Integument střeva, produkce různých cytokinů a koagulační reakce hemolymfy představují fyzické bariéry počátečních obranných mechanismů (Lavine a Strand, 2002). Rozpoznání patogenů od vlastních částic organismu zajišťují speciální PRR receptory (Pattern-Recognition Receptor), které se vážou na konzervované molekulové struktury PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) produkované mikroorganismy (Fearon 1997, Lavine a Strand, 2002). Ve většině případů se jedná o komponenty buněčné stěny, jako jsou například lipopolysacharidy, peptidoglykan a beta -1,3- glukany. Po navázání molekul na PAMP na PRR receptory dochází k rozpoznání infekčního organismu a následné buněčné reakci (Aderem a Underhill 1999, Lavine a Strand, 2002). Buněčný imunitní systém hmyzu zabezpečují buňky hemolymfy, které se podílejí na opravných procesech a koagulaci, fagocytóze, nodulaci, enkapsulaci, cytotoxicitě a odvržení transplantátu (Strand 2008). Většina se přirozeně vyskytuje jako odpověď na poranění nebo infekci způsobenou mikroorganismy nebo parazity. Během procesu nodulace i enkapsulace dochází k obklopení cizorodého objektu koagulátem tvořeným velkým množstvím granulocytů, které se stanou adhezivními, navážou se na cíl a utvoří nodula. Celý proces je zakončen melanizací nekrotických granulocytů a koagulátu. Důsledkem úhynu mikroorganismů je nejspíše fyziologický stres, avšak některé z nich mohou v nodulích přežívat, nebo se mohou dokonce nodulaci zcela vyhnout (Turner 1994).

Flebotomové kladou svá vajíčka do půdy, do zvířecích nor nebo do stromových výklenků, kde se larvy následně živí dostupnou organickou hmotou (Killick-Kendrick 1999; Feliciangeli 2004; Ready 2013). Tato strava spolu s enviromentálními mikrobiy dává vzniknout rezidentní mikrobiotě ve střevě larev, jenž přetrvává až do stádia dospělého. Zájem o studium této mikrobioty je

mnohostranný, od získání základních informací o tom, jak vektor reaguje na přítomnost různých mikroorganismů, až po interakce s jinými patogeny, jako jsou například leishmanie. Právě tyto znalosti mohou vést k vývoji nových strategií pro kontrolu šíření nemocí, jako je paratransgeneze. Schopnost flebotomů působit proti mikrobiálním infekcím byla prokázána v mnoha studiích (Boulanger et al. 2004). Následující vybrané studie zmiňují faktory, které ovlivňují vývoj a úspěšnost parazita ve střevě přenašeče.

Studie na *P. papatasi* prokázaly, že homeostáza peritrofické matrix produkovaná buňkami střevního epitelu je zásadní pro úspěch kolonizace parazity. Inhibice tvorby této peritrofické matrix přidáním exogenní chitinázy do sítě krve vedla k ranné mortalitě parazita ve střevě (Pimenta et al., 1997).

Studie Warburg a Ostrovska 1987 ukázala, že odchycená a laboratorně chovaná *P. papatasi* infikovaná virem cytoplazmatické polyedrózy (CPV) byla odolná vůči experimentální infekci *L. major*. CPV způsobuje chronickou patologii ve střední části střeva flebotomů, která je charakterizována strukturálními abnormalitami v epitelu, což narušuje trávení sítě krve. Tyto anomálie střeva mohou bránit přichycení ke zničeným epiteliálním buňkám střeva a také vést k časnému vystavení parazitů trávicímu procesu vektora a imunitním efektorovým molekulám, čímž ovlivňují vývoj parazita (Warburg a Ostrovska, 1987).

Defensiny, kationtové antibakteriální peptidy, byly popsány v tukovém těle a středním střevě. U *P. duboscqi* byl defensin indukován jak bakterií, tak leishmaniovou infekcí a rekombinantní peptid vykazoval významnou antiparazitickou aktivitu proti *L. major in vitro* (Boulanger et al., 2004). Transkripty kódující několik dalších domnělých složek vrozené imunitní reakce byly detekovány ve středním střevě flebotomů. Kromě toho byly také nalezeny homology antioxidantních enzymů, o kterých je známo, že regulují epiteliální imunitu středního střeva a ovlivňují výsledek bakteriálních a parazitárních infekcí u komárů (Jaramillo-Gutierrez et al., 2009; Kumar et al., 2010).

## 2.3 Charakteristika hostitele a jeho imunita

Většinu leishmanióz lze zařadit mezi zoonózy, tedy jsou infekce přirozeně kolující mezi zvířaty, která jsou rezervoárovými hostiteli, avšak jsou přenosné i na člověka. Výjimečně se může jednat o antroponózy, kde je v takovém případě rezervoárovým hostitelem člověk (např. *L. donovani*).

Rezervoároví hostitelé jsou stěžejní pro dokončení životního cyklu mnoha druhů leishmanií. Mezi zdroje lidských leishmanióz patří zejména zoonotické leishmaniózy, v jejichž životních cyklech představují rezervoárové hostitele divoká nebo domácí zvířata, zejména psi a hlodavci, nebo antroponotické leishmaniózy, u nichž figuruje jako rezervoárový hostitel člověk. Psi jsou významným rezervoárem druhů způsobujících viscerální leishmaniózu (*L. infantum* ve Starém Světě a *L. chagasi* v Americe). Hlodavci slouží jako rezervoár pro *L. major* a další druhy, které u lidí většinou způsobují kožní formu onemocnění. V epidemiologii leishmaniózy pak hrají významnější roli zvířata nacházející se v blízkosti člověka. Ačkoliv většina druhů spadá do jedné z těchto kategorií, existují výjimky, u kterých antroponotické druhy způsobují zoonotický přenos. Několik druhů divokých, domestikovaných nebo synantropních savců bylo zaznamenáno jako hostitelé a/ nebo rezervoároví hostitelé leishmanií v odlišných částech světa.

### 2.3.1 Imunitní systém hlodavčího hostitele a vazba imunitní reakce na pohlaví

Jako experimentální model pro výzkum leishmaniózy slouží různé kmeny myší. U většiny myších kmenů nepůsobí infekce *L. major* žádné nebo jen velmi slabé onemocnění. Bylo prokázáno, že imunitní reakce hostitele namířená proti leishmaniím je závislá na genotypu hostitele, tudíž jsou některé inbrední kmeny myší náchylné, zatímco jiné jsou odolné (Awasthi et al., 2004). Odolnost udělují Th1 lymfocyty, zatímco citlivost je udělena lymfocyty skupiny Th2. Th1 a Th2 buňky lze rozlišit podle cytokinů, které vylučují: Th1 buňky vylučují aktivátory buněčně zprostředkované imunity, jako je interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), zatímco Th2 buňky vylučují cytokiny, jako je interleukin 4 (IL-4), které podporují protilátkové reakce. Cytokiny

jsou tkáňové hormony mnoha funkčních a strukturních tříd, umožňující přenos informace mezi buňkami. U většiny kmenů myši (C57BL/6, C3H, CBA) se při infekci *L. major* vyvine spontánně se hojící kožní onemocnění. Pohlcení cizorodých patogenů makrofágy v hostitelském organismu vede v případě účinné obranné reakce k produkci prozánětlivého cytokinu interleukinu 12 (IL-12). Produkci IL-12 makrofágy dochází k diferenciaci prekurzorů Th lymfocytů na podtyp Th1 a produkci interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) a membránového tumor nekrotizujícího faktoru (TNF). Tyto cytokiny aktivují makrofágy a indukují v nich produkci enzymu iNOS (inducibilní syntáza oxidu dusnatého). Tento enzym produkuje vysoce leishmanicidní oxid dusnatý (NO) a dochází k usmrcení intracelulárních amastigotů.

Naproti tomu u jiných kmenů myši (zejména BALB/c) se po infekci *L. major* vyvine Th2 odpověď. Během pár minut až hodin po infekci, CD4 T buňky u BALB/c myši produkují IL-4 jako odpověď na jediný parazitní antigen LACK (*Leishmania* homolog receptors for activated C-kinase). IL-4 snižuje expresi IL-12 receptorů na potenciálně ochranných Th1 buňkách. V důsledku toho buňky přestanou reagovat na IL-12 a produkce IFN- $\gamma$  a NO je inhibována. Paraziti *L. major* v makrofázích tedy nejsou usmrceni. IL-4 spíše podporuje růst Th2 buněk, které stimulují produkci protilátek specifických pro parazity (Louis et al., 1998; Himmelrich et al., 1998). Je však třeba zmínit, že vysvětlení náchylnosti BALB/c myši k infekci *L. major* může být komplikovanější, než je uvedeno výše. Například v určitých případech IL-4 deficientní myši BALB/c jsou stále citlivé na infekci parazitem (Noben-Trauth et al., 1996). Tyto výsledky lze částečně vysvětlit skutečností, že myši BALB/c s deficitem IL-4 jsou více či méně náchylné k infekci *L. major* v závislosti na podkmeni parazita použitého k infekci myši, protože některé kmeny indukují plně rozvinutou infekci u IL-4 deficientních BALB/c myši, zatímco jiné ne (Noben-Trauth et al., 1999). Citlivost BALB/c myši k infekci *L. major* tedy může záviset na schopnosti parazita indukovat nejen produkci IL-4, ale také jiných cytokinů, jako je IL-13 a IL-10, které rovněž podporují náchylnost hostitele k infekci parazitem (Groux et al., 1999; Matthews et al., 2000; Kane a Mosser, 2001).

Hostitelem produkované protilátky proti leishmaniím neposkytují ochranu proti tomuto onemocnění, ale jsou spíše ukazatelem rozvoje infekce (Sharma and Singh,



2009). Toto tvrzení ve své práci potvrdil Miles et al., 2005, který na myším modelu zkoumal roli anti-leishmaniových protilátek IgG při zprostředkování obrany vůči leishmaniové infekci. Kmen myší JH BALB/c, který byl v tomto experimentu zvolen, obsahuje delecii v genu pro těžký řetězec IgG, což vede ke ztrátě schopnosti produkce této protilátky. Mutantní myš byla v porovnání s kontrolní myší rezistentní k infekci způsobené *L. major* a vzniklá léze byla celkově menší a obsahovala nižší počet leishmanií. Pasivní podání imunního séra však způsobilo, že se u myší JH vyvinuly velké léze obsahující velký počet parazitů. Podání tohoto séra zároveň korelovalo se zvýšenou produkcí IL-10 (Miles et al., 2005).

Závislost funkce imunitního systému a pohlavních rozdílů u obratlovců je prokázána řadou studií (Zuk & McKean, 1996; Klein, 2000,2004; Roved et al., 2017). Předpokládá se, že primární příčina je způsobena rozdíly vyvolanými pohlavními hormony a jejich účinky na genovou expresi a imunitní systém, ale může být stejně tak způsobena vrozenými fyziologickými rozdíly mezi samcem a samicí (McClelland a Smith, 2011). Je důležité zmínit, že zároveň existuje interakce mezi genderově specifickými imunitními rozdíly a specifickou imunitní odpovědí na jednotlivé mikroby. Obecně platí, že samci mají vyšší prevalenci a/ nebo závažnost než samice. Samci zpravidla vykazují nižší imunitní odpovědi než samice, u kterých byla prokázána vyšší produkce protilátek, specifická i nespecifická buněčná odpověď (Klein, 2000).

První linii obrany nejen proti parazitům představuje nespecifická imunita, která je rychlá, protože není závislá na předchozím setkání s antigenem. Existují studie, které u obratlovců definují rozdíly v nespecifické imunitní odpovědi u jednotlivých pohlaví. U samic je nespecifická imunitní odpověď silnější, což způsobuje častější vznik zánětlivých autoimunitních onemocnění. U samic také častěji dochází k imunopatologické přecitlivělosti oddáleného typu, tzv. DTH reakcím (delayed type hypersensitivity) (Da Silva, 1995). U jednotlivých pohlaví se liší počet a aktivita buněk spojených s nespecifickou imunitou. Fagocytické buňky, včetně makrofágů a neutrofilních granulocytů se vyskytují ve větším množství u samic, než u samců. U samic také prokazatelně dochází po stimulaci antigenem k produkci prostaglandinu E2, tromboxanu B2 a oxidu dusnatého (Spitzer, 1999). Na druhou stranu u samců

byla prokázána vyšší produkce prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF $\alpha$ . Souza et al., 2001 prokázali, že počet a aktivitu NK buněk negativně ovlivňuje estradiol. Infekce *L. donovani* je častější u mužů, kteří mají ve srovnání se ženami zvýšenou náchylnost ke kožní, slizniční a viscerální leishmanióze (Goble a Konopka, 1973). Zdá se, že toto snížení citlivosti u samic je způsobeno zvýšenou sekrecí faktoru stimulujícího kolonie granulocytů a makrofágů (Lezama-Davila et al., 2007b). Travi et al. 2002 zjistili, že u samců křečků byly leishmanií vyvolané léze větší a šířily se do distálních míst častěji než u samic. Bylo zjištěno, že tyto rozdíly na základě pohlaví lze přímo připsat pohlavním steroidním hormonům. Samice křečků, kterým byl podáván testosteron, měly větší léze než samci (Travi et al. 2002).

Ve vnímavosti k parazitární infekci hrají důležitou roli pohlavní rozdíly v návaznosti na produkci cytokinů. Protilátková imunitní odpověď je často vyšší u samic než u samců. Protože jsou T-buňky (hlavně CD4+ Th) funkčně i fenotypově heterogenní, je i buněčná imunitní odpověď odlišná u jednotlivých pohlaví. U myší DBA/2 infikovaných *L. major* se u obou pohlaví vyvinuly léze, ale samice myší své léze spontánně nevyhojily. Naopak u myší DBA/2 infikovaných *L. mexicana* jsou samice odolné vůči infekci i při vysokých dávkách, zatímco samci jsou vysoce vnímaví při nízkých dávkách (Alexander, 1988). Zdá se, že rezistence vůči *L. mexicana* u samic myší je způsobena zvýšenou sekrecí IFN- $\gamma$  a opožděným typem hypersenzitivní reakce, zatímco samci reagují na infekci způsobem zprostředkovaným přes Th2. U samic myší infikovaných *L. mexicana*, kterým byly podávány neutralizační protilátky proti IFN-y, se vyvinuly léze podobné samcům. Infikovaní samci myší, kterým byl podán IFN-y, vykazovali sníženou progresi lézí ve srovnání s kontrolními samci (Satoskar et al., 1998). Účinky pohlavních steroidních hormonů dále dokládají studie, kde estrogenová léčba makrofágů derivovaných z kostní dřeně z myší obou pohlaví prokázala zvýšené zabíjení parazitů a produkci oxidu dusnatého bez zvýšení prozánětlivých cytokinů (Lezama-Davila et al. 2007a).

## 2.4 Interakce mezi jednotlivými činiteli

Vývoj parazita a jeho úspěšnost během životního cyklu umožňují povrchové glykokonjugáty leishmanií, které zároveň zprostředkovávají interakce mezi

parazitem, vektorem a hostitelem. Předpokládá se, že tyto povrchové molekuly podporují přežití parazita jak uvnitř obratlovčího hostitele, tak i uvnitř zažívacího traktu flebotoma, přičemž citlivost či rezistence je dána délkou těchto molekul. Hlavní povrchovou složkou promastigotů je lipofosfoglykan (LPG), jehož struktura se liší mezi stádií procyklických a metacyklických promastigotů. Studie McConville et al., 1992 ukazuje, jakým způsobem je struktura LPG během vývoje parazita modifikována, zejména pak rozdíl v širší vrstvě u metacyklických promastigotů (McConville et al., 1992). Delší LPG metacyklů tvoří bariéru, která zabrání navázání podjednotek komplementu na membránu parazita (Puentes et al., 1990). Metacykličtí promastigoti jsou ve srovnání s citlivými procyklickými promastigoty *L. major* vůči komplementu rezistentní. Přežívání parazita je dále ovlivněno expresí iNOS, jehož regulace se účastní LPG společně s IFN- $\gamma$ . Makrofágy preinkubované s LPG inhibovaly po přidání IFN- $\gamma$  produkci NO. Za tuto inhibici byla zodpovědná aktivní složka LPG – tzv. fosfoglykan. Inhibice byla závislá na množství podaného fosfoglykanu (Proudfoot et al., 1996). Podobně jako LPG se u promastigotů vyskytuje metaloproteáza gp63, jejíž výskyt je u amastigotů silně redukován (Schneider et al., 1992). S expresí gp63 úzce souvisí rezistence k lyzi způsobené komplementem hostitele. Další významnou molekulou leishmanií je glykoinositol fosfolipid (GIPL), který se vyskytuje na povrchu promastigotů i amastigotů, přičemž na povrchu amastigotů způsobuje snížení produkce NO a snižuje tak mikrobicidní aktivitu efektorových buněk (makrofágů) namířenou proti leishmanii (Proudfoot et al., 1995).

Výsledky studie Peters et al. 2008 dokazují, že pobodání flebotomy vyvolalo rychlou infiltraci neutrofilů a podstatnou migraci makrofágů do kůže, bez ohledu na přítomnost parazitů (Peters et al., 2008). Je to pravděpodobně důsledek poškození tkáně způsobeného pobodáním, jelikož sterilní poškození způsobuje rychlou infiltraci neutrofilů do několika různých míst tkáně (McDonald et al., 2010; Ng et al., 2011). Po infiltraci metacyklických stádií *L. major* do kůže, byla tato stádia nehybná, ve srovnání s motilitou pozorovanou u sporozoitů malárie (Vanderberg a Frevert, 2004; Amino et al., 2008), a většina parazitů byla fagocytována neutrofily, kteří se rychle infiltrovaly a koncentrovaly kolem místa vpichu (Peters et al., 2008).

Neutrofilní fagocytóza parazitických stádií byla zprostředkována opsoniny, např. složkami komplementu (Laufs et al., 2002). Četnost infikovaných neutrofilů se v průběhu času v místě inokulace *L. major* snižovala, což bylo doprovázeno zvýšením frekvence infikovaných makrofágů (Peters et al., 2008). Překvapivě se podíl infikovaných makrofágů a dendritických buněk v místě pobodání nezvýšil v nepřítomnosti neutrofilů (Ng et al., 2008; Peters et al., 2008). Vizualizace uvolňování volných parazitů z apoptotických neutrofilů a vychytávání těchto parazitů makrofágy *in vivo* (Peters et al., 2008) naznačuje, že dříve navrhovaný model tzv. „Trojského koně“ (van Zandbergen et al., 2004), dle kterého parazit využívá neutrofilů jako „mezihostitele“, moduluje jejich apoptózu a schopnost atrahovat makrofágy, nemusí být hlavním mechanismem přenosu parazitů *in vivo*. To by ve skutečnosti podpořilo model tzv. „Trojského králíka“ kdy parazit uniká apoptizujícím neutrofilům a infikuje makrofágy (Ritter et al., 2009). Autoři studie dále navrhují, že schopnost neutrofilů fungovat jako cíl imunitního úniku závisí na genetickém pozadí hostitele a kmenu parazita použitého pro experimenty. Dermální dendritické buňky, schopné migrace do drénujících lymfatických uzlin, jsou dalším typem buněk infikovaných leishmaniemi v místě inokulace v kůži (Ng et al., 2008).

Ve vektorové části životního cyklu je vývoj leishmání omezen na trávicí trakt. Během prvních několika dnů po krevním sání patří mezi přirozené překážky vývoje parazita sekretované proteolytické enzymy, peritrofická matrix obklopující požitou nasátou krev a imunitní reakce vektora. Přibližně 48-72 hodin po sání zpomalují parazité svou replikaci a diferencují se ze slabě pohyblivých promastigotů na silně pohyblivé dlouhé nektomonády (Rogers et al., 2002). Ty unikají z nasáté krve obklopené peritrofickou matrix do lumen středního střeva a pohybují se směrem ke přední části středního střeva, kde se později vyvíjí v krátké leptomonády (Walters, 1993; Rogers et al., 2002). Vazba parazita na střevní epitel je přísně závislá na stadiu, protože je vlastností pouze forem dlouhých nektomonád a leptomonád (Wilson et al., 2010). Zatímco vazba ve specifických vektorech (*P. papatasi*, *P. duboscqi* a *P. sergenti*) zahrnuje lipofosfoglykan (LPG), u jiných druhů flebotomů není tato povrchová molekula vyžadována k vazbě parazita ke střevnímu epitelu. Během pozdních stádií infekcí se velké množství parazitů hromadí v předním středním

střevě a produkují gelovitou zátku, čímž dojde k mechanickému ucpání střeva. Paraziti přichycení na stomodeální chlopeň způsobují poškození chitinové výstelky a epiteliálních buněk chlopně, narušují její funkci a usnadňují reflux parazitů do kůže obratlovčího hostitele. Dalším předpokladem účinného přenosu je transformace na metacyklická stádia vysoce infekční pro hostitele obratlovce.

Kromě leishmanií je při krevním sání infikovaného flebotoma na hostiteli do rány injikován gel obalující infekční metacyklická stádia. Tento promastigoty produkováný sekret (PSG) vytváří výše zmíněnou zátku v přední části střeva flebotoma, která blokuje lumen jeho zažívacího traktu (Rogers et al., 2002; Stierhof et al., 1999). Na dvou různých kombinacích parazit-vektor bylo ukázáno, že hlavní složkou PSG je filamentózní proteofosfoglykan promastigotů (fPPG) sekretovaný samotnými leishmaniemi (Stierhof et al., 1999).

Několik studií prokázalo snížený počet parazitů, dokonce i mrtvých nebo zničených ve středních střevech „nekompatibilních“ druhů flebotomů v rané fázi infekcí, tedy v době náporu proteolytické aktivity (Shatova et al., 1984; Lawyer et al., 1990; Schlein a Jacobson, 1998). Kromě toho další studie odhalily, že dokonce i v „kompatibilních“ kombinacích parazit-vektor je až 50 % původního inokula parazita amastigota zabito během prvního dne po sání (Pimenta et al., 1997; Rogers et al., 2002). Aby dokončila svůj vývojový cyklus, musí mít leishmanie vyvinuté mechanismy k překonání nepřátelského prostředí středního střeva. Četné studie poskytují důkazy, že parazit manipuluje s hladinami a načasováním proteázové aktivity ve středním střevě. Schlein a Romano 1986 a Dillon a Lane 1993 prokázali schopnost *L. major* potlačit nebo oddálit vrchol aktivity trypsinu a aminopeptidázy ve středním střevě. Dalším způsobem, jak mohou paraziti ovlivnit proteolytickou aktivitu střev jsou prostřednictvím inhibitorů serinových proteáz (ISP), které byly nalezeny u *L. major* (Ivens et al., 2005). ISP mají inhibiční účinky proti serinovým proteázám obratlovců makrofágů, jako je neutrofilní elastáza a u jedné z nich (ISP2) bylo prokázáno, že zvyšuje přežití parazitů v myších makrofázích (Eschenlauer et al., 2009). Snad nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím přežití parazita jsou mechanismy leishmanií, které zvyšují jejich odolnost proti proteolytické aktivitě vektora, aniž by inhibovaly celkovou proteolytickou aktivitu. Pimenta et al. 1997

vystavili *L. major* střevním lyzátům nasátých *P. papatasi* *in vitro*. Amastigoti z čerstvé tkáně a plně diferencovaní promastigoti byli relativně odolní, zatímco paraziti v časném stádiu přechodu z amastigota na promastigota (2–8 h) se stali vysoce náchylní k usmrcení. Autoři své pozorování interpretují jako rezistenci promastigotů i plně transformovaných promastigotů k proteolytické aktivitě středního střeva.

Během sání flebotomů je spolu s parazity do kůže hostitele také vpravováno malé množství slin těchto přenašečů. Nedávné studie zkoumaly, jak modifikace místa vpichu složkami slin může ovlivnit výsledek infekce. U několika různých druhů leishmanií způsobila společná injekce parazitů s homogenáty slinných žláz *L. longipalpis* nebo *P. papatasi* podstatné zvětšení velikosti lézí a/nebo zvýšení parazitární zátěže ve srovnání s kontrolami, které byly infikovány pouze parazity (Titus a Ribeiro, 1988; Theodos et al., 1991; Mbow et al., 1998). Hyaluronidáza, identifikovaná ze slinných žláz *L. longipalpis* a *P. papatasi*, vytváří fragmenty hyaluronanu, které snižují produkci IFN- $\gamma$  a indukují expresi genů pro chemokiny a iNOS v makrofázích (McKee et al., 1997; Horton et al., 1998). Adenosin deamináza, nalezená pouze ve slinách *L. longipalpis*, zabraňuje apoptóze T buněk způsobené akumulací adenosinu (Charlab et al., 2000). Inosin, vedlejší produkt adenosinu, inhibuje produkci zánětlivých cytokinů včetně IL-12 a INF- $\gamma$  (Haskó et al., 2000).

Ve studii Kimblin et al. 2008 provedli kvantifikaci *L. major* promastigotů vpravených do kůže jednotlivými samicemi *P. duboscqi*. Pozorovali počty přenesených parazitů, kdy většina flebotomů přenesla nízkou infekční dávku (<600 parazitů), zatímco zbytek přenesl mnohem vyšší dávky, což také odpovídalo vyššímu procentu parazitů přítomných ve středním střevě před sáním krve. Autoři naznačují, že tato bimodalita odráží dva odlišné mechanismy přenosu. Simulací přenosu vysokých a nízkých dávek leishmanií intradermální jehlou ukazují, že velikost inokula ovlivňuje výsledek infekce. Velké léze se rychle vyvíjely v uších myší, které dostávaly vysokou dávku inokula, zatímco nízká dávka vedla pouze k mírné patologii, ale k vyššímu titru parazitů v chronické fázi. Souhrnně tato data naznačují, že infekční dávka může být jedním z určujících faktorů ve výsledku leishmaniové infekce.

Výsledky Belkaid et al., 1998 dokazují, že ve srovnání s naivními myšmi, myši nejdříve vystavené pobodání neinfikovaných flebotomů vykazovaly při následné infekci sníženou patologii kožních leishmaniových lézí, nižší parazitární zátěž a sníženou schopnost přenosu leishmanií zpět na neinfikované flebotomy (Kamhawi et al., 2000). Ochrana udělená pre-expozicí myší slinám neinfikovaného vektora byla spojena se silnou DTH reakcí v místě bodnutí. S ochranou u myší byla také spojena silná regulace INF- $\gamma$  a IL-12 v místě sání, což naznačuje, že v tomto zánětlivém prostředí mohou být infikované makrofágy brzy aktivovány. Ochrana proti leishmaniovým infekcím způsobená pre-expozicí neinfikovaným flebotomům by mohla být jedním z faktorů ovlivňující skutečnost, proč v oblastech, které jsou endemické pro kožní leishmaniózu, původní obyvatelé, kteří jsou většinou vystaveni sání neinfikovanými flebotomy, obecně vykazují slabší infekce ve srovnání s turisty nebo přistěhovalci.

## 2.5 Cíle práce a odůvodnění řešené problematiky

Infikované samice flebotomů během krevního sání injikují parazity do kůže hostitele spolu se svými slinami, které jsou složeny z různorodé skupiny molekul a jejichž složení zásadním způsobem ovlivňuje průběh i patologické výsledky infekce. Sliny flebotomů se skládají ze zhruba 30 různých proteinů, z nichž většina má antihemostatické a imunomodulační účinky. Bylo prokázáno, že imunizace některými z těchto proteinů nebo expozice neinfikovaným flebotomům může vést k ochranné imunitní reakci hostitele nasměrované proti leishmaniím. Avšak různé druhy flebotomů se liší složením svých slinných žláz a ochrana vyvolaná slinnými proteiny je tudíž specifická v závislosti na druhu flebotoma. Ne všechny slinné molekuly však mohou potlačit rozvoj tohoto onemocnění, některé z nich jej mohou i posílit, vše v závislosti na historii expozice hostitele slinám vektora (Ribeiro et al., 2010; Lestinova et al., 2017; Serafim et al., 2021). Sliny vektora zvyšují u myší, které dříve nebyly vystaveny sání flebotomů virulenci leishmanií tím, že upravují prostředí ve prospěch parazita (Gomes and Oliveira 2012, Lestinova et al. 2017). V důsledku inokulace slin vektora dochází také ke snížení schopnosti oxidativního vzplanutí a produkce NO u infikovaných makrofágů (Gomes and Oliveira, 2012;

Lestinova et al., 2017). Hlavní roli v reakci na bodnutí flebotoma hraje zřejmě DTH reakce zvyšující produkci prozánětlivého IFN- $\gamma$  v souvislosti se specifickou reakcí namířenou proti slinám vektora, tedy antigenům nesouvisejících s leishmaniemi. Na základě silného stimulu vnějšího poškození dochází jako první k akumulaci neutrofilů v místě bodnutí. Specifická imunitní odpověď zprostředkovaná T lymfocyty je pomalejší, směřuje proti slinám vektora (bez i s leishmaniemi) a může působit proti vzniku onemocnění a chránit laboratorní zvířata před těžkým průběhem infekce (Belkaid et al., 2000; Carregaro et al., 2013; Rohoušová et al., 2011; Lestinova et al., 2015; Lestinova et al., 2017).

Právě výše uvedená zjištění vedla k dalšímu výzkumu zahrnujícímu zejména hledání slinných proteinů vektorů jako vhodných kandidátů pro tvorbu ochranné vakcíny proti leishmanióze (Valenzuela et al., 2001; Oliveira et al., 2015; Cecílio et al. 2020). Ačkoliv představují výše zmíněné poznatky nezbytný základ, pro vývoj vakcíny je stále zapotřebí hlubšího bádání a dalšího vývoje v této oblasti. Hlavním předpokladem pro ovlivnění leishmaniové infekce se zdá být do nedávna opomíjený faktor načasování senzitivace hostitele vektorovými slinami. Součástí rozsáhlejší studie je snaha simulace situace v endemických oblastech, kdy je hostitel vnímavý na sliny vektora znovu vystaven flebotomům krátce před inokulací leishmanií. Experimentální nákazy sledující časové rozestupy mezi senzitivací slinami vektora a parazitární inokulací v souvislosti s průběhem kožní leishmaniózy nebyly doposud zkoumány. Právě z tohoto důvodu je primárním cílem této diplomové práce zejména standardizace histopatologických a imunohistochemických metod použitelných pro výzkum dané problematiky a bližší pochopení charakteru imunitní reakce namířené proti slinám flebotomů ve vztahu ke kožní leishmanióze.



## 3 Materiál a metodika

### 3.1 Popis pokusů

Zadaná diplomová práce je součástí rozsáhlejší studie dvou týmů (doc. RNDr. Andrea Bardůnek Valigurová, Ph.D., Masarykova univerzita Brno a RNDr. Iva Kolářová, Ph.D., Univerzita Karlova).

Pro praktickou část diplomové práce byly použity jako modelový organismus myši BALB/c umístěné ve zvěřinci Univerzity Karlovy (dále UK). Ustájení myší a jejich experimentální nákazy byly provedeny pod vedením doktorky Kolářové na UK za přísně definovaných laboratorních podmínek. Všechna zvířata byla humánním způsobem uspána a usmrcena v rámci oprávnění k projektu pokusů MSMT-32011/2020-3. Odebrané a chemicky fixované vzorky (ušní boltce) byly zaslány pro mikroskopické zpracování na MU. U myší ve třetím experimentu byla část tkání vyhodnocena pomocí širšího spektra imunologických, biochemických a molekulárně biologických postupů na UK.

Pro stanovení vhodných protokolů pro zpracování tkání ušního boltce pro následní mikroskopické analýzy bylo využito několika standardizačních pokusů. Cílem těchto pokusů bylo navrhnout nejvhodnější postup pro šetrnou fixaci a další histologické zpracování ušního boltce, které by umožňovalo zachovat tkáň a buňky v jejich přirozené podobě pro histopatologické vyhodnocení sledovaných změn a zároveň v maximálně možné míře zachovávali strukturu epitopů (vazebné místo na antigen) pro imunohistochemické (IHC) analýzy.

#### **Pokus 1: Výběr vhodné kombinace fixáže a délky dekalifikace**

Ušní boltce myší použitých v tomto experimentu představovaly zbytkový materiál z jiných pokusů.

Pro výběr vhodného fixačního roztoku byly předem zvoleny tyto druhy fixází: fixační směs AFA (ethanol, formaldehyd, kyselina octová ledová) a čerstvě připravený 4% paraformaldehyd ve fosfátovém pufru (pH 7,4) pro **1)** delší fixaci (a následné skladování ve fixativu) a **2)** fixaci nepřesahující dobu 18 hodin a následně převedení a skladování tkáně v 70% etanolu.

Pro dekalifikaci byla zvolena komplexotvorná sloučenina typu EDTA (etyléndiamintetraoctové kyseliny) (Chelaton, Komplexon). Pro testování potřebné délky dekalifikace byly zvoleny tyto intervaly: **1)** zpracování bez dekalifikace (= 0 dnů), **2)** dekalifikace po dobu 3 dnů a **3)** dekalifikace po dobu 6 dnů.

### **Pokus 2:**

**2A) Výběr vhodné fixáže pro souběžné histopatologické a imunohistochemické analýzy**

**2B) Testování vlivu slin flebotoma na přítomnost imunitních složek v místě sání v závislosti na časovém odstupu mezi posledním sáním a odběrem tkáně**

Ušní boltce testovaných myší byly opakovaně vystaveny sání flebotomem druhu *Phlebotomus papatasi* jednou za 7-14 dní v rámci péče o tuto kolonii flebotomů. Sání probíhalo dlouhodobě zhruba 1 rok. Myši byly uvedeny do celkové anestezie a po celou dobu bylo dbáno na komfort zvířat (dostatečná teplota v místnosti, vlhčení očí). Uspané myši byly umístěny do klece se samicemi flebotomů a ponechány 60 minut ve tmě v pokojové teplotě. Po každém sání zvířata opět nabyly vědomí a byla vrácena do označené chovné nádoby. Na konci pokusu byly myši uvedeny do hluboké celkové anestezie a usmrceny v intervalu 48 hodin (skupina 2) nebo 1 týden (skupina 1) po posledním sání a ušní boltce byly odebrané do dvou typů fixáže. Po vyhodnocení výsledků z **Pokusu 1** byla jako nejvhodnější vybrána fixace v 4% paraformaldehydu ve fosfátovém pufru s maximální dobou fixace do 18 hodin a následné převedení do 70% etanolu (vzorky PAPF1-2) a pro další srovnání byla část vzorků fixována v zinkové fixáži bez formalinu (vzorky PAPZ1-4).

**Skupina 1** (PAPZ3, PAPZ4, PAPF2) = odběr tkáně 1 týden po posledním sání

**Skupina 2** (PAPZ1, PAPZ2, PAPF1) = odběr tkáně 48 hodin po posledním sání

**Pokus 3: Testování průběhu infekce druhem *Leishmania major* u myší infikovaných 48 hodin nebo 1 týden po posledním sání**

Myši byly opakovaně vystaveny sání neinfikovaných flebotomů (bez leishmanií) druhu *Phlebotomus duboscqi* jednou za 7 dní. Sání (imunizace slinami) probíhalo

celkem třikrát. Každá myš byla vystavena zhruba 30 samicím flebotomů v rámci jednoho sání (jedné expozice/imunizace). V daném intervalu od posledního sání (48 hodin nebo 1 týden) byly myši infikovány *Leishmania major*. Myši byly uvedeny do celkové anestezie (ketamin-xylazin, intraperitoneálně) a infikovány intradermálně do ušního boltce. Infekční dávka obsahovala promastigoty *L. major* (kmen LV561, 10 000 promastigotů) a homogenát slinných žláz flebotomů *P. duboscqi* (ekvivalent 0,5 žlázy) a byla myším podána v objemu přibližně 5 mikrolitrů. Sání flebotomů a usmrcení myší probíhalo stejným způsobem, jako je uvedeno v předchozím pokusu. Myším byla odebrána krev (dále zpracována na sérum) a bylo změřeno množství protilátek proti leishmaniím (IgG) a proti homogenátu slinných žláz *P. duboscqi* (IgG). Po odebrání ušních boltců byly změřeny léze na pravém i levém uchu. Pravý ušní boltec byl spolu se spádovou uzlinou vyšetřen metodou kvantitativní PCR (qPCR) a bylo změřeno množství leishmanií. Levé ucho bylo převedeno do zinkové fixáže a zasláno na MU Brno k dalšímu zpracování. Levá lymfatická uzlina byla podrobena průtokové cytometrii, během které byly měřeny 2 buněčné populace: celkové T lymfocyty (CD3+), pomocné T lymfocyty (CD3+CD4+) a cytotoxické T lymfocyty (CD3+CD8+).

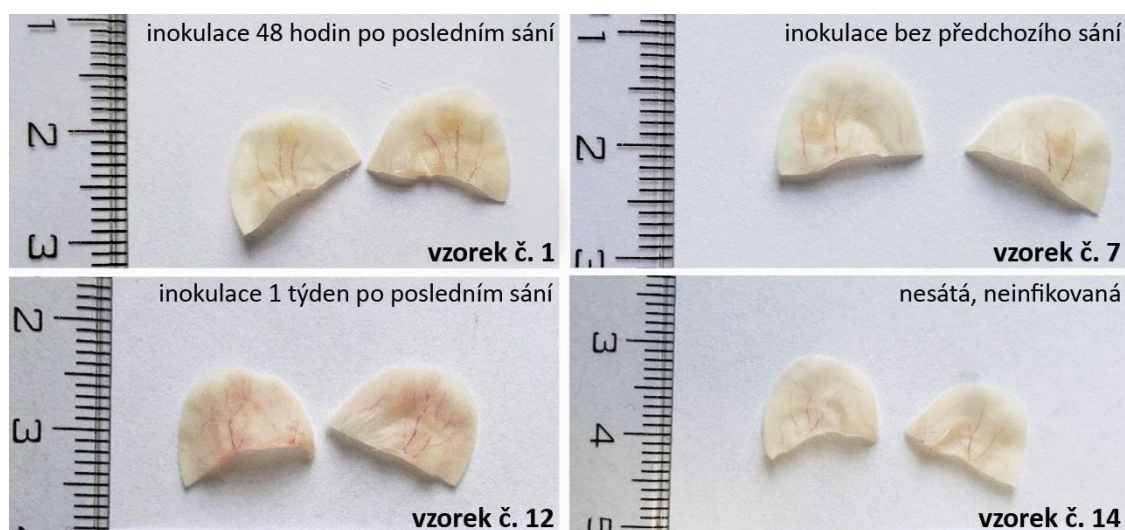
**Skupina 1** = 5 myší, sáté, infikované 48 hod po posledním sání

**Skupina 2** = 5 myší, sáté, infikované 1 týden po posledním sání

**Skupina 3** = 3 myši, kontrola, nesáté, infikované (pozitivní kontrola)

**Skupina 4** = 2 myši, kontrola, nesáté, neinfikované (negativní kontrola)

Všechny vzorky byly zpracovány dle postupů pospaných v následujících podkapitolách.



**Obrázek 4.** Ušní boltce odebrané vybraným jedincům z každé skupiny pokusu č. 3. Fotografie poskytla dr. Kolářová.

**Tabulka 1.** Hodnoty plochy léze, množství leishmanií a hladiny specifických IgG protilátek u vybraných myší z pokusu 3 (č. vzorku v tabulce odpovídá číslu vzorku v obrázku č. 4). Data poskytla dr. Kolářová. V rámci této diplomové práce byla zpracována tkáň levého ušního boltce.

č. vzorku	skupina	plocha léze (mm <sup>2</sup> )		množství <i>L. major</i> (qPCR)		hladina IgG protilátek (absorbance při 492 nm)	
		pravé ucho	levé ucho	pravé ucho	pravá spádová uzlina	anti- <i>P. duboscqi</i>	anti- <i>L. major</i>
1	48 hod	12,01	10,17	456	7	1,024	0,226
7	infikovaná	16,49	25,28	74 400	0	0,068	0,201
12	1 týden	78,50	113,04	591	6	0,208	0,208
14	neinfikovaná	0,00	0,00	0	0	0,083	0,172

**Tabulka 2.** Procentuální hodnoty počtu lymfocytů naměřených na základě značení protilátkami proti CD3, CD4 a CD8 u vybraných myší z pokusu 3 (č. vzorku v tabulce odpovídá číslu vzorku v obrázku č. 4). Data poskytla dr. Kolářová.

č. vzorku	skupina	% z celkového počtu lymfocytů (průtoková cytometrie)		
		CD3+	CD3+CD4+	CD3+CD8+
1	48 hod	21	12	6
7	infikovaná	56	30	19
12	1 týden	32	18	10
14	neinfikovaná	48	26	17

### 3.2 Příprava použitých roztoků

Množství jednotlivých chemikálií bylo upraveno na základě objemu tkáně. Objem fixáže by měl být 6-10násobkem objemu fixované tkáně.

#### Fixační směs AFA

- 40% vodný formaldehyd 60 ml
- 95% ethanol 500 ml
- pevná kyselina octová 40 ml
- destilované voda 400 ml

#### Zinková fixáž (bez formalinu) (BD Pharmingen™, kat. č. 552658)

- těsně před použitím ředěno v poměru 1:9 s destilovanou vodou

#### 4% paraformaldehyd (PFA) v 0,2 M PBS

- destilovaná voda 200 ml
- PFA 16 g
- 1M NaOH dle potřeby
- 0,2M PBS 200 ml

Rozpuštění prášku PFA v destilované vodě při teplotě 60 °C za stálého míchání po dobu 1 hod. Po vychladnutí přikapávat 1M roztoku NaOH do projasnění roztoku. Před použitím rozředit v 200 ml 0,2M PBS.

#### EDTA

- EDTA 10 g
- destilovaná voda 100 ml
- 4% vodný roztok NaOH dle potřeby (úprava pH na 7-7,4)

#### 0,2M PBS

- destilovaná voda 200 ml
- NaCl 3,4 g
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1,56 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,28 g

### 0,1M PBS

- destilovaná voda 500 ml
- NaCl 4,25 g
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1,95 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,35 g

### Permeabilizační roztok

- 0,1M PBS 50 ml
- BSA 0,05 g
- Triton X-100 0,25 ml
- Azid sodný 0,05 g

## 3.3 Dekalcifikace

### *Materiál:*

- lakmusové proužky
- chemikálie: roztok EDTA, NH<sub>4</sub>OH (dle potřeby) a (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(COO)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O

### *Postup dekalifikace:*

- důkladné promytí fixovaného vzorku v destilované vodě po dobu 4x15 min
- přenesení vzorku do perforované kazety
- ponoření do 10% roztoku EDTA (15-20násobek objemu tkáně)
- umístění nádoby na magnetické míchadlo s nastavením pomalého míchání
- výměna roztoku EDTA každý 3-4 den (u kratší dekalifikace 1-2 dny)
- po ukončení dekalifikace důkladně promýt v izotonickém pufru (PBS nebo destilovaná voda) po dobu 4x10 min

### END-POINT dekalifikační test:

- odebrání 5 ml dekalifikačního roztoku

- kontrola pH pomocí lakmusového papírku a jeho úprava na 7 pomocí koncentrovaného vodného roztoků  $\text{NH}_4\text{OH}$
- přidání 5 ml saturovaného roztoku  $(\text{NH}_4)_2(\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , dobře zamíchat
- po 30 min kontrola utvořeného zákalu, za předpokladu čirého roztoku ukončení procesu dekalifikace

### 3.4 Zalití vzorků do parafínu (dle Valigurová 2007)

#### *Materiál:*

- plastové komůrky pro zalévání vzorků
- chemikálie: vzestupná alkoholová řada (pouze čistá etanol bez příměsí), xylen
- 3 parafínové lázně, parafín na zalití (opakovaně přetavené)
- inkubátor (teplota 56–57 °C)
- vodní lázeň

#### *Postup:*

- přenos vzorků do zalévacích komůrek, vymytí fixáže 70% ethanolem (v případě PFA je nutné důkladné promytí v 0,1M PBS po dobu alespoň 3x15 min)
- dehydratace vzorků vzestupnou alkoholovou řadou

1) 30% ethanol	1 h
2) 50% ethanol	1 h
3) 70% ethanol	1 h (možné skladovat)
4) 80% ethanol	2x45 min
5) 90% ethanol	2x45 min
6) 100% ethanol	3x30 min
- projasnění xylenem

1) směs 100% ethanolu a xylenu (1:1)	2x10 min
2) xylen 1	10 min
3) xylen 2	40 min (do zprůhlednění)
- parafínová infiltrace





- xylen 2 5 min
- 100% ethanol 5 min
- 96% ethanol 5 min

Každé z následujících **histologických barvení** bylo provedeno opakovaně. Množství chemikálií bylo upraveno dle množství vzorků a dle objemu kyvet. Během barvení byly jednotlivé preparáty průběžně kontrolovány pod světelným mikroskopem.

### **Barvení hematoxylin-eozinem (dle Valigurová 2007)**

#### *Materiál:*

- kyvety s víčky a s držáky/nosiči preparátů
- barviva: Ehrlichův hematoxylin, 0,1% eozin s 1 kapkou kyseliny octové
- chemikálie: ethanol, xylen, voda

#### *Postup:*

- deparafinizace a rehydratace
- barvení Ehrlichovým hematoxylinem 10 min
- promytí pod tekoucí vodou 15 min
- barvení eozinem 5 min
- diferenciaci v 80% etanolu 30 s
- odvodnění, projasnění xylenem a montáž preparátů do Pertexu

### **Barvení zeleným trichromem podle Massona (dle Humason 1967)**

#### *Materiál:*

- barviva: Weigertův železitý hematoxylin, fuchsin Ponceau de xylidin a Fast green
- chemikálie: roztok kyseliny fosfomolybdenové a kyseliny fosfowolframové, kyseliny octová ledová, ethanol, xylen a destilovaná voda

#### *Postup:*

- deparafinizace a rehydratace řezů

- barvení Weigertovým hematoxylinem 10 min
- oplach pod tekoucí vodou 10 min
- promytí v destilované vodě 30 s
- barvení Ponceau fuchsinem 15 min
- promytí v destilované vodě 30 s
- diferenciace ve směsi kyseliny fosfowolframové a kyseliny fosfomolybdenové 15 min
- barvení ve Fast green 50 min
- diferenciace v 1% vodném roztoku kyseliny octové 3 min
- promytí v destilované vodě 30 s
- odvodnění, projasnění xylenem a montáž preparátů do Pertexu

### **Barvení Heidenhainovým AZAN trichromem (dle Humason 1967)**

#### *Materiál:*

- barviva: azokarmín, anilínová modř
- chemikálie: anilín alkohol, kyselý alkohol – 1% roztok kyseliny octové v 95% etanolu, kyselina fosfowolframová, kyselá voda - 1% roztok kyseliny octové v destilované vodě, etanol, xylén a destilovaná voda

#### *Postup:*

- deparafinizace a rehydratace
- inkubace v anilín alkoholu 45 min
- ponoření do kyselého alkoholu 1-2 min
- barvení azokarmínem 30 min v inkubátoru při teplotě 56 °C a poté 30 min při pokojové teplotě
- oplach v destilované vodě 30 s
- diferenciace v anilín alkoholu 5 min
- inkubace v kyselém alkoholu 1-2 min
- inkubace v kyselině fosfowolframové 3,5 hod
- promytí v destilované vodě 30 s
- barvení anilínovou modří 1,5 hod
- promytí v destilované vodě 30 s

- inkubace v kyselině fosfowolframové 3 min
- promytí v destilované vodě 30 s
- oplach v kyselé vodě 2 min
- odvodnění, projasnění xylenem a montáž preparátů do Pertexu

### **Giemsovo barvení (dle Ellis n.d.)**

#### *Materiál:*

- barvivo: Giemsův roztok (koncentrace 10 kapek zásobního roztoku Giemsa v 10ml destilované vody)
- chemikálie: 0,5% vodní roztok kyseliny octové, etanol, xylen a destilovaná voda

#### *Postup:*

- deparafinizace a rehydratace
- barvení ve vodním roztoku Giemsa přes noc při pokojové teplotě
- diferenciaci v roztoku kyseliny octové po dobu 1 min
- odvodnění, projasnění xylenem a montáž preparátů do Pertexu

## **3.7 Deparafinizace a imunohistochemické barvení pro konfokální mikroskopii**

### **Deparafinizace a zavodnění řezů:**

- nahřátí řezů na plotýnce o teplotě 55 °C 10 min
- inkubace v xylenu 1 10 min
- xylen 2 10 min
- xylen: 100% ethanol (1:1) 10 min
- 100% ethanol 10 min
- 100% ethanol 10 min
- 95% ethanol 10 min
- 70% ethanol 10 min
- 50% ethanol 10 min
- promytí v destilované vodě 2x5 min

### **Imunohistochemické značení**

#### *Materiál:*

- primární protilátky: polyklonální protilátka proti iNOS (králík, ředění 1:200; Invitrogen kat. č. PA3-030A), polyklonální protilátka proti myeloperoxidáze (králík, ředění 1:150; Invitrogen kat. č. PA5-16672)
- sekundární protilátka: protilátka proti králičím IgG – celá molekula, konjugovaná s FITC (koza, ředění 1:40; Sigma-Aldrich, kat. č. F 0382)
- fluorescenční barvivo pro barvení jader: Hoechst 33342
- další chemikálie: 0,1M PBS, BSA, permeabilizační roztok

#### *Postup:*

- |   |          |
|---|----------|
| 1) promytí v 0,1M PBS   | 3x10 min |
| 2) permeabilizace v detergentu                                  | 1 hod    |
| 3) inkubace v primární protilátce s 0,1% PBS (při 4 °C)         | přes noc |
| 4) promytí v 0,1M PBS   | 3x10 min |
| 5) inkubace v sekundární protilátce s 1% BSA (ve tmě při 37 °C) | 4 hod    |
| 6) promytí v 0,1M PBS   | 3x10 min |
| 7) barvení jader pomocí Hoechst (ve tmě při pokojové teplotě)   | 1 hod    |
| 8) promytí v 0,1M PBS   | 3x10 min |
| 9) montování preparátu do VECTASHIELD média                     |          |

**Upozornění:** Od bodu 5 je nutno inkubovat a manipulovat s preparáty v ztemnění. Zamontované preparáty skladovat v tmě při 4 °C a vyhodnotit co nejdříve.

Příprava kontrol probíhala stejně s tím, že se vynechala inkubace v primárních protilátkách. Pro kontrolu autofluorescence byly vzorky pouze permeabilizované, promyté a zamontované. Vzorky byly vyhodnoceny pod mikroskopem Olympus IX81 vybaveným konfokální jednotkou FluoView 500 (Olympus FluoView 4.3 software) a fluorescenční značení byla vizualizována pomocí UV (excitace 405 nm;

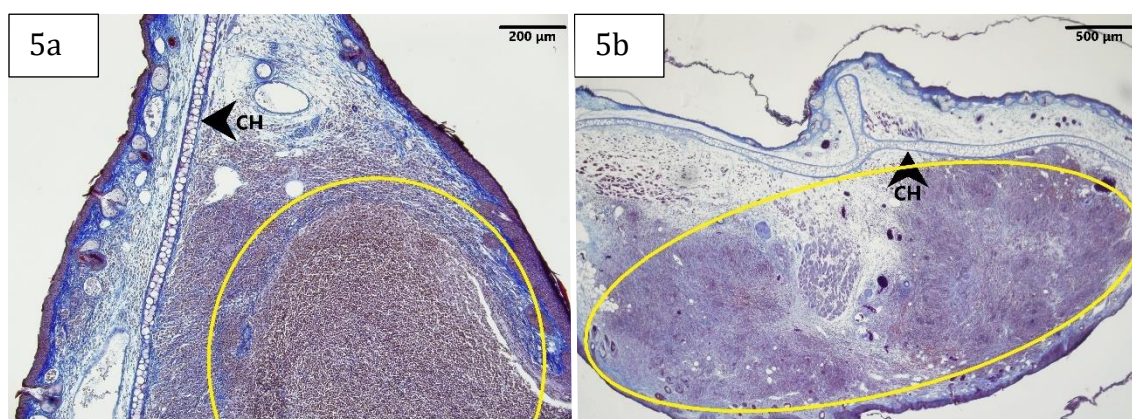
Hoechst), argonového (488 nm; protilátka s FITC) a zeleného He/Ne (543 nm, phalloidin-TRITC) laseru.

## 4 Výsledky

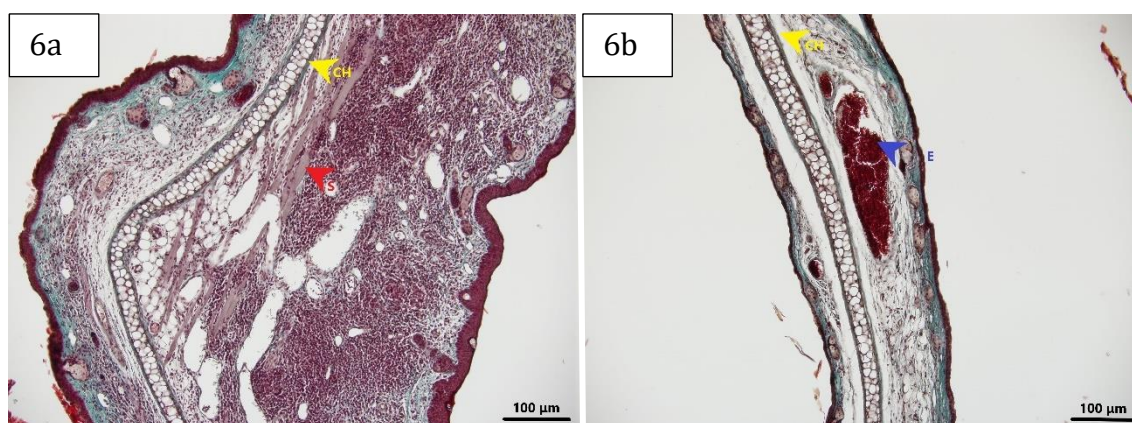
### 4.1 Výběr vhodné kombinace fixáže a délky dekalcefikace

Cílem **pokusu 1** byl výběr vhodné fixáže v kombinaci s optimální délkou dekalcefikace. Vzorky byly fixovány ve dvou typech fixáže: AFA a 4% roztok paraformaldehydu ve fosfátovém pufru (PFA). Část vzorků fixovaných ve 4% PFA byla i skladována v této fixáži a druhá část vzorků byla v 4% PFA fixovaná pouze po dobu nepřesahující dobu 18 hodin a následně byla promyta a převedena do 70% etanolu. V rámci pokusu byly testovány tři délky dekalcefikace: 0 dnů (bez dekalcefikace), 3 dny a 6 dní. Pro vyhodnocení bylo zvoleno následující histologické barvení: hematoxylin-eozin, Massonův zelený trichrom, Heidenhainův AZAN a Giemsa. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí světlené mikroskopie v procházejícím světle.

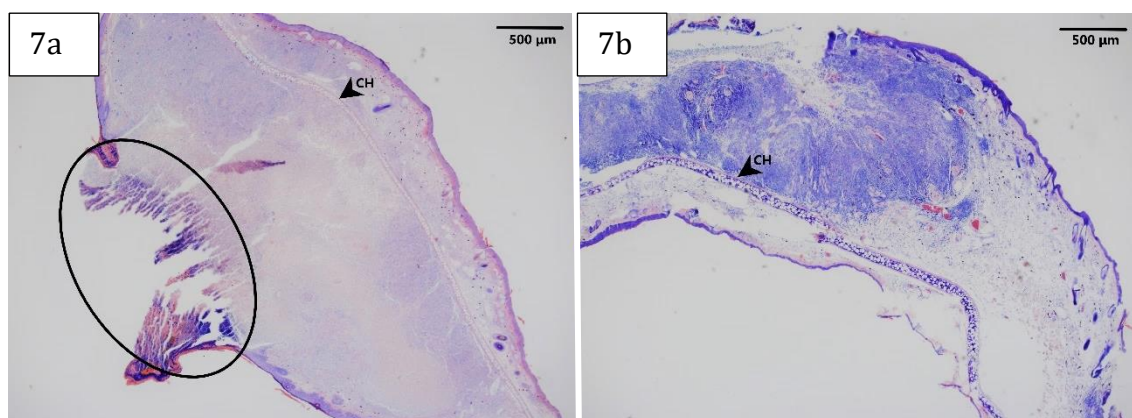
Nejvíce vhodnou fixáží pro histopatologické zpracování je AFA, jejíž barvitelnost a zachování buněčných struktur je z výše zmíněných fixáží neoptimálnější (obr. **5a-9a**). Vzorky fixované ve 4% PFA, a to bez ohledu na délku fixace a způsob skladování (4% PFA vs. 70% etanol), se hůře krájely a byly méně barvitelné, a zároveň vykazovaly méně kvalitní zachování morfolgie (obr. **5b-9b**). Nejhorš se zpracovávaly vzorky fixované i skladované v 4% PFA – ušní boltce byly pokroucené a příliš tuhé, při krájení se tkáň trhala, drobila a vypadávala z parafínu. Pro obrazovou dokumentaci byly do této práce proto vybrány pouze řezy z AFA a 4% PFA skladované v 70% etanolu.



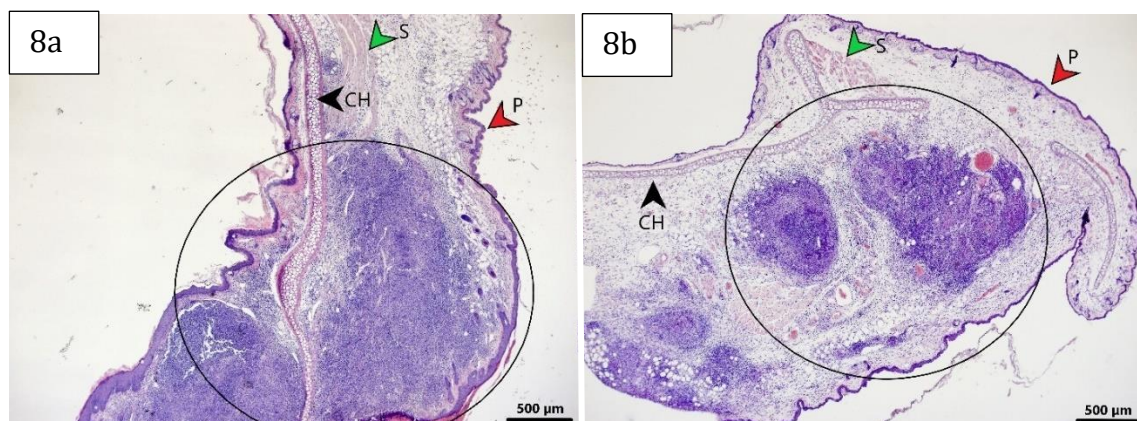
**Obrázek 5.** Příčný řez ušním boltcem myši s pokročilým stádiem infekce. Bez dekalcifikace, Heidenhainův azan. **a)** Fixace v AFA. **b)** Fixace v 4% PFA (skladování v 70% etanolu). *Elipsa* – léze, *CH* – chrupavka.



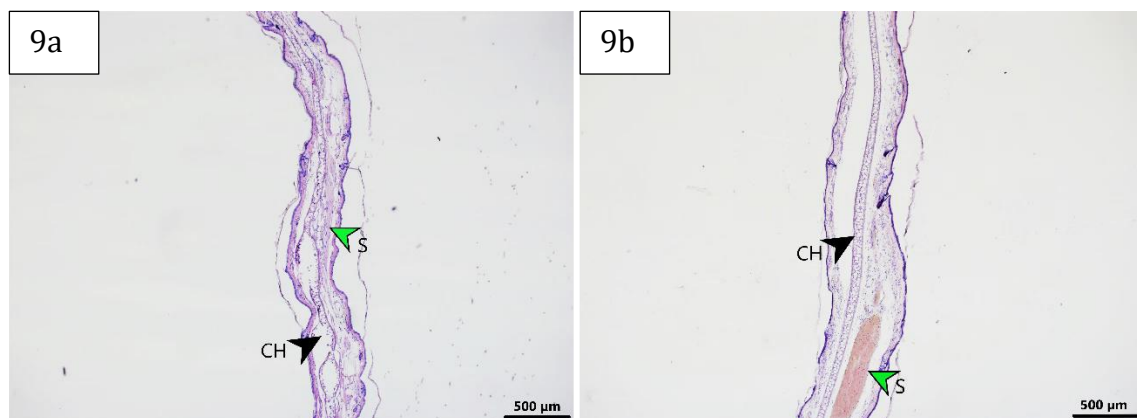
**Obrázek 6.** Příčný řez ušním boltcem myši s leishmaniózou. Bez dekalcifikace, Massonův zelený trichrom. **a)** Fixace v AFA. **b)** Fixace v 4% PFA (skladování v 70% etanolu). *CH* – chrupavka, *S* – svaly, *E* – shluky erytrocytů.



**Obrázek 7.** Příčný řez ušním boltcem myši s pokročilým stádiem leishmaniózy. Bez dekalcifikace, Giemsa. **a)** Fixace v AFA. **b)** Fixace v 4% PFA (skladování v 70% etanolu). *CH* – chrupavka, *elipsa* – keratinózní vrstva hojící se léze.



**Obrázek 8.** Příčný řez spodní částí ucha myši s pokročilou leishmaniózou. Bez dekalifikace, hematoxylin-eozin. **a)** Fixace v AFA. **b)** Fixace v 4% PFA (skladování v 70% etanolu). *Elipsa* – léze, *CH* – elastická chrupavka, *S* – svalovina, *P* – pokožka.

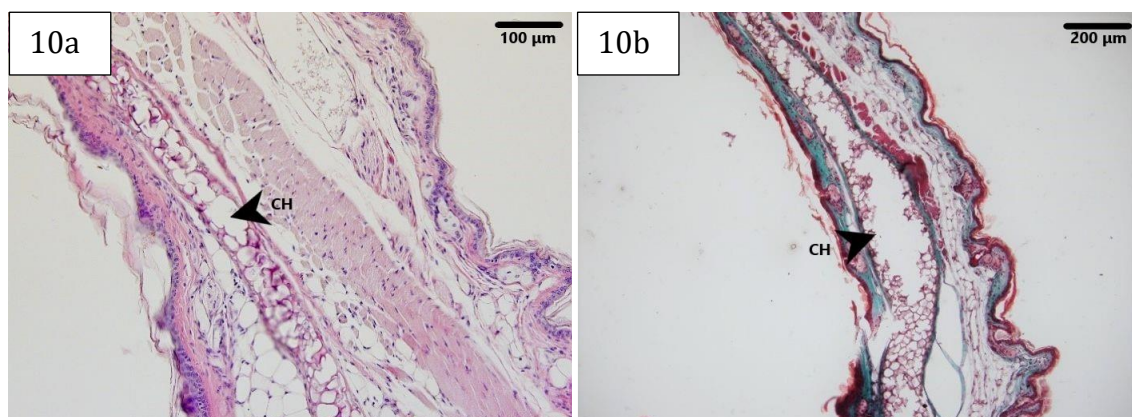


**Obrázek 9.** Příčný řez ušním boltcem myši bez leishmaniové infekce. Třídenní dekalifikace, hematoxylin-eozin. **a)** Fixace v AFA. **b)** Fixace v 4% PFA (skladování v 70% etanolu). *CH* – elastická chrupavka, *S* – svalovina.

I navzdory přítomnosti chrupavky v ušních boltcích, jako nejvíce vhodné se ukázalo být zpracování vzorků zcela bez dekalifikace. Delší dekalifikační proces vedl ke problematickému krájení vzorků na mikrotomu. Ve velké části případů docházelo k vypadávání řezů z parafínového bločku a výsledné obarvené řezy jsou méně kvalitní. Chrupavka ušního boltce po 6denní dekalifikaci vykazovala menší elasticitu a po krájení byla značně poškozená (obr. **10a-b**). Celkově byla tkáň navíc méně homogenní a mnohem hůře barvitelná. Napříč celým ušním boltcem vznikala menší ložiska tkáně poškozené v důsledku zpracování (obr. **10a-b**). Vzhledem

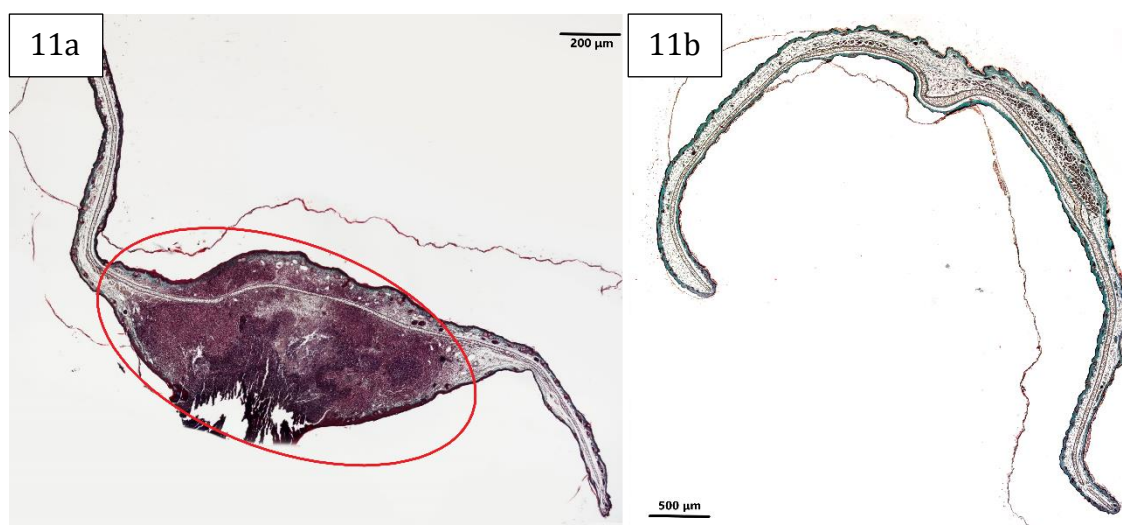


k tomu, že nebyly zaznamenány podstatné rozdíly mezi vzorky bez dekalcefikace a třídní dekalcefikací, proces dekalcefikace se pro histologické zpracování ušních boltců zdá být zbytečný.



**Obrázek 10.** Příčný řez ušním boltcem myši bez leishmaniové infekce. Šestidenní dekalcefikace. **a)** Fixace v AFA, hematoxylin-eozin. **b)** Fixace v 4% PFA (skladování v 70% etanolu). CH – elastická chrupavka.

V souvislosti se snížením počtu pokusných zvířat, byly použity ušní boltce myši určených původně pro jiné experimenty. Díky tomu byly k dispozici pro vyhodnocení tkáně ušního boltce s různě pokročilou leishmaniózou a stářím léze. U myši s pokročilým stádiem infekce vedoucím k nekrotizaci infikované tkáně byla horší manipulace se vzorky během krájení, kdy vzniklé léze často vypadávaly a celkové řezy tak byly méně kvalitní. Právě díky použití různorodého materiálu jsme byli schopni identifikovat tento problém a v dalších experimentech byly ušní boltce odebírány v dřívějších fázích infekce, kdy nedocházelo k natolik pokročilé nekrotizaci napadené tkáně. Stejně tak byly v dalších experimentech odebírány ušní boltce bez samotné báze ucha s masivnější chrupavkou a svalovinou, kde většinou ani nedochází k sání vektora, protože tato oblast ucha by při krájení způsobovala obdobný problém jako nekrotizace tkáně.



**Obrázek 11.** Srovnání celkového pohledu na řez ušním boltcem s pokročilou leishmaniózou (**a**) a zdravým (**b**) ušním boltcem. Bez dekalifikace, Massonův zelený trichrom. **a**) Pokročilé stádium leishmaniózy. Fixace v AFA. **b**) Bez leishmaniózy. Fixace v 4% PFA (převedené do 70% etanolu). *Elipsa* – léze.

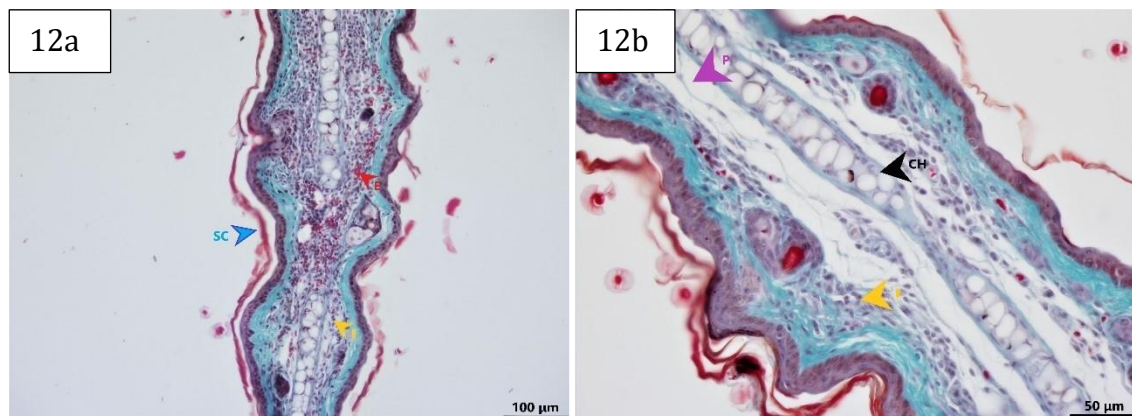
Nejpřínosnějším barvením pro histopatologické změny se ukázalo být barvení hematoxylin-eozinem, jenž představuje nejpoužívanější histologické barvení pro vizualizaci a celkovou analýzu tkání (jádra se barví fialově, cytoplazma a extracelulární matrix růžově, svalovina do červena) (obr. **8a-b**, **9a-b**, **10a**) v kombinaci s Massonovým zeleným trichromem, který zvýrazňuje patologická změny jednotlivých složek tkáně (jádra jsou tmavá až černá, keratin, erythrocyty, cytoplazma, a svalovina se barví jasně červeně, kolagen zeleně) (obr. **6a-b**, **10b**, **11a-b**). Pro zvýraznění parazitární infekce bylo nejpřínosnější barvení Giemsou (obr. **7a-b**), které více zviditelnilo leishmanie i infiltrované krvinky (buněčná jádra se jeví modro fialová, cytoplazma se barví světle modře až fialově, erythrocyty jsou růžové až načervenalé). Barvení Heidenhainovým azanem (obr. **5a-b**) podobně jako Massonův zelený trichrom nejlépe zvýrazňuje histopatologické změny tkáně (jádra se barví červeně a cytoplazma výrazně do modra), nicméně jeho kontrastnost je oproti Massonově zelenému trichromu výrazně horší, jelikož zanikají podstatné detaily a rozdíly.

#### 4.2 Výběr vhodné fixáže pro souběžné histopatologické a imunohistochemické analýzy, a testování vlivu slin flebotoma na přítomnost imunitních složek v místě sání v závislosti na časovém odstupu mezi posledním sáním a odběrem tkáně

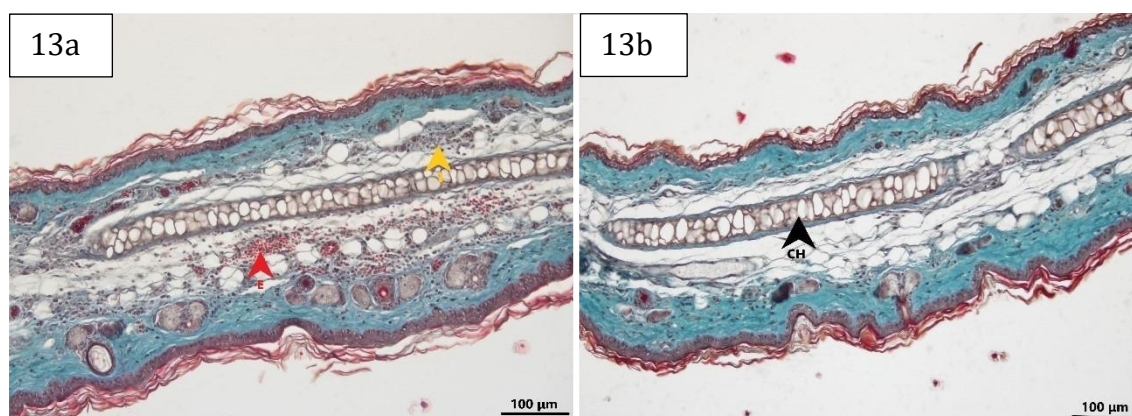
Na BALB/c myších opakovaně sátých *Phlebotomus papatasi* byla během **pokusu 2** testována přítomnost imunitních buněk v místě sání v závislosti na časovém rozestupu mezi sáním a odběrem tkáně. Odběr tkáně byl proveden ve dvou časových rozestupech a to 48 hodin nebo 1 týden po posledním sání. Testovali jsme také vhodnou fixáž pro histopatologické i imunohistochemické (IHC) analýzy s cílem nejefektivnějšího zpracování dané tkáně pro více souběžných analýz, což by umožnilo redukovat počty laboratorních zvířat potřebných k vyhodnocení sledovaných změn. Vzorky byly fixovány v zinkové fixáži bez formalinu nebo 4% PFA (fixace kratší než 18 hodin a skladování v 70% etanolu) a barveny všemi histologickými barvenými uvedenými v **pokusu 1**. Vyhodnocení histologického barvení bylo provedeno pomocí světlené mikroskopie v procházejícím světle. Pro IHC byly použity primární protilátky rozpoznávající **inducibilní syntázu oxidu dusnatého** (iNOS, enzym exprimovaný nejčastěji makrofágy a katalyzující reakci, při které vzniká NO) pro vizualizaci aktivovaných makrofágů nebo **myeloperoxidázu** (MPO, hemoprotein hojně exprimovaný neutrofilů a sekretovaný během jejich aktivace) pro vizualizaci aktivovaných neutrofilů. V obou případech byla jádra všech buněk podbarvená fluorescenčním barvivem Hoechst 33342 (barví DNA) a vyhodnocení IHC provedeno pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie.

Všeobecně lze říci, že zinková fixáž způsobovala v ušních boltcích horší zachování morfologie jader oproti vzorkům fixovaným ve 4% PFA. Barvitelnost řezů byla srovnatelná u obou použitých fixací (obr. **12-19a-b**). Nezávisle na typu fixace, histologická analýza prokázala, že bezprostředně po sání flebotoma dochází k rychlé a hojné infiltraci zánětlivých buněk (obr. **12a-19a, 21a-b, 22a-d**). Imunozačení myeloperoxidázy (MPO) navíc potvrdilo i zvýšený výskyt aktivovaných neutrofilů (obr. **21a-b, 22a-d**). V tkáních odebraných 1 týden po posledním sání byl již patrný pokles buněčného infiltrátu (obr. **12a-19a, 26b**) a nebyly zachycené téměř žádné

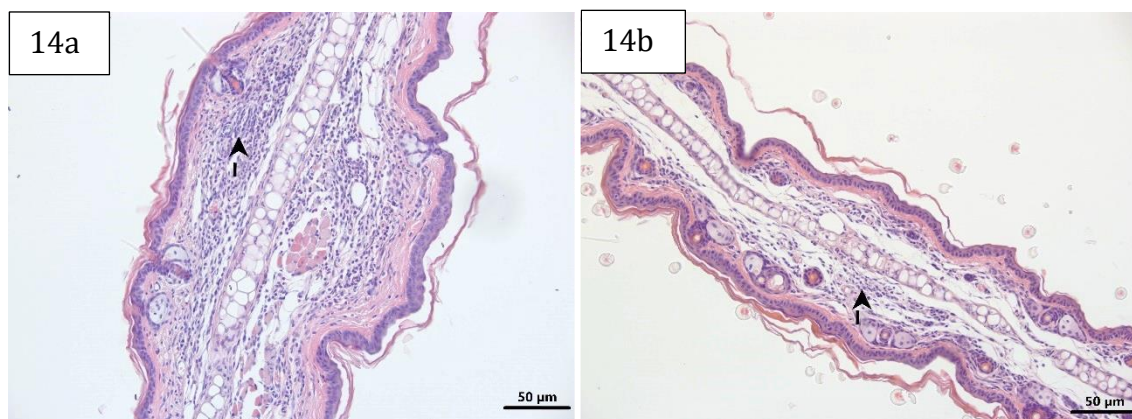
aktivované neutrofilů (obr. **26a-b**). Zvýšený výskyt makrofágů pozitivních na iNOS se naopak vyskytoval ve vzorcích odebraných v pokročilejším stádiu imunitní odpovědi, tedy u vzorků odebraných 1 týden po posledním sání (obr. **23a-b**, **24a-b** a **25a-b**).



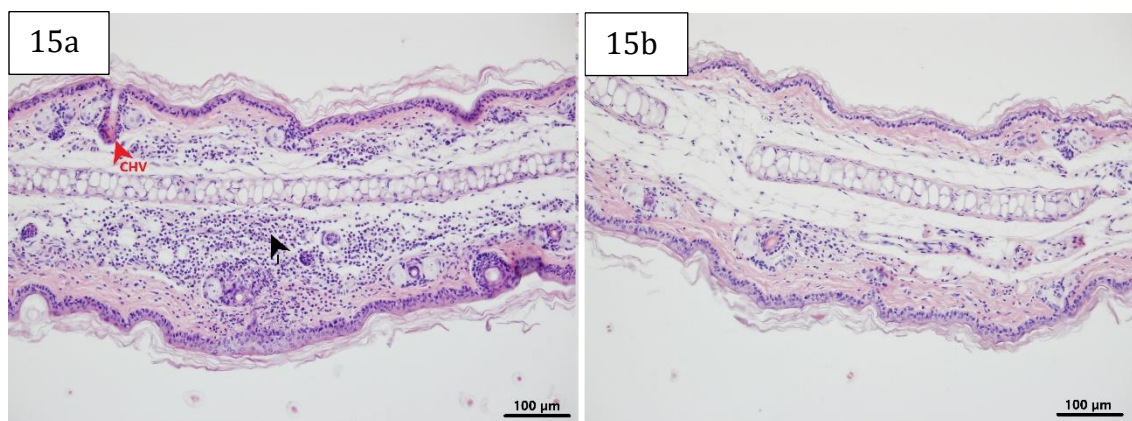
**Obrázek 12.** Příčný řez ušním boltcem myši sítě *Phlebotomus papatasi*. Fixace v 4% PFA, Massonův zelený trichrom. **a)** Odběr tkáně 48 hodin po posledním sání **b)** Odběr tkáně 1 týden po posledním sání. *E* – shluk erytrocytů, *I* – zánětlivý infiltrát, *CH* – chrupavka, *SC* – stratum corneum, *P* – pojivo.



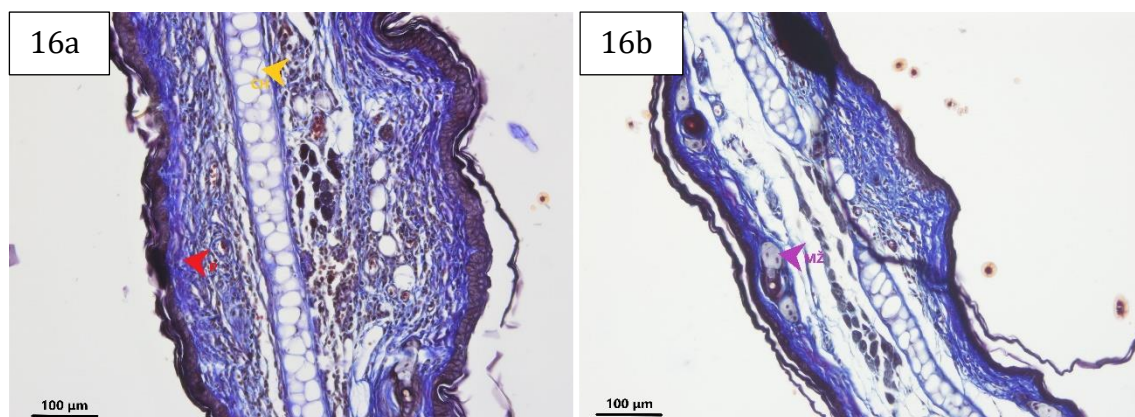
**Obrázek 13.** Příčný řez ušním boltcem myši sítě *Phlebotomus papatasi*. Zinková fixáž, Massonův zelený trichrom. **a)** Odběr tkáně 48 hodin po posledním sání. **b)** Odběr tkáně 1 týden po posledním sání. *CH* – chrupavka, *I* – zánětlivý infiltrát, *E* – shluk erytrocytů.



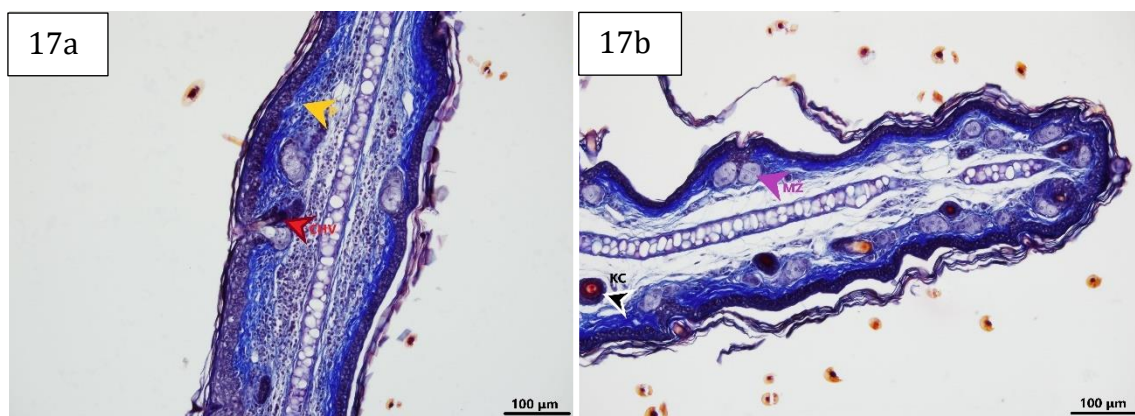
**Obrázek 14.** Příčný řez ušním boltcem myši sítě *Phlebotomus papatasi*. Fixace v 4% PFA, hematoxylin-eozin. **a)** Tkáň odebraná 48 hodin po posledním sání s masivním buněčným infiltrátem. **b)** Tkáň odebraná 1 týden po posledním sání s již patrným poklesem infiltrátu. *I* – shluk zánětlivého infiltrátu.



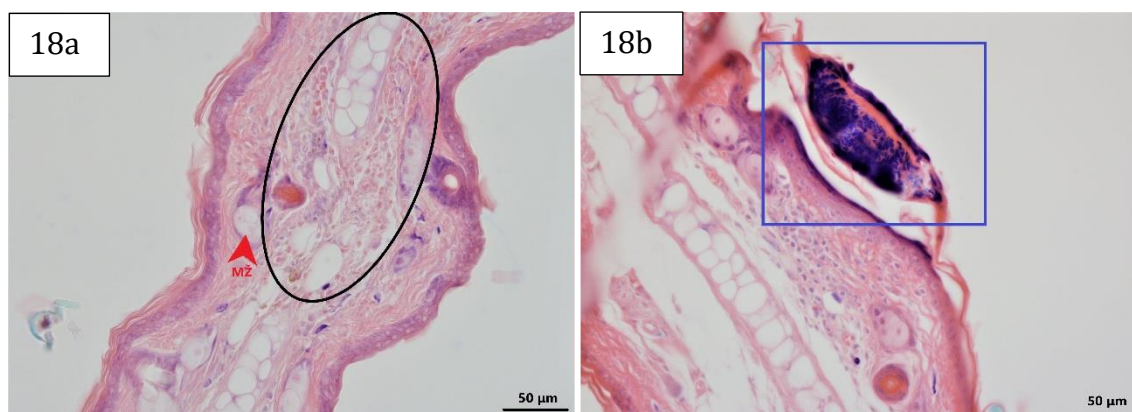
**Obrázek 15.** Příčný řez ušním boltcem myši sítě *Phlebotomus papatasi*. Zinková fixáž, hematoxylin-eozin. **a)** Odběr tkáně 48 hodin po posledním sání. **b)** Odběr tkáně 1 týden po posledním sání. *CHV* – chlupový váček, *I* – shluk zánětlivého infiltrátu.



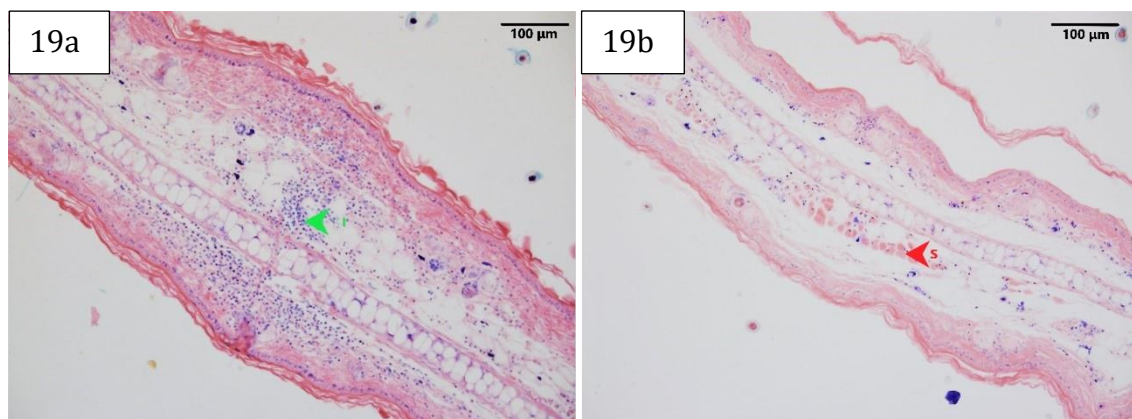
**Obrázek 16.** Příčný řez ušním boltcem myši sáté *Phlebotomus papatasi*. Fixace v 4% PFA, Heidenhainův azan. **a)** Tkáň odebraná 48 hodin po posledním sání s masivním buněčným infiltrátem. **b)** Tkáň odebraná 1 týden po posledním sání s již patrným poklesem infiltrátu. *Žlutá šipka* – chrupavka, *červená šipka* – pojivo, *fialová šipka* – mazová žláza.



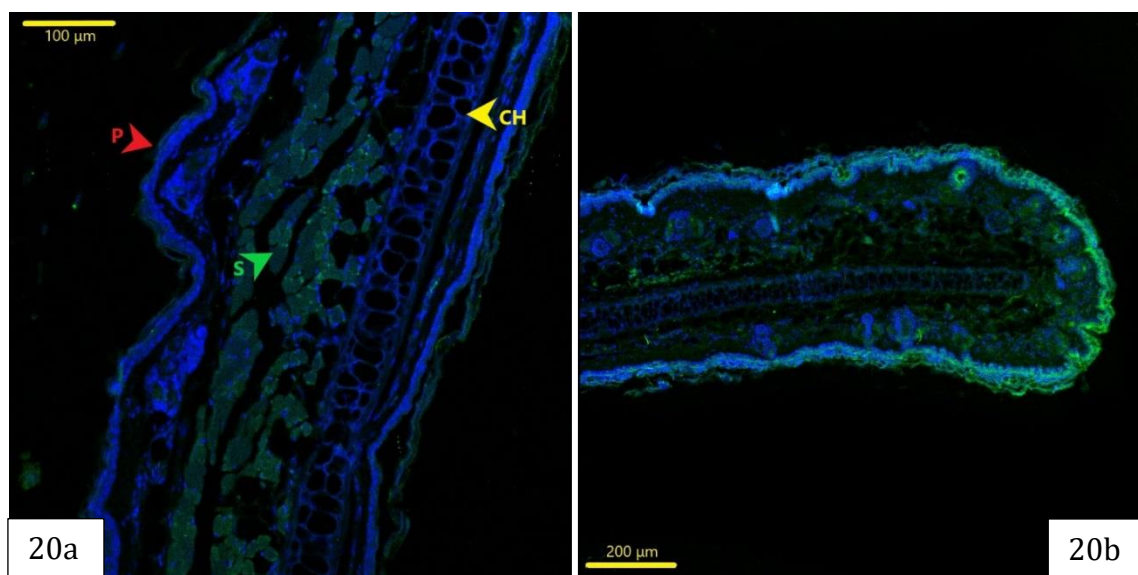
**Obrázek 17.** Příčný řez ušním boltcem myši sáté *Phlebotomus papatasi*. Zinková fixáž, Heidenhainův azan. **a)** Odběr tkáně 48 hodin po posledním sání s hojným infiltrátem neutrofilů. **b)** Odběr tkáně 1 týden po posledním sání již téměř bez infiltrátu. *Červená šipka* – chlupový váček, *žlutá šipka* – pojivo, *fialová šipka* – mazová žláza, *černobílá šipka* – krevní céva.



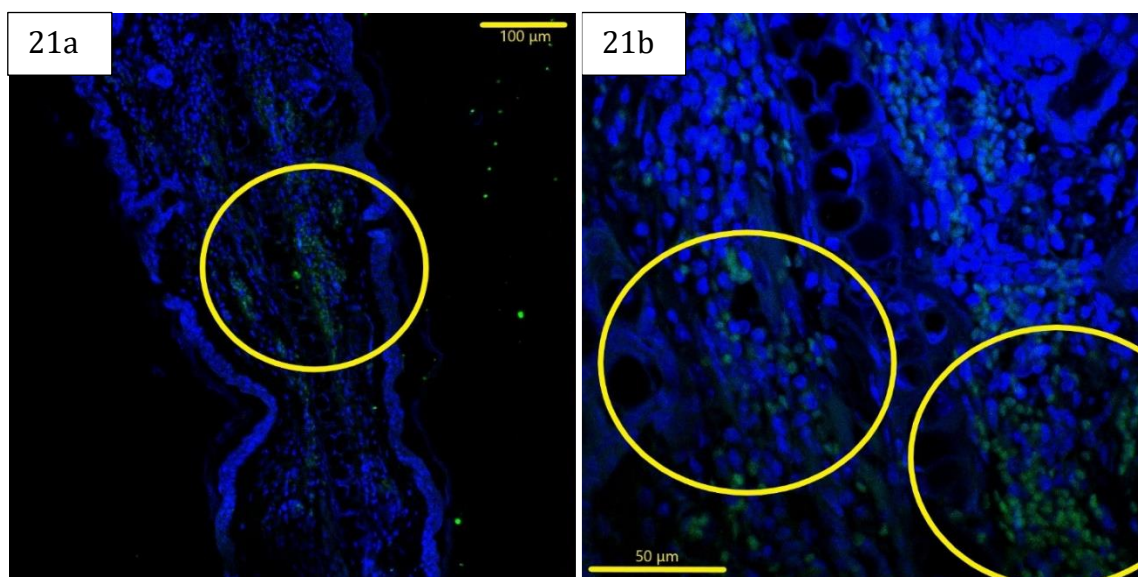
**Obrázek 18.** Příčný řez ušním boltcem myši sítě *Phlebotomus papatasi*. Fixace v 4% PFA, Giemsa. **a)** Tkáň odebraná 48 hodin po posledním sání s buněčným infiltrátem. **b)** Tkáň odebraná 1 týden po posledním sání s patrným poklesem infiltrátu. *Elipsa* – buněčný infiltrát, *čtverec* – odvržený buněčný infiltrát (pravděpodobně způsobený procesem hojení), *MŽ* – mazová žláza.



**Obrázek 19.** Příčný řez ušním boltcem myši sítě *Phlebotomus papatasi*. Zinková fixaž, Giemsa. **a)** Odběr tkáňe 48 hodin po posledním sání s masivním buněčným infiltrátem. **b)** Odběr tkáňe 1 týden po posledním sání se značným poklesem buněčného infiltrátu. *Červená šipka* – svaly, *zelená šipka* – shluky zánětlivého infiltrátu prostupujícího chrupavkou.

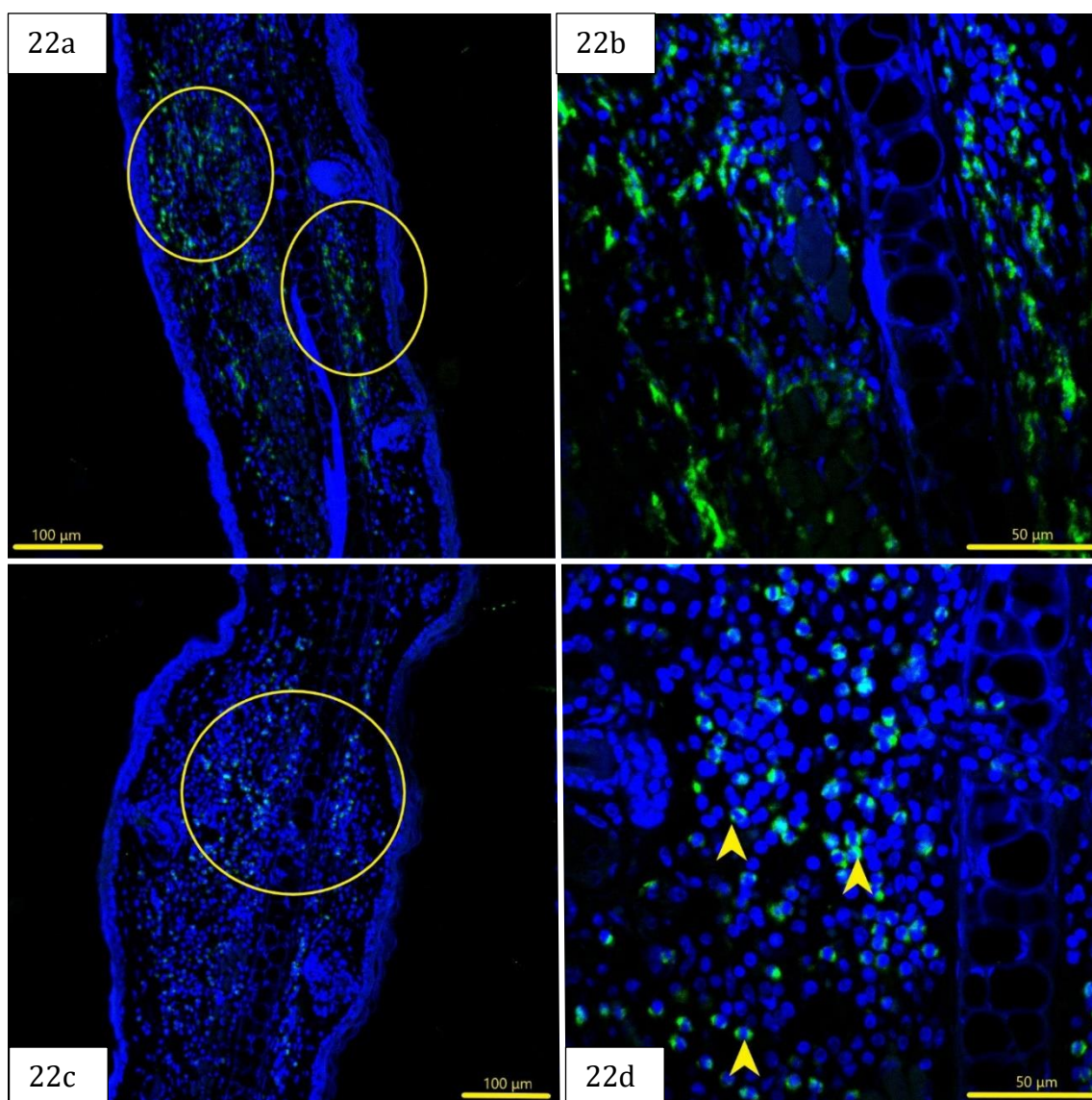


**Obrázek 20.** Fluorescenční vizualizace aktivovaných makrofágů (imuno značení iNOS, zelená) a buněčných jader (Hoechst, modrá) v příčném řezu ušním boltcem myši sítě *Phlebotomus papatasi* s odběrem tkáně 48 hodin po posledním sání. Aktivované makrofágy dle výsledku nejsou přítomny. **a)** Fixace v 4% PFA. **b)** Zinková fixáž. S – svalová vlákna, CH – elastická chrupavka, P – pokožka.

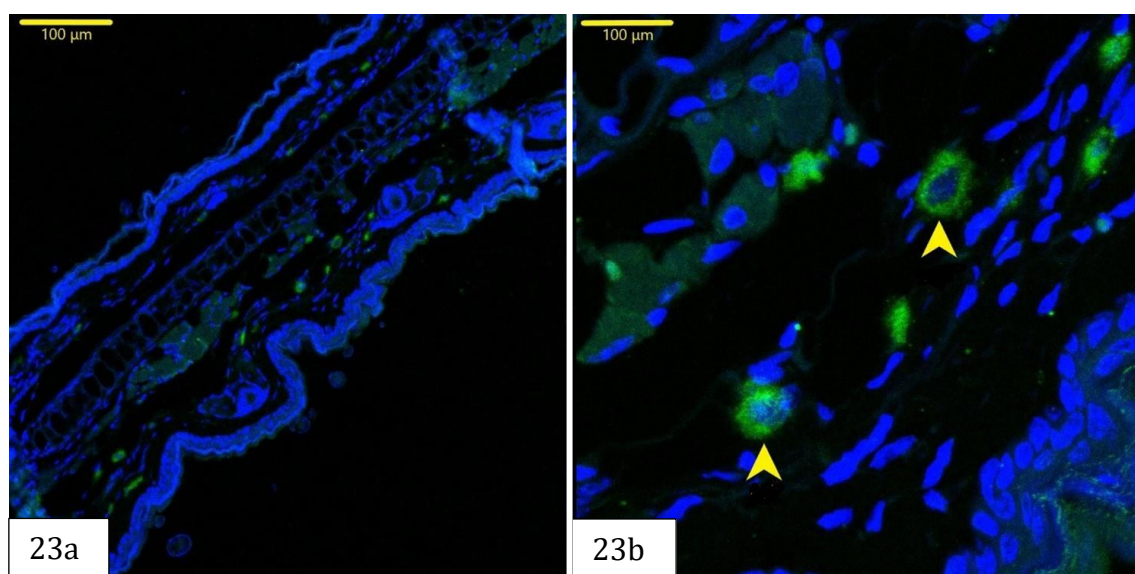


**Obrázek 21.** Fluorescenční vizualizace aktivovaných neutrofilů (imuno značení MPO, zelená) a buněčných jader (Hoechst, modrá) v příčném řezu ušního boltce myši sítě *Phlebotomus papatasi* s odběrem tkáně 48 hodin po posledním sání. Fixace v 4% PFA. **a)** Celkový pohled na buněčný infiltrát s aktivovanými neutrofilů (zakroužkovaná oblast). **b)** Detail infiltrované oblasti s aktivovanými neutrofilů (zakroužkováno).

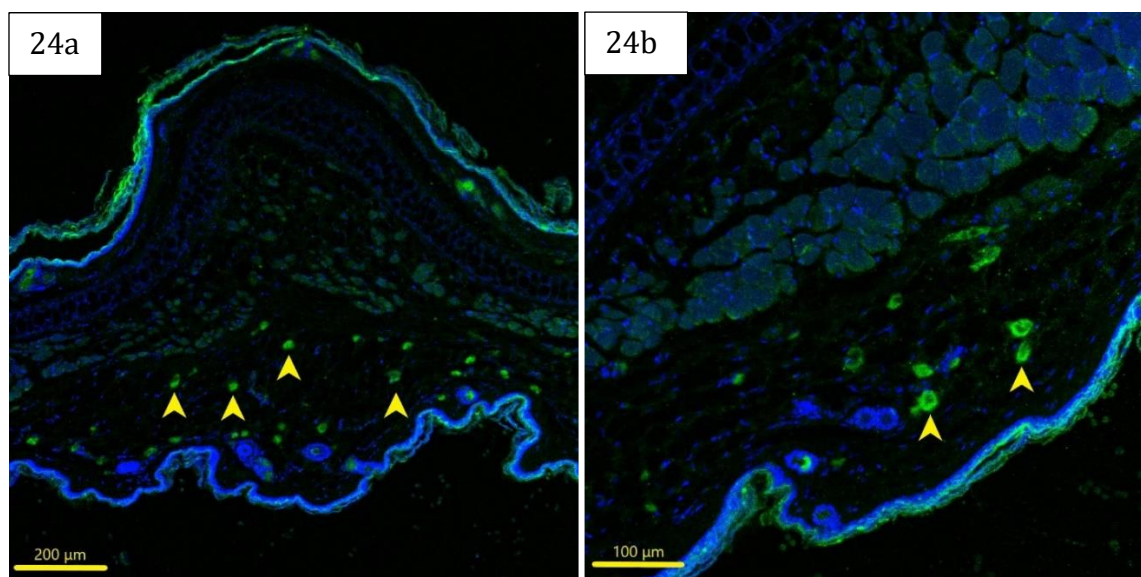




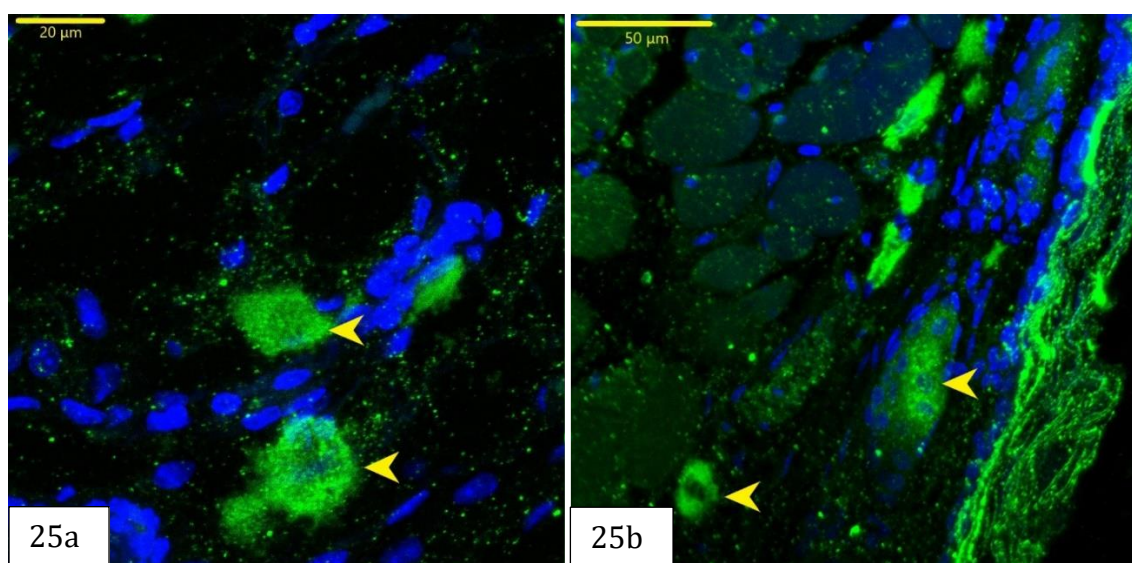
**Obrázek 22.** Fluorescenční vizualizace aktivovaných neutrofilů (imunoznačení MPO, zelená) a buněčných jader (Hoechst, modrá) v příčném řezu ušního boltce myši sítě *Phlebotomus papatasi* s odběrem tkáně 48 hodin po posledním sání. Zinková fixáž. **a)** Infiltrace neutrofilů v různých místech (zakroužkované oblasti). **b)** Detail buněčného infiltrátu s četnými aktivovanými neutrofily. **c)** Shluk aktivovaných neutrofilů v domnělém místě vpichu flebotoma (zakroužkovaná oblast). **d)** Detail infiltrátu s aktivovanými neutrofily (některé jsou označené šipkami) v místě sítě flebotoma.



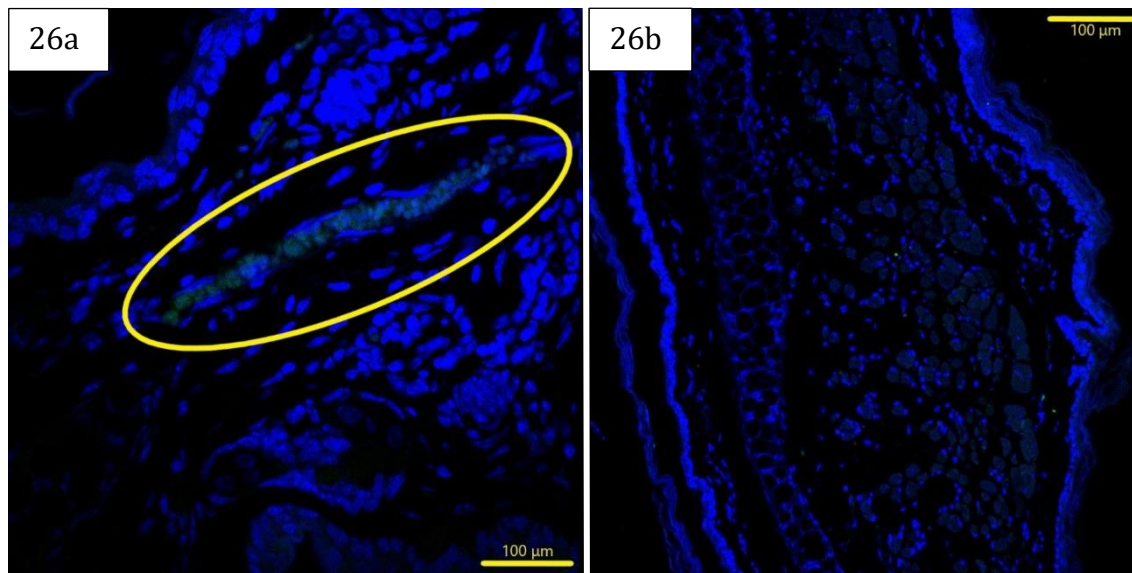
**Obrázek 23.** Fluorescenční vizualizace aktivovaných makrofágů (imunoznačení iNOS, zelená) a buněčných jader (Hoechst, modrá) v příčném řezu ušního boltce myši sítě *Phlebotomus papatasi* s odběrem tkáně 1 týden po posledním sání. Fixace v 4% PFA. **a)** Celkový pohled na oblast s aktivovanými makrofágy. **b)** Detail aktivovaných makrofágů (některé jsou označené šipkami).



**Obrázek 24.** Fluorescenční vizualizace aktivovaných makrofágů (imunoznačení iNOS, zelená) a buněčných jader (Hoechst, modrá) v příčném řezu ušního boltce myši sítě *Phlebotomus papatasi* s odběrem tkáně 1 týden po posledním sání. Zinková fixáž. **a)** Celkový pohled a **b)** detail buněčného infiltrátu s aktivovanými makrofágy (některé jsou označené šipkami).



**Obrázek 25.** Fluorescenční vizualizace aktivovaných makrofágů (imunoznačení iNOS, zelená) a buněčných jader (Hoechst, modrá) v příčném řezu ušního boltce myši sítě *Phlebotomus papatasi* s odběrem tkáně 1 týden po posledním sání. Zinková fixáž. **a, b)** Detail aktivovaných makrofágu (označené šipkami).



**Obrázek 26.** Fluorescenční vizualizace aktivovaných neutrofilů (imunoznačení MPO, zelená) a buněčných jader (Hoechst, modrá) v příčném řezu ušního boltce myši sítě *Phlebotomus papatasi* s odběrem tkáně 1 týden po posledním sání. Aktivované neutrofilie nejsou dle výsledků přítomny. **a)** Fixace v 4% PFA (značená oblast představuje krevní cévu). **b)** Zinková fixáž.

Během IHC je vedlejším nežádoucím účinkem zinkové fixáže nespecifické značení pokožky a chlupových váčků protilátkou proti iNOS, ale na rozdíl od 4% PFA lépe zachovává celkovou antigenicitu tkáně (obr. **20b**, **22a-d**, **24a-b**, **25a-b**, **26b**) bez potřeby odmaskování antigenů (alespoň u použitých protilátek). Vzorky fixované v 4% PFA a skladované v 70% etanolu vykazují nižší intenzitu imunoznačení (fluorescenčního signálu), ale výhodou je, že pokožka a vlasové váčky se při značení iNOS nespecificky nezvýrazňují (obr. **20a**, **21a-b**, **23a-b**, **26a**). Celkově se jeví jako vhodnější použití zinkové fixáže u tkání, u kterých se předpokládá kombinace histopatologických a IHC analýz, což je právě případ této studie.

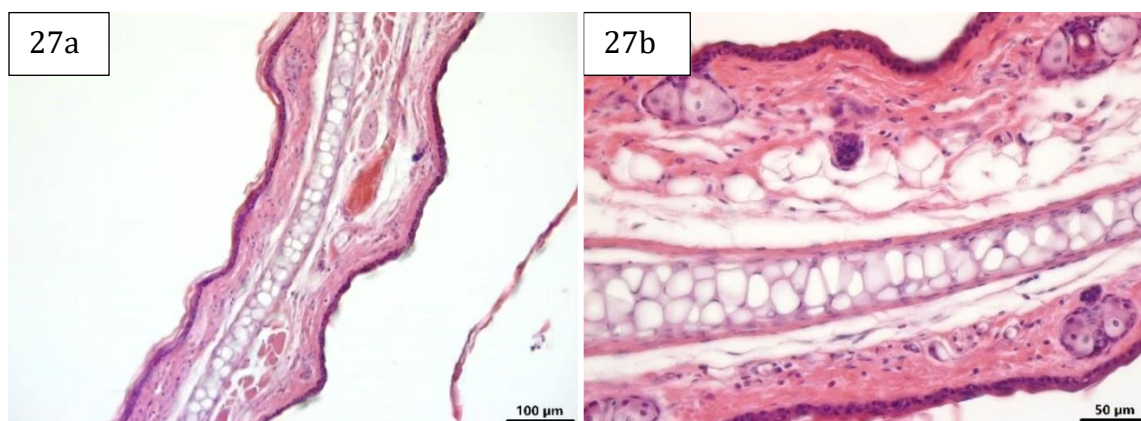
### 4.3 Testování průběhu infekce druhem *Leishmania major* u myší infikovaných 48 hodin nebo 1 týden po posledním sání

Během **pokusu 3** byl testován průběh kožní leishmaniózy u různých skupin myší. První skupina myší byla infikována  $10^4$  leishmáníí 48 hodin po posledním sání samicemi *P. duboscqi*. U druhé skupiny byl sledován průběh onemocnění u myší infikovaných 1 týden po posledním sání flebotomů stejnou infekční dávkou *L. major* jako předchozí skupina. Ve třetí skupině se nacházeli jedinci nesátí, pouze infikovaní (pozitivní kontrola) a čtvrtá skupina sloužila jako negativní kontrola, tedy zahrnovala jedince neinfikované leishmaniemi a nesáté flebotomy. Všechny myši byly usmrceny ve stejné době, a to v 5. týdnu po infekci (neinfikované myši byly usmrceny ve stejném časovém intervalu).

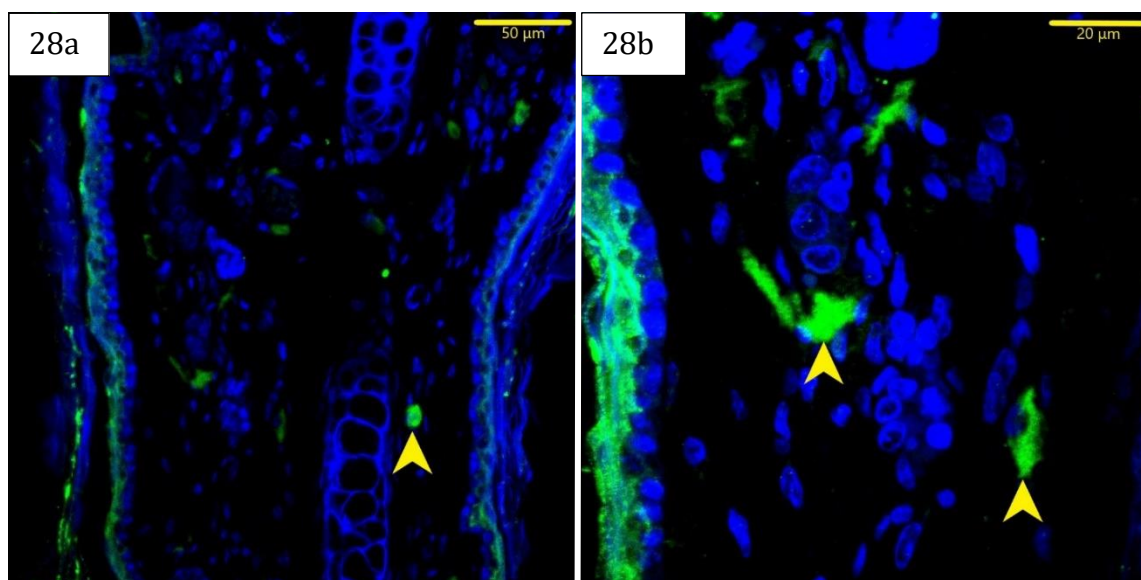
Všechny odebrané ušní boltce byly na základě předchozích zjištění fixovány v zinkové fixáži, zpracovány dle výše uvedených laboratorních postupů a barveny všemi druhy histologických barvení nebo zpracovány pro protilátkové značení enzymů iNOS a MPO u aktivovaných imunitních buněk (podbarvení jader pomocí barviva Hoechst). Vyhodnocení histologického barvení bylo opět provedeno pomocí světlené mikroskopie v procházejícím světle a IHC analýza byla provedena pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie.

Stejně jako u předchozích experimentů pro zvýraznění zánětlivého infiltrátu se nejvíce vhodnou metodou barvení ukázal být hematoxylin-eozin a Giemsa, a proto slouží jako základ pro vyhodnocení histopatologických změn v této podkapitole.

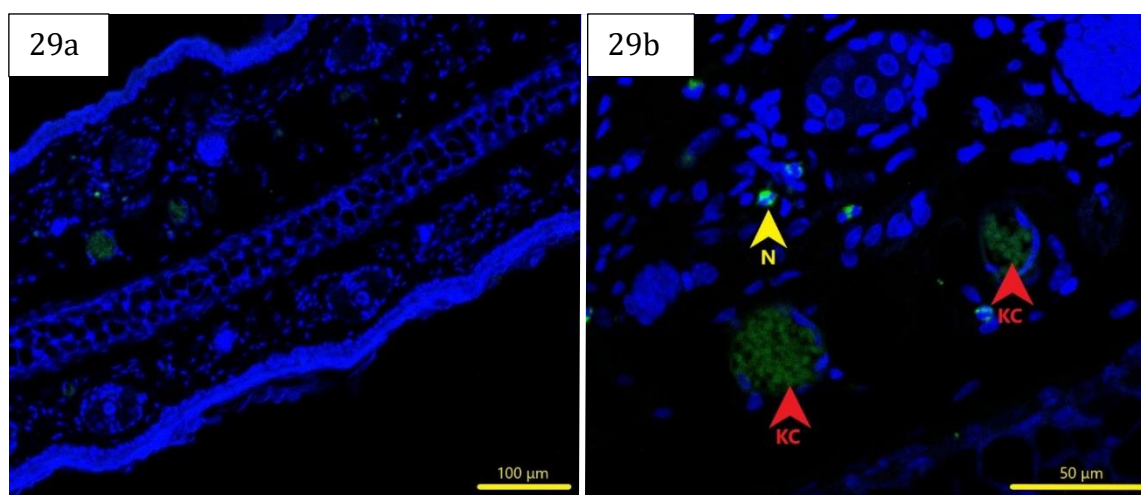
Tkáň negativní, tj. flebotomem nesáté a leishmaniemi neinfikované myši nevykazuje žádné známky histopatologických změn (obr. 27a-b) a ani zvýšenou aktivaci neutrofilů či makrofágů. Nicméně i u těchto myší lze v některých případech pozorovat ojedinělý výskyt aktivovaných imunitních buněk (neutrofilů i makrofágů) ve tkáni ušního boltce (obr. 28a-b, 29a-b).



**Obrázek 27.** Ušní boltce nesáté a neinfikované myši. Hematoxylin-eozin. **a)** Celkový pohled a **b)** detail ušního boltce.

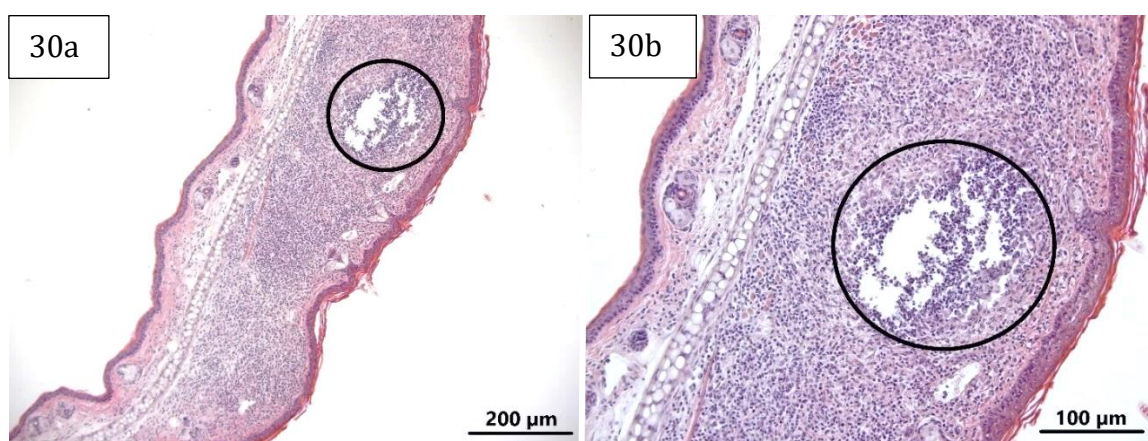


**Obrázek 28.** Fluorescenční vizualizace aktivovaných makrofágů (imunoznačení iNOS, zelená) a buněčných jader (Hoechst, modrá) v příčném řezu ušního boltce nesáté a neinfikované myši. **a)** Celkový pohled a **b)** Detail aktivovaných makrofágů (některé jsou označeny šipkami).

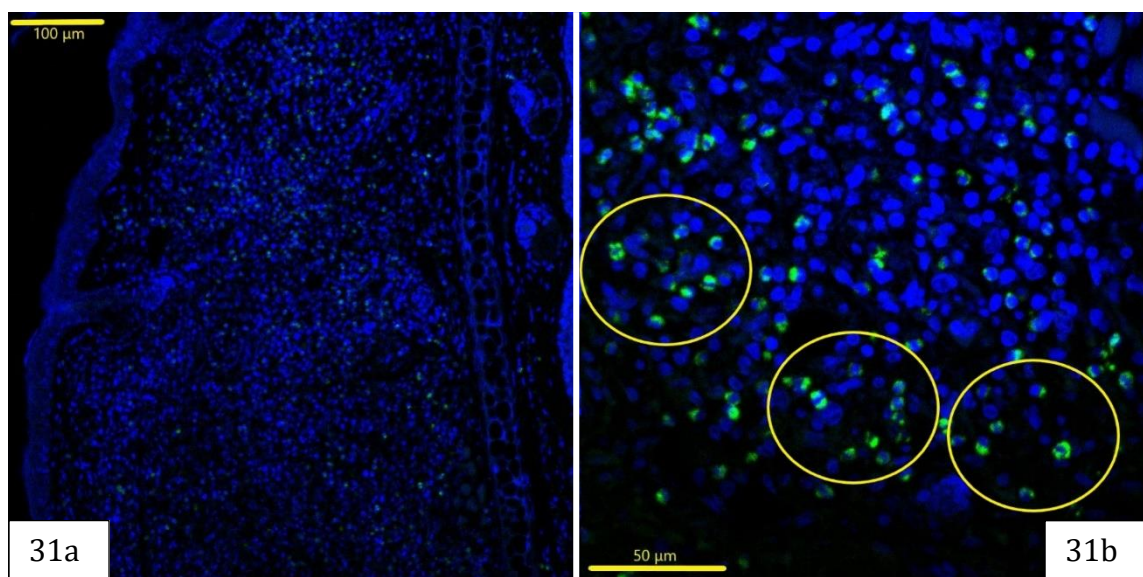


**Obrázek 29.** Fluorescenční vizualizace aktivovaných neutrofilů (imunoznačení MPO, zelená) a buněčných jader (Hoechst, modrá) v příčném řezu ušního boltce nesáté a neinfikované myši. **a)** Celkový pohled a **b)** detail oblasti s aktivovanými neutrofilými (jeden z nich je označen žlutou šipkou). Cévy s erytrocyty (červená šipka) s autofluorescencí.

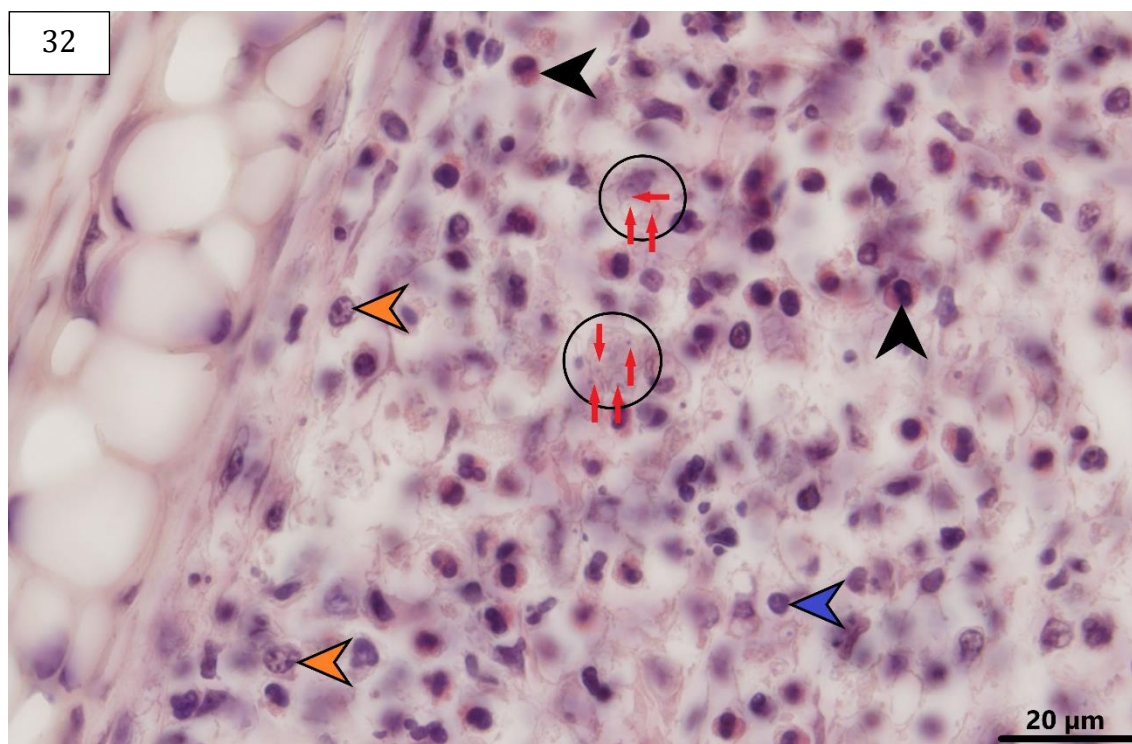
U myši infikovaných 48 hodin po posledním sání flebotomem se vzniklá léze jeví jako nekrotická se silnou infiltrací zánětlivých buněk (obr. 30a-b) včetně aktivovaných forem (obr. 31a-b) a značným obsahem nekrotizovaného buněčného materiálu v centru léze. I když histologické barvení odhalilo shluky makrofágů s amastigoty (obr. 32), výskyt makrofágů pozitivních na iNOS je spíše ojedinělý a převažuje na periferii léze (obr. 33a-b).



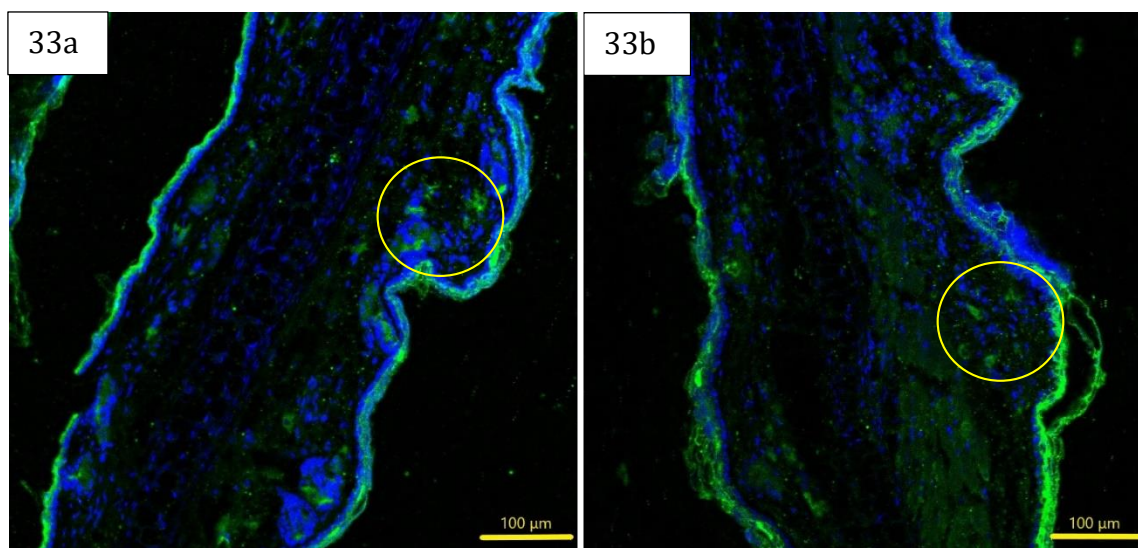
**Obrázek 30.** Ušní boltec myši infikované *Leishmania major* 48 hodin po posledním sání *Phlebotomus duboscqi*. Hematoxylin-eozin. **a)** Celkový pohled a **b)** detail léze s masivní buněčnou infiltrací a destrukcí tkáně v souvislosti s pokročilým stádiem infekce (označeno kruhem).



**Obrázek 31.** Fluorescenční vizualizace aktivovaných neutrofilů (imunoznačení MPO, zelená) a buněčných jader (Hoechst, modrá) v příčném řezu ušního boltce myši infikované *Leishmania major* 48 hodin po posledním sání *Phlebotomus duboscqi*. **a)** Celkový pohled na lézi s buněčným infiltrátem. **b)** Detailnější pohled na shluky aktivovaných neutrofilů (některé jsou označeny kruhy).

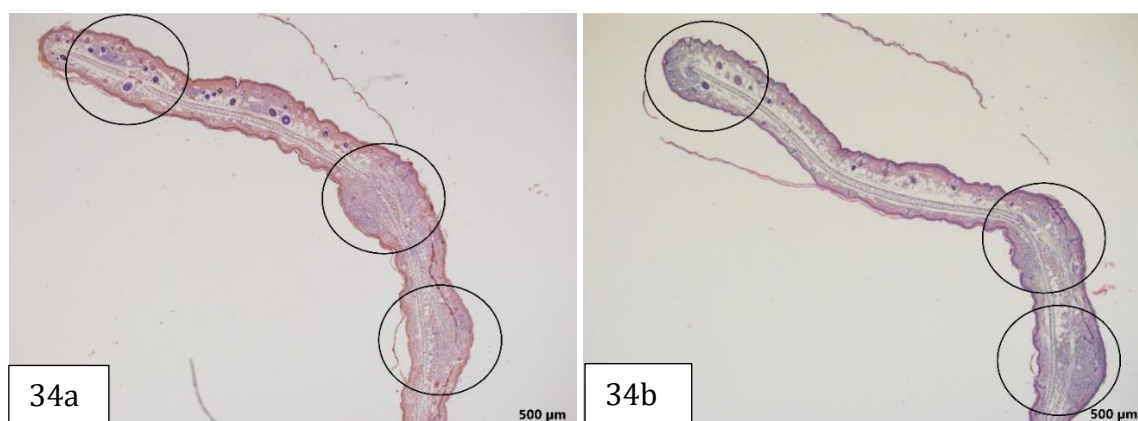


**Obrázek 32.** Detail okraje kožní léze v ušním boltci myši infikované *Leishmania major* 48 hodin po posledním sání *Phlebotomus duboscqi*, makrofágy (některé jsou zakroužkované) s amastigoty leishmanií (červené šipky). Hematoxylin-eozin. *Oranžové šipky* – neutrofily, *černé šipky* – eozinofily, *modrá šipka* – lymfocyt.



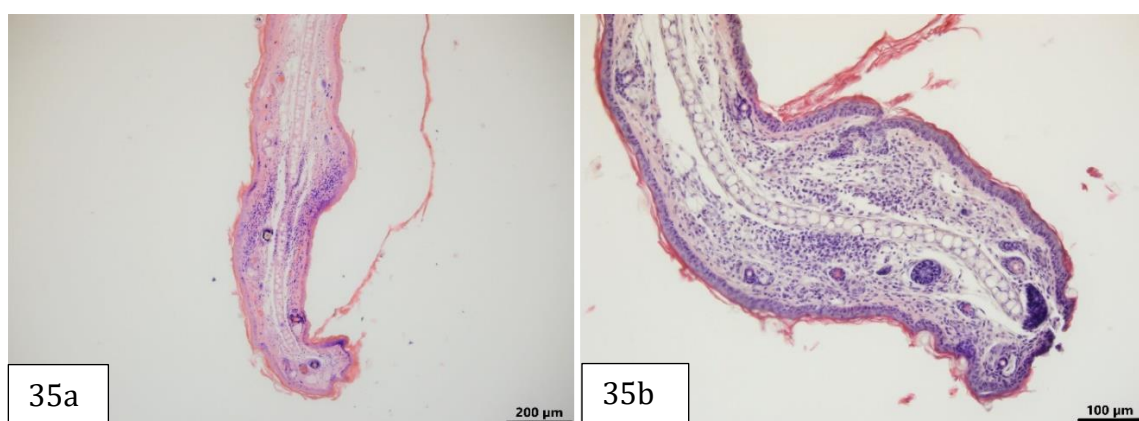
**Obrázek 33.** Fluorescenční vizualizace aktivovaných makrofágů (imunoznačení iNOS, zelená) a buněčných jader (Hoechst, modrá) v příčném řezu ušního boltce myši infikované *Leishmania major* 48 hodin po posledním sání *Phlebotomus duboscqi*. **a, b)** Různé oblasti s menší lézí vykazující místy slabší fluorescenční signál (příklad zakroužkován).

U myši infikovaných leishmaniami 1 týden po posledním sání jsou patrná menší ložiska imunitní reakce v různých místech, včetně okrajů ušního boltce, s ještě přetrvávající infiltrací aktivovaných neutrofilů (obr. 34a-b, 35a-b, 36a-b). V tuto dobu už lze pozorovat i masivní infiltraci hostitelskými makrofágy napříč celou lézí (obr. 37, 39) a jejich aktivaci směrem k produkci NO (obr. 40a-b, 41a-b).

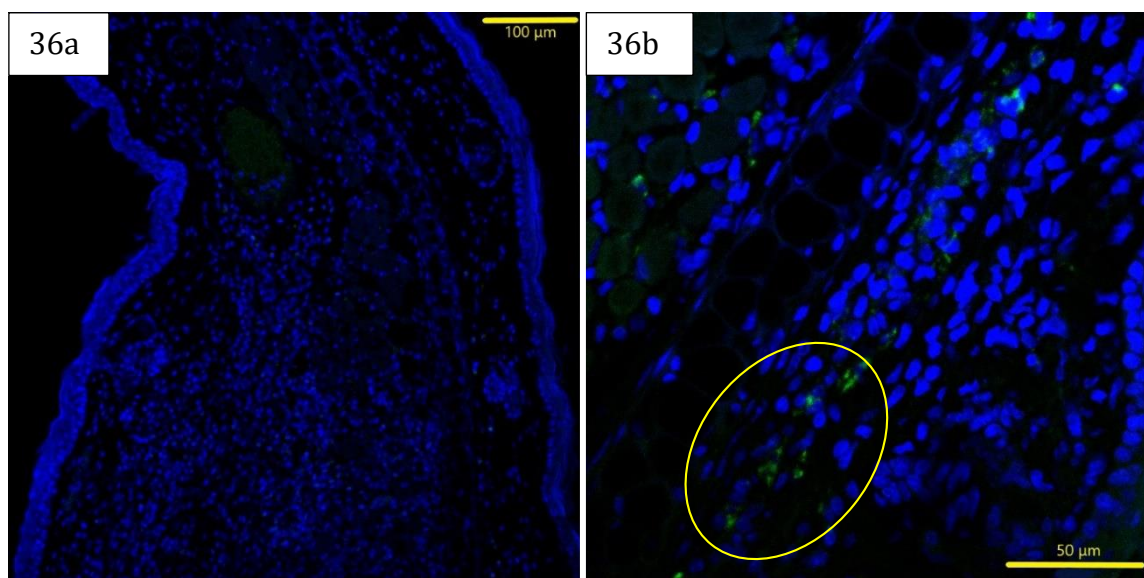


**Obrázek 26.** Ložiska imunitní reakce v ušním boltci myši infikované *Leishmania major* 1 týden po posledním sání *Phlebotomus duboscqi*. **a)** Barvení Giemsa a **b)** hematoxylin eozin. Kruhy označují zbylá ložiska téměř vyhojené léze a s ještě probíhající imunitní reakcí.

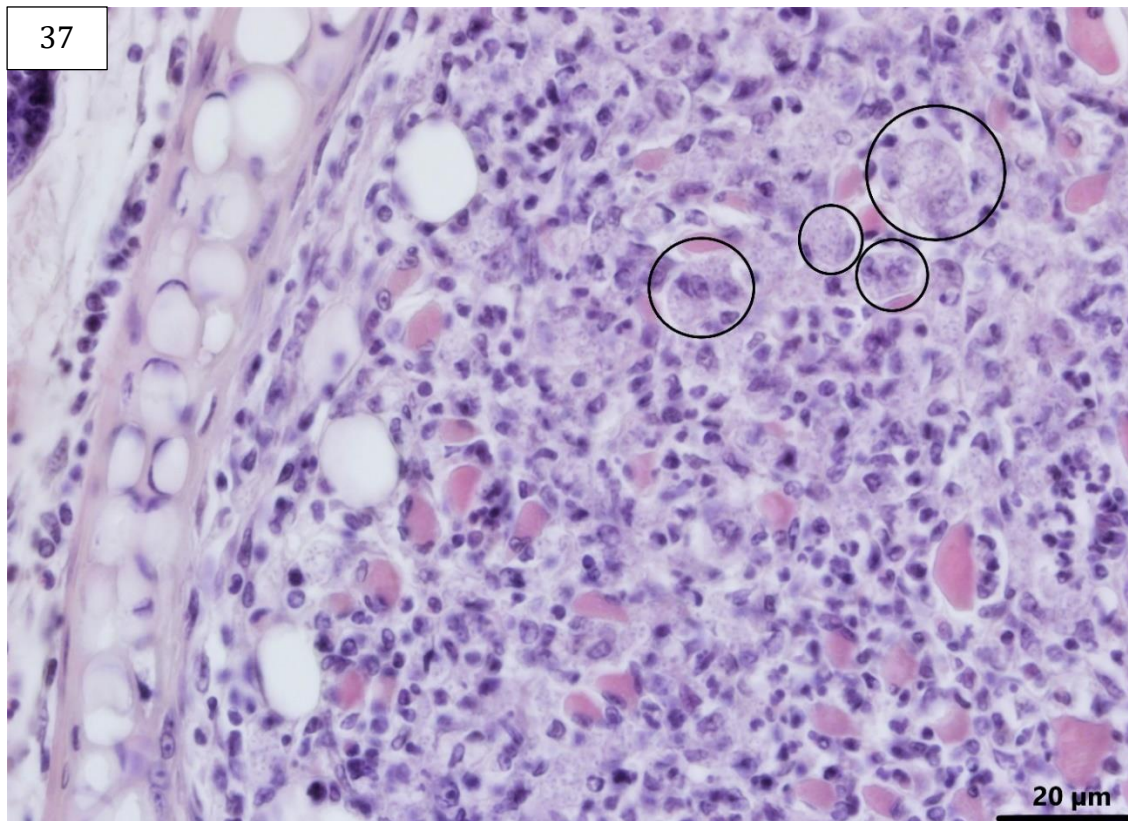




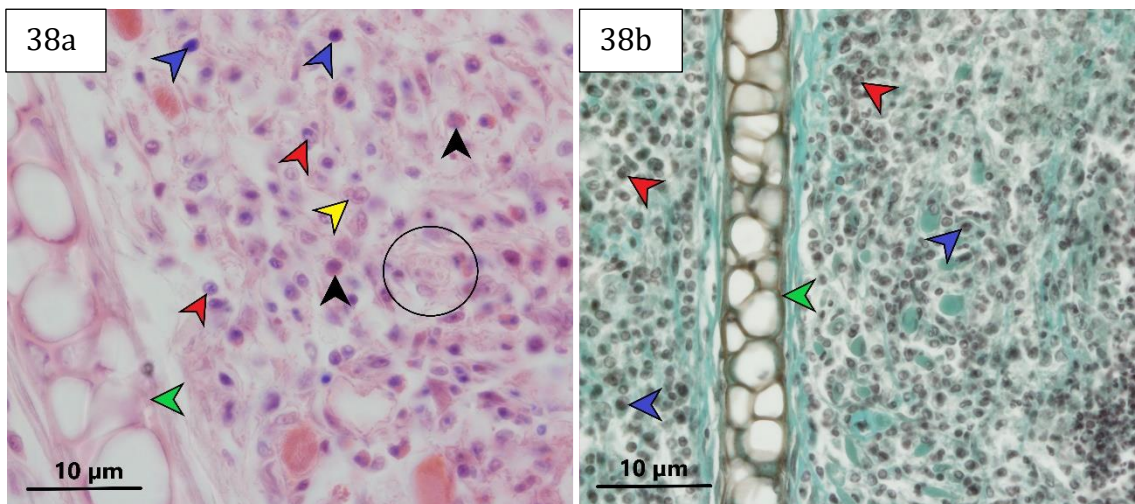
**Obrázek 35.** Imunitní reakce v okraji ušního boltce myši infikované *Leishmania major* 1 týden po posledním sání *Phlebotomus duboscqi*. **a)** Barvení Giemsa a **b)** hematoxylin-eozin.



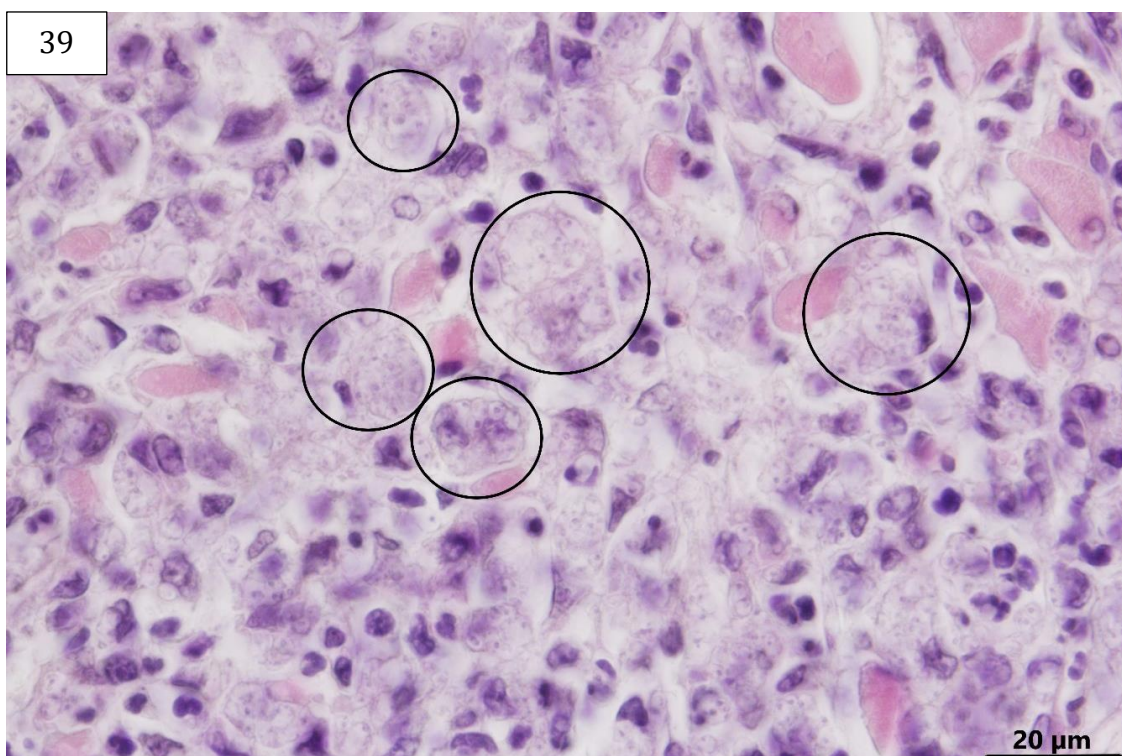
**Obrázek 36.** Fluorescenční vizualizace aktivovaných neutrofilů (imunoznačení MPO, zelená) a buněčných jader (Hoechst, modrá) v příčném řezu ušního boltce myši infikované *Leishmania major* 1 týden po posledním sání *Phlebotomus duboscqi*. **a)** Imunitní reakce probíhající uvnitř kožní léze. **b)** Detail buněčného infiltrátu s aktivovanými neutrofily (příklad zakroužkovaný).



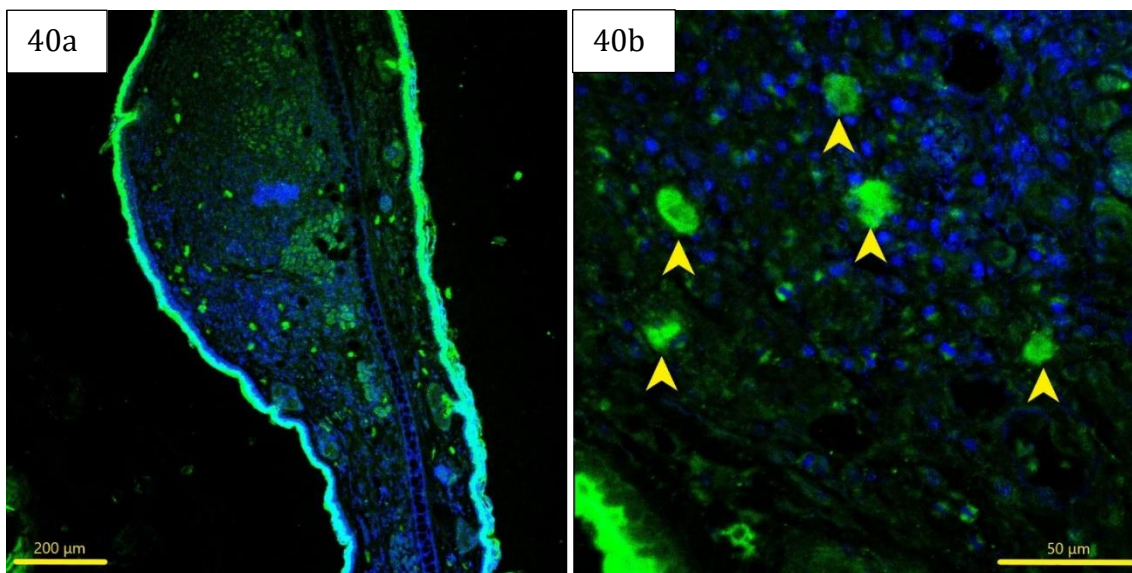
**Obrázek 37.** Okraje léze ušního boltce myši infikované *Leishmania major* 1 týden po posledním sání *Phlebotomus duboscqi* s masivní infiltrací makrofágy (některé jsou zakroužkované). Hematoxylin-eozin.



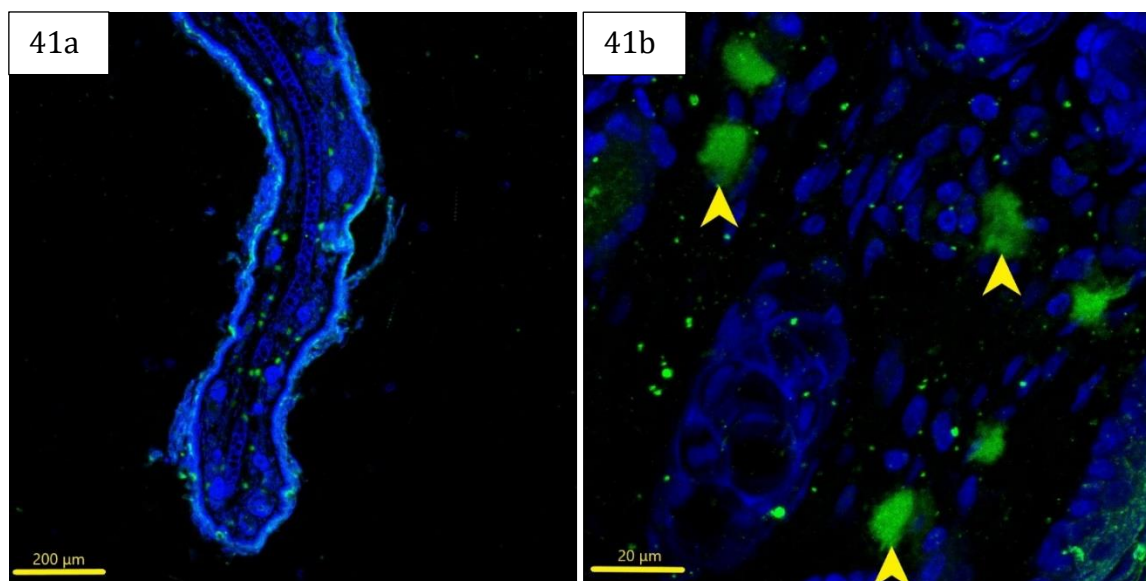
**Obrázek 38.** Detail léze ušního boltce myši infikované *Leishmania major* 1 týden po posledním sání *Phlebotomus duboscqi* s buněčným infiltrátem. Červené šipky – neutrofily, modré šipky – lymfocyty, černé šipky – eozinofily, žlutá šipka – žírná buňka, zelená šipka – chrupavka, kruh – makrofág s amastigoty.



**Obrázek 39.** Detail léze ušního boltce myši infikované *Leishmania major* 1 týden po posledním sání *Phlebotomus duboscqi* s masivní infiltrací makrofágy (některé jsou zakroužkované). Hematoxylin-eozin.

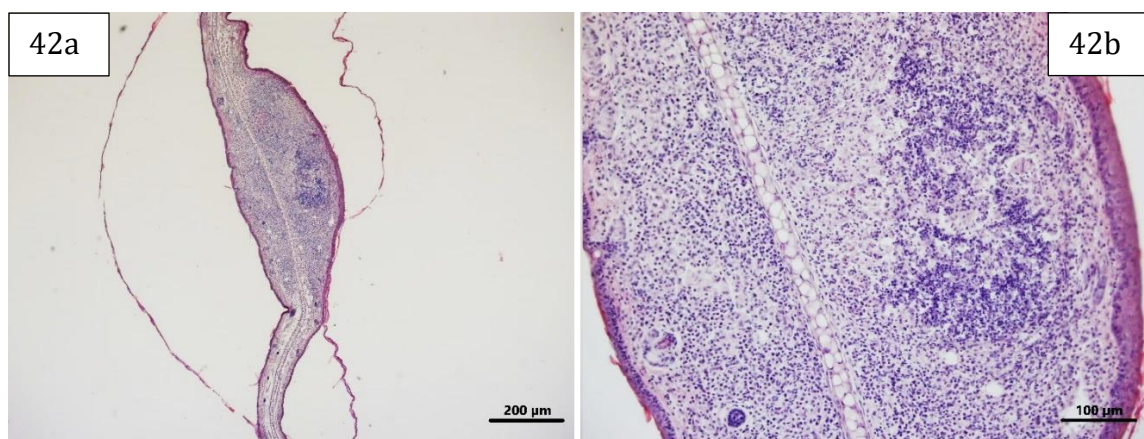


**Obrázek 40.** Fluorescenční vizualizace aktivovaných makrofágů (imunozačení iNOS, zelená) a buněčných jader (Hoechst, modrá) v příčném řezu ušního boltce myši infikované *Leishmania major* 1 týden po posledním sání *Phlebotomus duboscqi*. **a)** Celkový pohled na kožní lézi s probíhající imunitní reakcí. **b)** Detail okraje kožní léze s aktivovanými makrofágy (šipky).

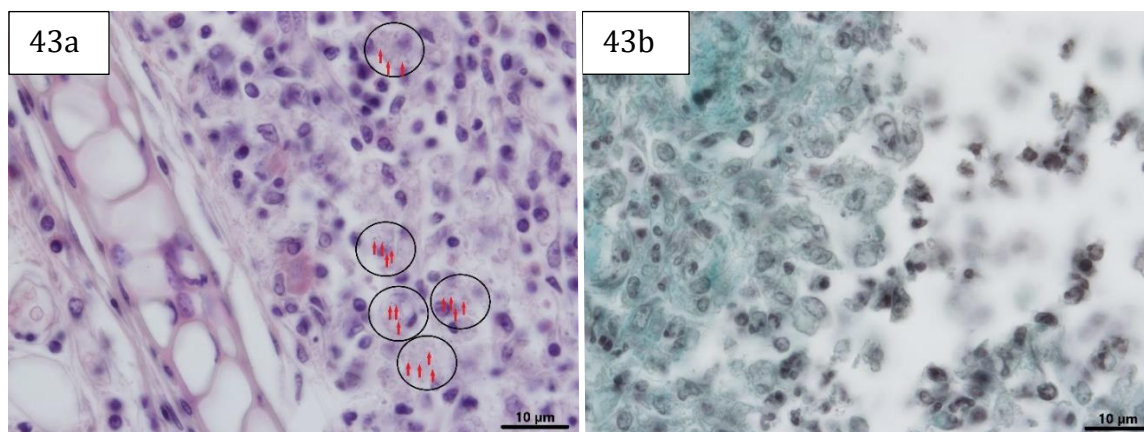


**Obrázek 41.** Fluorescenční vizualizace aktivovaných makrofágů (imuno značení iNOS, zelená) a buněčných jader (Hoechst, modrá) v příčném řezu ušního boltce myši infikované *Leishmania major* 1 týden po posledním sání *Phlebotomus duboscqi*. **a)** Celkový pohled na buněčný infiltrát v okraji ušního boltce. **b)** Detailní pohled na aktivované makrofágy (některé jsou označené šipkami) uvnitř okraje ušního botce.

Podobně jako u myši infikovaných 48 hodin po posledním sání, i u myši pouze infikovaných leishmaniemi (a dříve nesátých flebotomy) jsou přítomny léze s masivní buněčnou infiltrací s převahou neutrofilů (obr. 42a-b, 44a-b) a malými ložisky nekrózy (obr. 43b). Výskyt aktivovaných makrofágů je ojedinělý na periferii kožní léze (obr. 45a-b) i když na histologii už jsou patrné shluky makrofágů s amastigoty (obr. 43a). V centru léze navíc lze vidět materiál destruovaných buněčných jader obarvený Hoechstem a s charakterem značení histonů (pro víc informací viz diskuze).

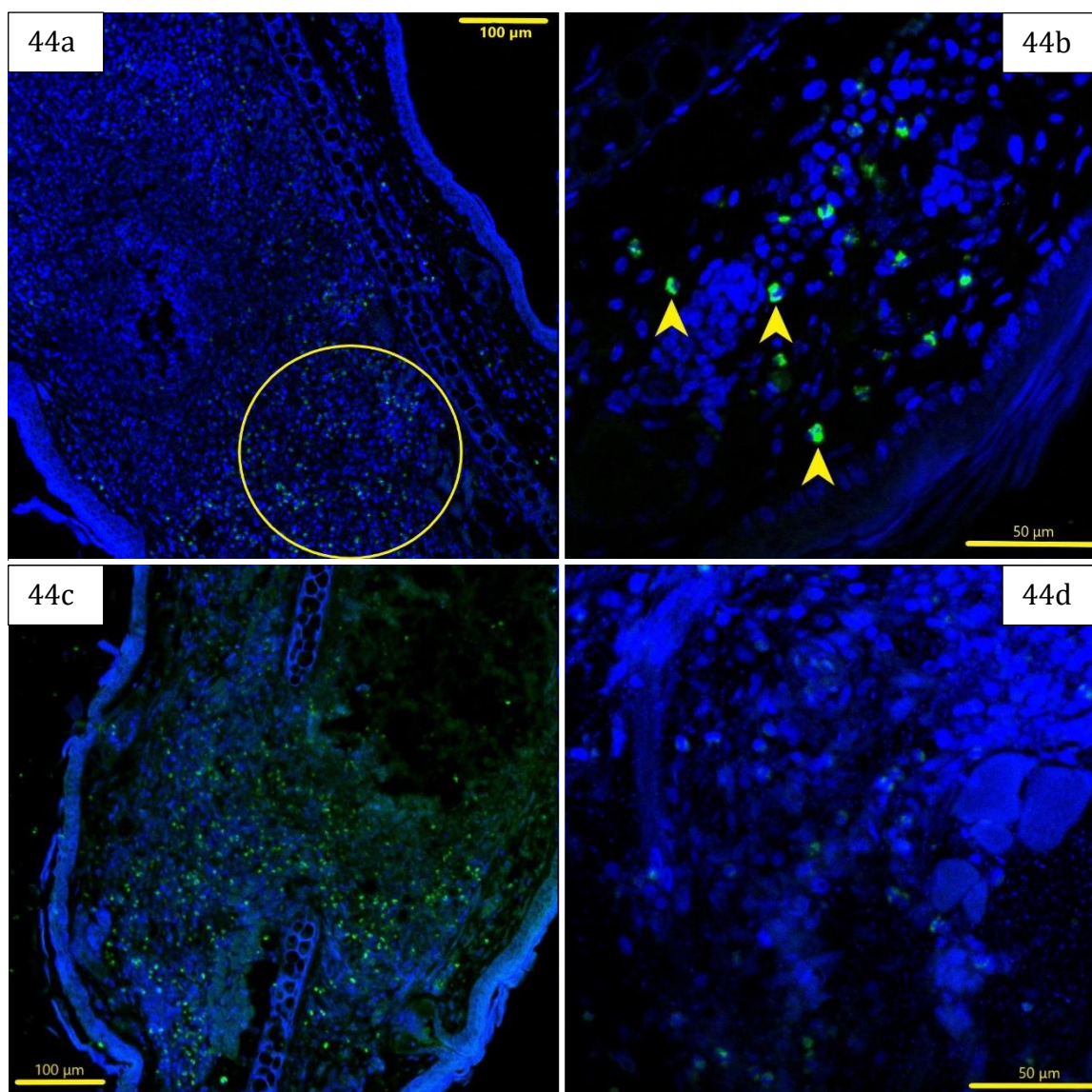


**Obrázek 42.** Kožní léze v ušním boltci myši infikované *Leishmania major*. Hematoxylin-eozin. **a)** Celkový pohled na lézi. **b)** Detail nekrotické tkáně uvnitř léze.

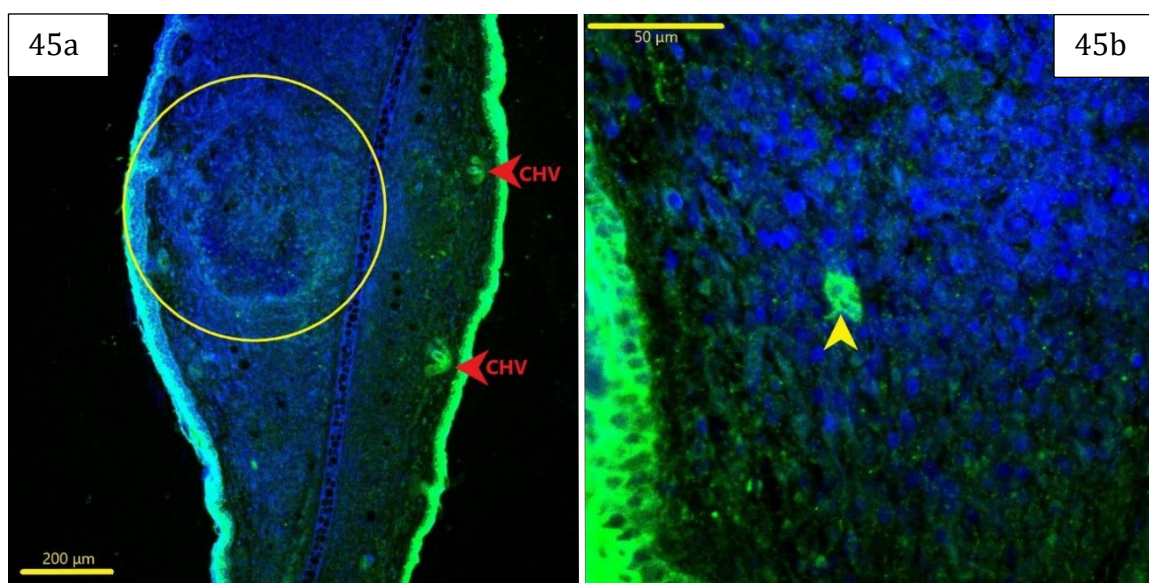


**Obrázek 43.** Léze v ušním boltci myši infikované *Leishmania major*. **a)** Okraj léze s četnými makrofágy (některé jsou zakroužkované) s amastigoty (červené šipky). Hematoxylin-eozin. **b)** Detail středu léze s nekrózou. Massonův zelený trichrom.

Je nutno zmínit, že řezy s kontrolou sekundární protilátky vykazovaly nespecifické značení (obr. 44c) s podobným charakterem jako měly řezy se značením aktivovaných neutrofilů pomocí MPO ze stejného vzorku. Nicméně pod větším zvětšením za použití objektivu s imerzním olejem a za stejného nastavení intenzity fluorescence tento nespecifický signál téměř úplně vymizel (obr. 44d). U erytrocytů je naopak běžným jevem autofluorescence a neznamená to nespecifické barvení sekundární protilátkou (obr. 29a-b).



**Obrázek 44.** Fluorescenční vizualizace léze uvnitř ušního boltce myši infikované *Leishmania major*. Buněčná jádra jsou u všech preparátů podbarvena Hoechstem (modrá). Imunozačení MPO (zelená) s **a**) celkovým pohledem na ložiska s aktivovanými neutrofily (zakroužkováno) a **b**) detailním pohledem na aktivované neutrofily (žluté šipky) na okraji nekrotické části léze. Negativní kontrola sekundární protilátky s **c**) celkovým a **d**) detailním pohledem na buněčný infiltrát uvnitř léze.



**Obrázek 45.** Fluorescenční vizualizace aktivovaných makrofágů (imunoznačení iNOS, zelená) a buněčných jader (Hoechst, modrá) v příčném řezu ušního boltce myši infikované *Leishmania major*. **a)** Celkový pohled na lézi s nekrotickou tkání (zakroužkováno). *CHV* – chlupový váček. **b)** Detail okraje léze s aktivovaným makrofágem (žlutá šipka).

## 5 Diskuse

Získané výsledky ilustrují imunomodulační vliv slin různých druhů flebotomů (*Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus duboscqi*) na imunitu hostitele a průběh kožní leishmaniózy u myši inbredního kmene BALB/c citlivého na leishmaniózu. Praktická část práce se skládá ze tří samostatných pokusů, které slouží zejména ke standardizaci postupů a jako předběžná studie pro další výzkum. Ačkoliv se u hostitelů opakovaně vystavených sání flebotomů uplatňují mechanismy buněčné, i humorální imunitní reakce (Belkaid et al., 1998; Silva et al., 2005), zvolené experimenty hodnotí zejména vliv buněčné složky imunity, která je v obraně proti leishmaniové infekci klíčová (Gomes and Oliveira, 2012).

### 5.1 Zhodnocení použitých metodických postupů

Vzhledem k tomu, že zmrazované řezy (kryořezy) sice obecně udržují konformaci cílového antigenu (umožňují tak lepší vazbu protilátky) ale nedosahují kvality potřebné pro věrohodné vyhodnocení histopatologických změn se zaměřením na lokální imunitní reakce a zároveň nejsou vhodnou volbou pro dlouhodobé skladování vzorků, byl pro tuto studii zvolený postup zpracování tkáně a přípravu histologických preparátů zalitím ušních boltců do parafinových bločků a následným krájením na rotačním mikrotomu. Nevýhodou tohoto postupu je, že většina fixačních činidel používaných v histologii není vhodná pro IHC. Fixace formaldehydem udržuje morfologii tkání, ale způsobuje zesíťování proteinů a denaturuje epitopy rozpoznatelné protilátkou. Výsledkem formalínové fixace je změna konformace makromolekul, která znesnadňuje či dokonce znemožňuje rozpoznání antigenu protilátkou (Montero, 2003). Proto se před samotným imunoznačením provádí většinou odmaskování antigenu, aby se odhalily skryté nebo denaturované cílové epitopy (Fox et al., 1983). Zejména dlouhodobá fixace formaldehydem vede k maskování až poškození epitopů a brání vazbě protilátek. Proto byly porovnané výsledky dvou postupů fixace v čerstvě připraveném 4% paraformaldehydu (PFA) ve fosfátovém pufru (pH 7,4) a to 1) fixace a skladování tkáně v 4% PFA vs. 2) fixace v 4% PFA nepřesahující dobu 18 hodin a následně



promytí/převedení tkáně do 70% etanolu za účelem transportu vzorků na MU Brno a skladování. Prodloužená fixace v 4% PFA měla negativní vliv i na další zpracování vzorků a to například, že se tkáň fixovaných ušních boltců v důsledku dlouhodobé fixace smrštila a deformovala (Chatterjee, 2014). Další histologické zpracování parafinových bločků navíc znesnadňovala i vyšší tvrdost fixované tkáně, přičemž během mikrotomových řezů docházelo k vypadávání krájených vzorků a kumulaci mikroskopických artefaktů. Nevýhodou fixací vhodných pro IHC je, že ve srovnání s AFA vykazovaly vzorky fixované v 4% PFA i zinkové fixáži sníženou a taky méně kontrastní barvitelnost. Fixace v 4% PFA umožnila relativně kvalitní zachování jader včetně celkové morfologie a distribuce chromatinu, oproti zinkové fixáži, která vedla ke změně morfologie jader, která se jevila jako smršťená (Hicks et al., 2006). Narozdíl od zinkové fixáže, však fixace v 4% PFA s následným přenesením vzorků do 70% etanolu umožnila pouze částečné zachování antigenicity tkáně pro IHC. Závěrem tedy lze zhodnotit, že ačkoliv se jako nejvíce vhodnou metodou pro histologické zpracování jeví fixační činidlo AFA, jako nejvíce všestranně využitelná se jeví zinková fixáž, která umožňuje jak kvalitní zpracování vzorků pro histopatologické, tak i pro IHC postupy.

Ušní boltce obsahuje elastickou chrupavku, která může ztěžovat krájení bločku na histologické řezy (zejména vypadávání a trhání/vlnění tkáně kolem chrupavky). Proto byla taky testována potřeba dekalifikace před samotným odvodněním a zalitím této tkáně do parafinové bločku. Doba potřebná k dekalifikaci bývá závislá na velikosti objektu, na druhu dekalifikační tekutiny a pohybuje se mezi několika dny až týdny. Pro účely této studie byla zvolena komplexotvorná sloučenina typu EDTA (etyléndiamintetraoctové kyseliny) (Chelaton, Komplexon). Ačkoliv je odvápnování v komplexotvorných sloučeninách delší proces, než je tomu při použití kyselin, v praxi je tato metoda stále více upřednostňována, neboť velmi dobře zachovává strukturu tkáně i její barvitelnost jako i nukleové kyseliny a epitopy pro IHC barvení (Miquelestorena-Standley et al., 2020), přičemž navíc může odhalit některé z epitopů bez potřeby další obnovy antigenu (Kiernan, 2008). V této práci byla zvolená délka dekalifikace: 0 dnů (zpracování bez dekalifikace), 3 dny a 6 dní.

Paradoxně se jako nejvíce vhodným ukázalo být zpracování vzorků zcela bez dekalcifikace. Dekalcifikace po dobu 6 dnů navíc vedla ke problematickému krájení vzorků a k vypadávání řezů z parafínového bločku. V souvislosti s tímto jevem pravděpodobně došlo u 6denní dekalcifikace ke krystalizaci vápenatých solí vyplavených z chrupavky.

Krájení a následnou manipulaci s řezy ušního boltce myší znesnadňuje tvar příčného řezu boltce a organizace jeho tkání, jež často během barvení vede k oddělení části řezu od podložního sklíčka a překlopení přes jeho zbytek. Navíc na povrchu ušního boltce se nachází rohovatějící pokožka z dlaždicového epitelu, jejíž vnější vrstva (*stratum corneum*) se na histologických řezech často odděluje od zbytku tkáně. Pro účely této studie to nepředstavuje komplikaci, jedná se spíše o „kosmetický“ problém. Řídké vazivo vyplňující mezibuněčný prostor lze nejlépe rozlišit díky barvení Massonovým trichromem, barvicím tuto strukturu do zelena. Massonův zelený trichrom stejně tak nejlépe vizualizuje histopatologické změny tkáně způsobené v důsledku infekce. Nicméně pro zvýraznění zánětlivého infiltrátu se nejvíce vhodnou metodou barvení ukázalo být barvení hematoxylin-eozinem a Giemsou u kterých se jádra hostitelských i parazitických buněk barví nejvýrazněji do modrofialova. Ve všech typech barvení se svalová vlákna barví do červena. Barvení Heidenhainovým azanem se ukázalo jako přebytné, protože podobně jako Massonův zelený trichrom zdůrazňuje jednotlivé tkáně a krvinky v ušním boltci ale na rozdíl od něho je méně kontrastní (modrá a červena více splývají), barvicí procedura je komplikovanější a velice zdlouhavá, a navíc často dochází k přebarvení řezů.

Dalším úskalím během zpracování těchto tkání je vyšší pokročilost leishmaniové infekce, jež vede k nekrotizaci a nesoudržnosti infikované tkáně, vypadávání nekrotických oblastí a s tím spojená nežádoucí tvorba smíšeného signálu uvnitř léze během imunofluorescenční analýzy. V souvislosti s pokročilou nekrózou hostitelské tkáně dochází mimo jiné i k masivní destrukci buněčných jader a s tím spojené vytvoření nespecifického modrého „šumu“ pozorovatelného během IHC analýzy v samotném středu kožní léze (obr. **44d**, **45a-b**). Vzniklý signál pravděpodobně vzniká v důsledku uvolnění histonů z destruovaných jader. Právě jaderná DNA

neutrofilů spojená s histony a granulovými proteiny těchto buněk utváří extracelulární síťovou strukturu, charakterizovanou jako tzv. NET (neutrophil extracellular traps), která je schopná zachytit a příležitostně zabít určité patogeny (Guimarães-Costa et al., 2009). Přítomnost NET ve vzorcích z této studie je však nutno do budoucna ověřit pomocí specifitějšího značení jako je třeba imunoznačení elastázy.

Ačkoliv byla detekce neutrofilů exprimujících myeloperoxidázu úspěšná, nejistý závěr vzniká v důsledku rozporupných výsledků negativní kontroly, u které došlo ke nespecifické vazbě sekundární protilátky (obr. **44c**) s podobným charakterem značení. K nespecifické vazbě sekundárních protilátek u negativních kontrol mohlo také dojít mimo jiné i v důsledku kontaminace vzorků chybou lidského faktoru. Ke tvorbě artefaktů při imunofluorescenci může také přispívat i nedostatečná deparafinizace, a proto byl během standardizace IHC postupů včleněn krok zahrnující rozpuštění tuhého parafínu na nahřívací plotýnce před samotnou inkubací ve xyleny. V kombinaci vysoké přilnavosti podložních sklíček určených výhradně pro IHC, rozpuštění parafínu a nedostatečného promytí vzorků totiž docházelo během konfokální analýzy ke tvorbě nežádoucího pozadí. Navíc konfokálního mikroskop zrovna během skenování kontrolního preparátu upadl do poruchového stavu, kdy musel být hardware a software restartován. Mohlo tedy dojít ke „zamrznutí“ hardwaru či softwaru, kdy byla citlivost snímání signálu ve skutečnosti vyšší, než software zobrazoval a tím pádem by kontrola na pořízených snímcích mohla vykazovat falešnou pozitivitu. Pro spolehlivost barvení MPO však svědčí skutečnost, že pod větším zvětšením za použití objektivu s imerzním olejem a za stejného nastavení intenzity fluorescence tento nespecifický signál téměř úplně vymizel (obr. **44d**).

Lze shrnout, že výhodou histologického barvení je na rozdíl od IHC s fluorescenční analýzou lepší vizualizace histopatologických změn, nekrotické tkáně a zběžná kvantifikace zánětlivých buněk (neutrofilů i makrofágů). Při imunofluorescenci často dochází v případě pokročilé infekce k zachycení nespecifického signálu v centru léze a během zpracování vzorků je nekrotická tkáň většinou vyplavena. Nicméně díky IHC lze lépe detekovat a částečně kvantifikovat

aktivované neutrofilů a makrofágů, jež se aktivně podílejí na likvidaci leishmanií. Lze předpokládat, že výše uvedeným problémům lze do budoucna alespoň částečně předcházet využitím IHC pro světelnou mikroskopii. Chromogenní imunohistochemie a následní analýza pomocí světelné mikroskopie by pravděpodobně eliminovala i problém s nespecifickým signálem pokožky během značení iNOS nebo s jevy autofluorescence u některých složek (jako tomu bylo u erytrocytů na obr. 26a, 29a-b).

## 5.2 Imunomodulační vliv slin flebotoma na rozvoj kožní leishmaniózy

Výsledky opakované expozice sání flebotomů u myší, jež byly usmrčeny a analyzovány 48 hodin po posledním sání jsou v souladu s výsledky studie Peters et al., 2008 a potvrzují rychlou infiltraci neutrofilů, a to nejen v místě pobodání flebotomem, bez ohledu na parazitární nákazu. Schopnost fagocytů rychle se lokalizovat v místech zánětu, a následně zachytit a zničit patogeny, je charakteristickým znakem vrozené imunitní odpovědi a patří k nejstarším pozorováním v mikrobiologii (Martin a Leibovich, 2005). Infiltrace neutrofilů naznačuje, že převaha neutrofilů infikovaných parazity v místě bodnutí je vedlejším produktem reakce hostitele zaměřené na hojení ran a sterilizaci. Zdá se tedy, že neutrofilní reakce hostitele na ránu způsobenou vektorem byla hnací silou v evoluci patogenů zaměřenou na využití těchto efektorových buněk (McDonald et al., 2010), jako příklad lze uvést modely „Trojského koně“ kdy leishmanie využívá neutrofilů jako „mezihostitele“ na cestě k cílovým hostitelským buňkám, tedy monocytům a makrofágům (van Zandbergen et al., 2004) resp. „Trojského králíka“ kdy parazit uniká z apoptizujících neutrofilů a infikuje makrofágy (Ritter et al., 2009).

Je již poměrně dlouhou dobu známo, že bodnutí *P. papatasi* může u lidí vyvolat DTH reakci (Theodor, 1935). Při senzitivizaci myší slinami tohoto druhu flebotoma dochází k buněčné infiltraci do dermis ušního boltce, která vrcholí 18–48 hodin po expozici a přetrvává po dobu 5 dnů. Infiltrovanými buňkami jsou zejména CD4+ buňky, lymfocyty, eozinofily, monocyty/makrofágy, neutrofilů a žírné buňky (Belkaid et al., 2000). V souvislosti s výše uvedenými poznatky bylo zjištěno, že jsou

sliny flebotomů chemotaktické pro monocyty (Anjili et al., 1995; Zer et al., 2001). Studie Silva et al., 2005 prokazuje u myši opakovaně sáťých *Lutzomyia longipalpis* intenzivní infiltraci neutrofilů, eozinofilů a makrofágů, která byla pozorována již po 2 hodinách a přetrvávala až 48 hodin po stimulaci.

Neméně důležitou složkou imunity účastníci se hostitelské odpovědi je infiltrace makrofágů do místa bodnutí. Klasifikace makrofágů na M1 a M2 je odvozena na základě lišícího se metabolismu argininu v buňkách. V makrofázích ovlivněných cytokinovým prostředím, které vzniklo na základě Th1 buněčné odpovědi dochází k exprimování NO tudíž lze za klasicky aktivované makrofágy považovat makrofágy s prozánětlivou funkcí (M1). Na druhou stranu u makrofágů alternativně aktivovaných dochází prostřednictvím arginázy ke konverzi argininu na ornitin a lze je tedy považovat za efektorové buňky s funkcí protizánětlivou. Klasicky aktivované makrofágy exprimují enzym iNOS, jehož produkty jsou silně toxické a způsobují destrukci patogenů (Green et al., 1990b). Wei et al. 1995 ve své studii potvrdili, že je oxid dusnatý jedním z hlavních faktorů ovlivňujících potlačení leishmaniové infekce. Mutantní myši s porušeným genem pro iNOS ve srovnání s kontrolní skupinou produkovaly mnohem méně NO, což se odrazilo v jejich snížené schopnosti potlačit infekci *L. major*. U kontrolních myši došlo k samovolnému vyhojení lézí, na rozdíl od mutantních jedinců, u kterých se onemocnění rozvinulo ve viscerální formu. Bylo prokázáno, že sliny *P. papatasi* snižují expresi iNOS a snižují produkci NO v myších makrofázích (Waitumbi a Warburg, 1998). Během uvedeného experimentu klidové makrofágy neexprimovaly detekovatelné hladiny iNOS mRNA. Signální proces pro aktivaci genu iNOS a následná produkce NO v myších makrofázích je usnadněna protein fosfatázou 1 (PP-1) a protein fosfatázou 2A (PP-2A). Vzhledem k tomu, že sliny *P. papatasi* inhibovaly produkci PP-1 a PP-2A, byla provedena real-time PCR za účelem zjištění, zda je exprese genu iNOS v makrofázích inhibována slinami. Výsledky prokázaly, že po přidání jedné slinné žlázy *P. papatasi* na  $10^6$  makrofágů došlo ke snížení iNOS v makrofázích o 50 %. V souvislosti s tímto zjištěním byl zkoumán vliv regulace iNOS na produkci NO, u kterého byl zaznamenán pokles až o 30-40 % po přidání homogenátu slinných žláz *P. papatasi*. Bylo tedy prokázáno, že homogenát slinných žláz *P. papatasi* podporuje

rozvoj kožní leishmaniózy (Theodos a Titus, 1993), což může být jeden z důvodů proč 10-700 promastigotů *L. major* v přírodě přenášených *P. papatasi* vyvolá onemocnění na rozdíl od srovnatelně nízkého počtu (100-500) promastigotů experimentálně inokulovaných do vnímavých myší, které vedou spíše k podpoře imunity (Warburg a Shlein, 1986; Doherty a Coffman, 1996; Menon a Bretscher, 1996). Závěry této studie jsou navíc podpořeny výsledky dalšího experimentu (Katz et al., 2000), kdy mimo jiné měření dusitanů, které se akumulovaly v aktivovaných makrofázích potvrdila, že homogenát slinných žláz *P. papatasi* obsahující adenosin inhiboval produkci NO, zatímco u *L. longipalpis* nikoliv.

Ačkoliv tkáň myší infikovaných 48 hodin po posledním sání *P. duboscqi*, jako i myší pouze infikovaných a dříve neimunizovaných slinami flebotoma, vykazuje na histologických preparátech značnou infiltraci hostitelských makrofágů, díky IHC metodám jsme byli schopni vizualizovat klasicky aktivované makrofágy, tj. makrofágy exprimující iNOS a aktivně se podílející na likvidaci patogenů. Právě takto aktivované makrofágy značně převládaly u myší infikovaných 1 týden po posledním sání. Výsledky této práce potvrzují, že opakovaná expozice sání flebotomů vyvolala předpokládanou imunitní reakci, která vedla k účinnější obraně hostitele proti leishmaniové infekci. Imunizovaní jedinci vytvářeli ve srovnání s naivními jedinci výrazně menší léze, čemuž odpovídal i nižší počet leishmanií v infikovaném ušním boltci. Na rozdíl od myší pouze infikovaných (dříve neimunizovaných) nedochází v hostitelské tkáni k významné nekrotizaci tkáně, chrupavka i svalová vlákna jsou zachovalá.

Na závěr je nutno zmínit, že u negativních myší, tj. flebotomem nesátých a leishmaniami neinfikovaných, lze v některých případech pozorovat ojedinělý výskyt aktivovaných imunitních buněk (neutrofilů i makrofágů) (obr. **28a-b**, **29a-b**). Tento jev je možné vysvětlit podrážděním tkáně ušního boltce v souvislosti s poškrábáním při čištění, popřípadě konfliktem dvou samic ve společné chovné nádobě a s tím spojenou hojivou reakcí. I přesto, že jsou jako experimentální modely právě z důvodu menší agresivity preferovány samice, lze předpokládat, že i v tomto případě dochází k dominanci určitých jedinců.

## 6 Závěr

Cílem diplomové práce bylo navrhnout a standardizovat histologické a imunohistochemické postupy vhodné pro vizualizaci imunitní reakce a patologických změn vzniklých v důsledku leishmaniové infekce a porovnání charakteru imunitní reakce u myši opakovaně pobodaných flebotomy v různě dlouhém časovém odstupu od infekce. Pro tyto účely byly jako hostitelské organismy vybrány myši inbredního kmene BALB/c, samice *Phlebotomus papatasi* a *Phlebotomus duboscqi* jakožto přenašeč, a původce lidské kožní leishmaniózy druhu *Leishmania major*. Histologické postupy, použité a standardizované v této práci, představují vhodnou metodu jak pro vyhodnocení patologických změn parazitované tkáně, tak i pro stanovení přítomnosti imunitních buněk a jejich kvantifikaci. Imunofluorescenční analýza parafínových řezů zase umožňuje vizualizovat a kvantifikovat pouze ty buňky infiltrátu, jenž jsou aktivované. Výsledky jednotlivých postupů jsou shrnuty v následujících bodech:

- Ačkoliv má každá z fixází své výhody i nevýhody, zinková fixáž představuje z testovaných fixativ tu nejvhodnější alternativu pro souběžné histopatologické barvení i IHC postupy prováděné na řezech z jednoho parafínového bločku. V případě využití 4% PFA je třeba dbát zvýšené pozornosti na délku fixace a počítat s možností, že některé antigeny budou muset být před samotnou IHC analýzou demaskovány.
- V případě šestidenní dekalifikace došlo k výrazné deformaci tkáně, včetně ztráty homogenity chrupavky. Vzhledem k nepatrnému rozdílu mezi vzorky bez dekalifikace a třídenní dekalifikací se proces dekalifikace jeví být v případě ušního boltce zbytečným.
- Z histologických barvení se jako nejvíce vhodnou metodou jeví použití hematoxylin-eozinu a barvení Giemsa pro rychlou vizualizaci a celkové vyhodnocení stavu tkáně, ale i zvýraznění jader parazitů a buněčného infiltrátu hostitele. Massonův zelený trichrom zase umožňuje zvýraznění histopatologických změn hostitelské tkáně, jako například vizualizace zánětlivého infiltrátu, deformace chrupavky a nekrotizace parazitované

tkáně, podobně jako barvení Heidenhainovým azanem. Nicméně vzorky barvené Heidenhainovým azanem nejsou natolik kontrastní jako Massonův trichrom, a proto je pro další výzkum vhodnější alternativou využití Massonova zeleného trichromu.

- Imunoznačení iNOS je metodou vhodnou pro zobrazení klasicky aktivovaných hostitelských makrofágů, které se hojně vyskytovaly v uších u opakovaně sátých myší odebraných 48 hodin po posledním sání *P. papatasi* (pokus 2B) a u myší odebraných 5. týden p.i., které byly infikované 48 hodin po posledním sání *P. duboscqi* (pokus 3).
- Imunoznačení myeloperoxidázy se zdá být vhodnou metodou pro vizualizaci aktivovaných neutrofilů, které se hojně vyskytovaly v uších u opakovaně sátých myší odebraných 1 týden po posledním sání *P. papatasi* (pokus 2B) a u myší odebraných 5. týden p.i., které byly infikované 1 týden po posledním sání *P. duboscqi* (pokus 3). Nicméně v souvislosti s nejasnými výsledky negativní kontroly je toto barvení nezbytné zopakovat a vyloučit tak chybu lidského faktoru, popřípadě eliminovat vlivy způsobené vnějšími faktory.
- Na základě výše uvedených výsledků lze konstatovat, že průběh leishmaniové infekce je z velké části ovlivněn předchozím sáním flebotoma. V souvislosti s opakovanou imunizací hostele slinami vektora dochází ke vzniku menších lézí a chrupavka i svalová vlákna zůstávají zachovalé. U opakovaně sátých jedinců infikovaných 48 hodin po poslední imunizaci sáním vektora, byla pozorovaná reakce, která dokáže lépe potlačit patologické důsledky infekce v porovnání s pozitivní kontrolou (myši pouze infikované, dříve nesáté vektorem) a s infekcí 1 týden po poslední imunizaci. Ušní boltce myší pouze infikovaných a infikovaných 1 týden po posledním sání vykazovaly podobné histopatologické změny spojené s výraznou nekrotizací tkáně. Stejně tak i vzniklá léze byla oproti myším infikovaným 48 po posledním sání výrazně větší.



## Použité zdroje

- Aderem, A., & Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*, 17(1), 593–623.
- Adler, S., Theodor, O., & Dale, H. H. (1935). Investigations on Mediterranean kala azar IX—feeding experiment with *phlebotomus perniciosus* and other species on animals infected with *Leishmania infantum*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 116(801), 516–542.
- Akilov, O., Khachemoune, A., & Hasan, T. (2007). Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. *International journal of dermatology*, 46, 132–142.
- Alexander, J. (1988). Sex differences and cross-immunity in DBA/2 mice infected with *L. mexicana* and *L. major*. *Parasitology*, 96(2), 297–302.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Boer, M. den, & Team, the W. L. C. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLOS ONE*, 7(5), e35671.
- Amino, R., Giovannini, D., Thiberge, S., Gueirard, P., Boisson, B., Dubremetz, J.-F., Prévost, M.-C., Ishino, T., Yuda, M., & Ménard, R. (2008). Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell Host & Microbe*, 3(2), 88–96.
- Andrade-Narváez, F. J., Vargas-González, A., Canto-Lara, S. B., & Damián-Centeno, A. G. (2001). Clinical picture of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan peninsula, Mexico. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, 163–167.
- Anjili, C. O., Mbatia, P. A., Mwangi, R. W., Githure, J. I., Olobo, J. O., Robert, L. L., & Koech, D. K. (1995). The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta tropica*, 60(2), 97–100.
- Awasthi, A., Mathur, R., & Saha, B. (2004). Immune response to *Leishmania* infection. *The Indian journal of medical research*, 119, 238–258.
- Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1097–1106.
- Bates, P. A. (2008). Leishmania sand fly interaction: Progress and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4), 340–344.
- Beil, W. J., Meinardus-Hager, G., Neugebauer, D.-C., & Sorg, C. (1992). Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *Journal of leukocyte biology*, 52(2), 135–142.
- Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J., & Sacks, D. L. (1998). Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: Powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *The Journal of experimental medicine*, 188(10), 1941–1953.
- Belkaid, Y., Valenzuela, J. G., Kamhawi, S., Rowton, E., Sacks, D. L., & Ribeiro, J. M. (2000). Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6704–6709.

- Berenguer, L. K. A. R., Gomes, C. F. C. de A., Nascimento, J. de O., Bernardi, J. C. M., Lima, V. F. S., de Oliveira, J. B., Ramos, C. A. do N., Ramos, R. A. N., & Alves, L. C. (2021). *Leishmania infantum* infection in a domestic cat: A real threat or an occasional finding? *Acta Parasitologica*, 66(2), 673–676.
- Bittencourt, A. L., Barral, A., & Costa, J. M. L. (1996). Tegumentary leishmaniasis in childhood. *Pediatric Dermatology*, 13(6), 455–463.
- Boulanger, N., Lowenberger, C., Volf, P., Ursic, R., Sigutova, L., Sabatier, L., Svobodova, M., Beverley, S. M., Späth, G., Brun, R., Pesson, B., & Bulet, P. (2004). Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, 72(12), 7140–7146.
- Bravo, F., & Sanchez, M. R. (2003). New and re-emerging cutaneous infectious diseases in Latin America and other geographic areas. *Dermatologic Clinics*, 21(4), 655–668.
- Carregaro, V., Costa, D. L., Brodskyn, C., Barral, A. M., Barral-Netto, M., Cunha, F. Q., & Silva, J. S. (2013). Dual effect of *Lutzomyia longipalpis* saliva on *Leishmania braziliensis* infection is mediated by distinct saliva-induced cellular recruitment into BALB/c mice ear. *BMC microbiology*, 13(1), 1–11.
- Cecílio, P., Oristian, J., Meneses, C., Serafim, T. D., Valenzuela, J. G., Cordeiro da Silva, A., & Oliveira, F. (2020). Engineering a vector-based pan-*Leishmania* vaccine for humans: Proof of principle. *Scientific reports*, 10(1), 1–20.
- Cincurá, C., de Lima, C. M. F., Machado, P. R. L., Oliveira-Filho, J., Glesby, M. J., Lessa, M. M., & Carvalho, E. M. (2017). Mucosal leishmaniasis: A retrospective study of 327 cases from an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(3), 761–766.
- Convit, J., Pinardi, M. E., & Rondón, A. J. (1972). Diffuse cutaneous leishmaniasis: A disease due to an immunological defect of the host. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(4), 603–610.
- Dassoni, F., Daba, F., Naafs, B., & Morrone, A. (2017). Leishmaniasis recidivans in Ethiopia: Cutaneous and mucocutaneous features. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 11(01), 106–110.
- Da Silva, S. A. G., Costa, S. S., Mendonça, S. C. F., Silva, E. M., Moraes, V. L. G., & Rossi-Bergmann, B. (1995). Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. *Acta Tropica*, 60(3), 201–210.
- David, C. V., & Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*, 22(6), 491–502.
- Dillon, R. J., & Lane, R. P. (1993). Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni*. *Parasitology research*, 79(6), 492–496.
- Doherty, T. M., & Coffman, R. L. (1996). *Leishmania major*: Effect of infectious dose on T cell subset development in BALB/c mice. *Experimental parasitology*, 84(2), 124–135.
- Dougall, A. M., Alexander, B., Holt, D. C., Harris, T., Sultan, A. H., Bates, P. A., Rose, K., & Walton, S. F. (2011). Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *International Journal for Parasitology*, 41(5), 571–579.
- Ellis, R. (n.d.). *Giemsa's staining protocol for tissue sections*. (b.r.). Dostupné z [http://www.ihcworld.com/protocols/special\\_stains/giemsa\\_ellis.htm?fbclid=IwA](http://www.ihcworld.com/protocols/special_stains/giemsa_ellis.htm?fbclid=IwA)

[R0dNHo4qOm1M0X5xUJqq4M95v6eZIGqFumvYYK9c\\_VLYLAeVvMizu4MISU](https://doi.org/10.2478/11651173190000000000000000000000).

Verze z 3.5.2022.

- Eschenlauer, S. C. P., Faria, M. S., Morrison, L. S., Bland, N., Ribeiro-Gomes, F. L., DosReis, G. A., Coombs, G. H., Lima, A. P. C. A., & Mottram, J. C. (2009). Influence of parasite encoded inhibitors of serine peptidases in early infection of macrophages with *Leishmania major*. *Cellular Microbiology*, *11*(1), 106–120.
- Fearon, D. T. (1997). Seeking wisdom in innate immunity. *Nature*, *388*(6640), 323–324.
- Feliciangeli, M. D. (2004). Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, *18*(1), 71–80.
- Fox, N., Damjanov, I., Knowles, B. B., & Solter, D. (1983). Immunohistochemical localization of the mouse stage-specific embryonic antigen 1 in human tissues and tumors. *Cancer research*, *43*(2), 669–678.
- Ghedin, E., Bringaud, F., Peterson, J., Myler, P., Berriman, M., Ivens, A., Andersson, B., Bontempi, E., Eisen, J., Angiuoli, S., Wanless, D., Von Arx, A., Murphy, L., Lennard, N., Salzberg, S., Adams, M. D., White, O., Hall, N., Stuart, K., ... El-Sayed, N. M. A. (2004). Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *134*(2), 183–191.
- Goble, F. C., & Konopka, E. A. (1973). Sex as a factor in infectious disease. *Transactions of the New York Academy of Sciences*, *35*(4 Series II), 325–346.
- Gomes, R., & Oliveira, F. (2012). The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on *Leishmania* immunity. *Frontiers in Immunology*, *3*.
- Gossage, S. M., Rogers, M. E., & Bates, P. A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: Implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology*, *33*(10), 1027–1034.
- Gitari, J. W., Nzou, S. M., Wamunyokoli, F., Kinyeru, E., Fujii, Y., Kaneko, S., & Mwau, M. (2018). Leishmaniasis recidivans by *Leishmania tropica* in Central Rift Valley Region in Kenya. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication*.
- Gramiccia, M., & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, *35*(11), 1169–1180.
- Green, S. J., Meltzer, M. S., Hibbs, J. B., & Nacy, C. A. (1990b). Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *The Journal of Immunology*, *144*(1), 278–283.
- Griffiths, W. a. D. (1987). Old World cutaneous leishmaniasis. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Volume II. Clinical Aspects and Control*, 617–636.
- Grimstone, A. V. (1961). Fine Structure and morphogenesis in Protozoa. *Biological Reviews*, *36*(1), 97–148.
- Groux, H., Cottrez, F., Rouleau, M., Mauze, S., Antonenko, S., Hurst, S., McNeil, T., Bigler, M., Roncarolo, M.-G., & Coffman, R. L. (1999). A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells. *The Journal of Immunology*, *162*(3), 1723–1729.
- Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., Wasunna, M. K., & Bryceson, A. D. (2002). Visceral leishmaniasis: Current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*, *2*(8), 494–501.
- Guimarães-Costa, A. B., Nascimento, M. T., Froment, G. S., Soares, R. P., Morgado, F. N., Conceição-Silva, F., & Saraiva, E. M. (2009). *Leishmania amazonensis* promastigotes

- induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(16), 6748–6753.
- Haskó, G., Kuhel, D. G., Németh, Z. H., Mabley, J. G., Stachlewitz, R. F., Virág, L., Lohinai, Z., Southan, G. J., Salzman, A. L., & Szabó, C. (2000). Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *The Journal of Immunology*, 164(2), 1013–1019.
- Hicks, D., Johnson, L., Mitchell, S., Gough, J., Cooley, W., La Ragione, R., Spencer, Y., & Wangoo, A. (2006). Evaluation of zinc salt based fixatives for preserving antigenic determinants for immunohistochemical demonstration of murine immune system cell markers. *Biotechnic & histochemistry*, 81(1), 23–30.
- Himmelrich, H., Parra-Lopez, C., Tacchini-Cottier, F., Louis, J. A., & Launois, P. (1998). The IL-4 rapidly produced in BALB/c mice after infection with *Leishmania major* down-regulates IL-12 receptor  $\beta$ 2-chain expression on CD4+ T cells resulting in a state of unresponsiveness to IL-12. *The Journal of Immunology*, 161(11), 6156–6163.
- Hoare, C. A., & Wallace, F. G. (1966). Developmental stages of Trypanosomatid flagellates: A New Terminology. *Nature*, 212(5068), 1385–1386.
- Horton, M. R., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Bao, C., & Noble, P. W. (1998). Regulation of hyaluronan-induced chemokine gene expression by IL-10 and IFN- $\gamma$  in mouse macrophages. *The Journal of Immunology*, 160(6), 3023–3030.
- Humason, G. L. (1967). Animal tissue techniques. 2. San Francisco and London: W.H. Freeman and Company.
- Charlab, R., Rowton, E. D., & Ribeiro, J. M. C. (2000). The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Experimental Parasitology*, 95(1), 45–53.
- Chatterjee, S. (2014). Artefacts in histopathology. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*, 18(Suppl 1), S111–S116.
- Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.-A., Adlem, E., & Aert, R. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, 309(5733), 436–442.
- Jaramillo-Gutierrez, G., Rodrigues, J., Ndikuyeze, G., Povelones, M., Molina-Cruz, A., & Barillas-Mury, C. (2009). Mosquito immune responses and compatibility between Plasmodium parasites and anopheline mosquitoes. *BMC Microbiology*, 9(1), 154.
- Jhingran, A., Chatterjee, M., & Madhubala, R. (2008). Leishmaniasis: Epidemiological trends and diagnosis. *Leishmania after the Genome: Biology and Control*, 1–14.
- Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E., & Sacks, D. (2000). Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science*, 290(5495), 1351–1354.
- Kane, M. M., & Mosser, D. M. (2001). The Role of IL-10 in Promoting disease progression in Leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, 166(2), 1141–1147.
- Katz, O., Waitumbi, J. N., Zer, R., & Warburg, A. (2000). Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 62(1), 145–150.
- Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., & Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors*, 10(1), 287.
- Kaufer, A., Stark, D., & Ellis, J. (2020). A review of the systematics, species identification and diagnostics of the Trypanosomatidae using the maxicircle kinetoplast DNA: from past to present. *International Journal for Parasitology*, 50(6), 449–460.

- Kaye, P., & Scott, P. (2011). Leishmaniasis: Complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 9(8), 604–615.
- Kiernan J.A. (2008). Romanowsky-Giemsa stains. In: *Histological and histochemical methods – theory and practice*, 4 th ed. Scion, Banbury, Oxfordshire, UK. pp. 178–182.
- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: A review. *Medical and Veterinary Entomology*, 4(1), 1–24.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Tang, Y., & Bastien, P. (1996). Metacyclic promastigotes of *Leishmania* in the salivary glands of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite*, 3(1), 55–60.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17(3), 279–289.
- Kimblin, N., Peters, N., Debrabant, A., Secundino, N., Egen, J., Lawyer, P., Fay, M. P., Kamhawi, S., & Sacks, D. (2008). Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(29), 10125–10130.
- Klein, S. L. (2000). The effects of hormones on sex differences in infection: From genes to behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24(6), 627–638.
- Klein, S. L. (2004). Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite immunology*, 26(6-7), 247–264.
- Kumar, S., Molina-Cruz, A., Gupta, L., Rodrigues, J., & Barillas-Mury, C. (2010). A peroxidase/dual oxidase system modulates midgut epithelial immunity in *Anopheles gambiae*. *Science*, 327(5973), 1644–1648.
- Lainson, R. & Shaw, J. J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1, Peters, W. & Killick-Kendrick, R. (editors). London and Orlando, Florida: Academic Press, pp. 1–120.
- Laufs, H., Müller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J. C., Solbach, W., & Laskay, T. (2002). Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infection and Immunity*, 70(2), 826–835.
- Lavine, M. D., & Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10), 1295–1309.
- Lawyer, P. G., & Perkins, P. V. (2000). Leishmaniasis and Trypanosomiasis. In B. F. Eldridge & J. D. Edman (Ed.), *Medical Entomology: A Textbook on Public Health and Veterinary Problems Caused by Arthropods* (s. 231–298). Springer Netherlands.
- Lestinova, T., Rohousova, I., Sima, M., de Oliveira, C. I., & Volf, P. (2017). Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(7), e0005600.
- Lestinova, T., Vlkova, M., Votypka, J., Volf, P., & Rohousova, I. (2015). *Phlebotomus papatasi* exposure cross-protects mice against *Leishmania major* co-inoculated with *Phlebotomus duboscqi* salivary gland homogenate. *Acta tropica*, 144, 9–18.
- Lezama-Davila, C. M., Isaac-Marquez, A. P., Barbi, J., Oghumu, S., & Satoskar, A. R. (2007a). 17 $\beta$ -estradiol increases *Leishmania mexicana* killing in macrophages from DBA/2 mice by enhancing production of nitric oxide but not pro-inflammatory cytokines. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 76(6), 1125.
- Lezama-Davila, C. M., Oghumu, S., Satoskar, A. R., & Isaac-Marquez, A. P. (2007b). Sex-associated susceptibility in humans with chiclero's ulcer: Resistance in females is

- associated with increased serum-levels of GM-CSF. *Scandinavian Journal of Immunology*, 65(2), 210–211.
- Lom, J., & Dyková, I. (1992). *Protozoan parasites of fishes* (Číslo 593.1 LOMp).
- Louis, J., Himmelrich, H., Parra-Lopez, C., Tacchini-Cottier, F., & Launois, P. (1998). Regulation of protective immunity against *Leishmania major* in mice. *Current Opinion in Immunology*, 10(4), 459–464.
- Markle, W. H., & Makhoul, K. (2004). Cutaneous leishmaniasis recognition and treatment. *American Family Physician*, 69(6), 1455–1460.
- Martin, P., & Leibovich, S. J. (2005). Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology*, 15(11), 599–607.
- Mathers, C. D., Ezzati, M., & Lopez, A. D. (2007). Measuring the Burden of Neglected Tropical Diseases: The global burden of disease framework. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 1(2), e114.
- Matthews, D. J., Emson, C. L., McKenzie, G. J., Jolin, H. E., Blackwell, J. M., & McKenzie, A. N. (2000). IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. *The Journal of Immunology*, 164(3), 1458–1462.
- Matthews, K. R. (2005). The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science*, 118(2), 283.
- Mbow, M. L., Bleyenbergh, J. A., Hall, L. R., & Titus, R. G. (1998). *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, 161(10), 5571–5577.
- McClelland, E. E., & Smith, J. M. (2011). Gender specific differences in the immune response to infection. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 59(3), 203–213.
- McConville, M. J., Turco, S. J., Ferguson, M. A., & Sacks, D. L. (1992). Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *The EMBO journal*, 11(10), 3593–3600.
- McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G. B., Hirota, S. A., Slaba, I., Waterhouse, C. C. M., Beck, P. L., Muruve, D. A., & Kubes, P. (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, 330(6002), 362–366.
- McKee, C. M., Lowenstein, C. J., Horton, M. R., Wu, J., Bao, C., Chin, B. Y., Choi, A. M. K., & Noble, P. W. (1997). Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor  $\kappa$ B-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 272(12), 8013–8018.
- Menon, J. N., & Bretscher, P. A. (1996). Characterization of the immunological memory state generated in mice susceptible to *Leishmania major* following exposure to low doses of *L. major* and resulting in resistance to a normally pathogenic challenge. *European journal of immunology*, 26(1), 243–249.
- Miquelestorena-Standley, E., Jourdan, M.-L., Collin, C., Bouvier, C., Larousserie, F., Aubert, S., Gomez-Brouchet, A., Guinebretière, J.-M., Tallegas, M., Brulin, B., Le Nail, L.-R., Tallet, A., Le Loarer, F., Massiere, J., Galant, C., & de Pinieux, G. (2020). Effect of decalcification protocols on immunohistochemistry and molecular analyses of bone samples. *Modern Pathology*, 33(8), 1505–1517.
- Michels, P. A. M., Hannaert, V., & Bringaud, F. (2000). Metabolic aspects of glycosomes in Trypanosomatidae – new data and views. *Parasitology Today*, 16(11), 482–489.

- Miles, S. A., Conrad, S. M., Alves, R. G., Jeronimo, S. M., & Mosser, D. M. (2005). A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *The Journal of experimental medicine*, 201(5), 747–754.
- Montero, C. (2003). The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 51(1), 1–4.
- Munstermann, L. (2004). Phlebotomine sand flies, the Psychodidae. *Biology of disease vectors*.
- Ng, L. G., Qin, J. S., Roediger, B., Wang, Y., Jain, R., Cavanagh, L. L., Smith, A. L., Jones, C. A., de Veer, M., Grimbaldston, M. A., Meeusen, E. N., & Weninger, W. (2011). Visualizing the neutrophil response to sterile tissue injury in mouse dermis reveals a three-phase cascade of events. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(10), 2058–2068.
- Noben-Trauth, N., Kropf, P., & Müller, I. (1996). Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. *Science*, 271(5251), 987–990.
- Noben-Trauth, N., Paul, W. E., & Sacks, D. L. (1999). IL-4-and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains. *The Journal of Immunology*, 162(10), 6132–6140.
- Oliveira, F., Rowton, E., Aslan, H., Gomes, R., Castrovinci, P. A., Alvarenga, P. H., Abdeladhim, M., Teixeira, C., Meneses, C., & Kleeman, L. T. (2015). A sand fly salivary protein vaccine shows efficacy against vector-transmitted cutaneous leishmaniasis in nonhuman primates. *Science translational medicine*, 7(290), 290ra90-290ra90.
- Paz, G. F., Ribeiro, M. F. B., de Magalhães, D. F., Sathler, K. P. B., Morais, M. H. F., Fiúza, V. O. P., Brandão, S. T., Werneck, G. L., Fortes-Dias, C. L., & Dias, E. S. (2010b). Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case-control study in dogs from a Brazilian endemic area. *Preventive Veterinary Medicine*, 97(2), 131–133.
- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M. P., Germain, R. N., & Sacks, D. (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, 321(5891), 970–974.
- Pimenta, P. F. P., Modi, G. B., Pereira, S. T., Shahabuddin, M., & Sacks, D. L. (1997). A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, 115(4), 359–369.
- Proudfoot, L., O'Donnell, C. A., & Liew, F. Y. (1995). Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *European Journal of Immunology*, 25(3), 745–750.
- Proudfoot, L., Nikolaev, A. V., Feng, G. J., Wei, W. Q., Ferguson, M. A., Brimacombe, J. S., & Liew, F. Y. (1996). Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20), 10984–10989.
- Puentes, S. M., Silva, R. P. D., Sacks, D. L., Hammer, C. H., & Joiner, K. A. (1990). Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *The Journal of Immunology*, 145(12), 4311–4316.
- Rashid, J., Chunge, C., Oster, C., Wasunna, K., Muigai, R., & Gachihi, G. (1986). Post-kala-azar dermal leishmaniasis occurring long after cure of visceral leishmaniasis in Kenya. *East African medical journal*, 63(5), 365–371.

- Ready, P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 227–250.
- Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(9), 581–596.
- Ribeiro, J. M., Mans, B. J., & Arcà, B. (2010). An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. *Insect biochemistry and molecular biology*, 40(11), 767–784.
- Ritter, U., Frischknecht, F., & van Zandbergen, G. (2009). Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends in Parasitology*, 25(11), 505–510.
- Rogers, M. E., Chance, M. L., & Bates, P. A. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, 124(5), 495–507.
- Rogers, M. E., Ilg, T., Nikolaev, A. V., Ferguson, M. A. J., & Bates, P. A. (2004). Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, 430(6998), 463–467.
- Rohoušová, I., Hostomská, J., Vlková, M., Kobets, T., Lipoldová, M., & Volf, P. (2011). The protective effect against *Leishmania* infection conferred by sand fly bites is limited to short-term exposure. *International journal for parasitology*, 41(5), 481–485.
- Rohoušová, I., & Volf, P. (2006). Sand fly saliva: Effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitologica*, 53(3), 161–171.
- Roved, J., Westerdahl, H., & Hasselquist, D. (2017). Sex differences in immune responses: Hormonal effects, antagonistic selection, and evolutionary consequences. *Hormones and Behavior*, 88, 95–105.
- Sádlová, J. (1999). The life history of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta Soc. Zool. Bohem*, 63, 331–366.
- Satoskar, A., Al-Quassi, H. H. K., & Alexander, J. (1998). Sex-determined resistance against *Leishmania mexicana* is associated with the preferential induction of a Th1-like response and IFN- $\gamma$  production by female but not male DBA/2 mice. *Immunology and cell biology*, 76(2), 159–166.
- Scott, R. B., & Still, W. J. S. (1968). Glycogen in human peripheral blood leukocytes: II. The macromolecular state of leukocyte glycogen. *The Journal of Clinical Investigation*, 47(2), 353–359.
- Serafim, T. D., Coutinho-Abreu, I. V., Dey, R., Kissinger, R., Valenzuela, J. G., Oliveira, F., & Kamhawi, S. (2021). Leishmaniasis: The act of transmission. *Trends in Parasitology*, 37(11), 976–987.
- Sharma, S., Singh, G., Chavan, H. D., & Dey, C. S. (2009). Proteomic analysis of wild type and arsenite-resistant *Leishmania donovani*. *Experimental Parasitology*, 123(4), 369–376.
- Shatova, S., Shul'ga, M., Saf'ianova, V., & Avakian, A. (1984). Comparative electron microscopy study of *Leishmania major* and *L. tropica* in experimental infestation of the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Parazitologiya*, 18(2), 154–159.
- Schlein, Y., & Jacobson, R. (1998). Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal. *Parasitology*, 117(5), 467–473.
- Schlein, Y., & Romano, H. (1986). *Leishmania major* and *L. donovani*: Effects on proteolytic enzymes of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae). *Experimental parasitology*, 62(3), 376–380.



- Silva, F., Gomes, R. B. B., Prates, D. B., Miranda, J. C., Andrade, B. de B., Barral Netto, M., & Barral, A. M. P. (2005). *Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to Lutzomyia longipalpis bites*.
- Souza, S. S., Castro, F. A., Mendonça, H. C., Palma, P. V. B., Morais, F. R., Ferriani, R. A., & Voltarelli, J. C. (2001). Influence of menstrual cycle on NK activity. *Journal of Reproductive Immunology*, 50(2), 151–159.
- Spitzer, J. A. (1999). Gender differences in some host defense mechanisms. *Lupus*, 8(5), 380–383.
- Stierhof, Y.-D., Bates, P. A., Jacobson, R. L., Rogers, M. E., Schlein, Y., Handman, E., & Ilg, T. (1999). Filamentous proteophosphoglycan secreted by Leishmania promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *European journal of cell biology*, 78(10), 675–689.
- Strand, M. R. (2008). The insect cellular immune response. *Insect Science*, 15(1), 1–14.
- Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R. E., McKerrow, J., Reed, S., & Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1301–1310.
- Sundar, S., & Rai, M. (2002). Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 9(5), 951–958.
- Theodor, O. (1935). A study of the reaction to phlebotomus bites with some remarks on "Harara."? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 29(3).
- Theodos, C. M., Ribeiro, J. M., & Titus, R. G. (1991). Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on Leishmania infection in mice. *Infection and Immunity*, 59(5), 1592–1598.
- Theodos, C. M., & Titus, R. G. (1993). Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. *Parasite immunology*, 15(8), 481–487.
- Titus, R. G., & Ribeiro, J. M. C. (1988). Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance Leishmania infectivity. *Science*, 239(4845), 1306–1308.
- Travi, B. L., Osorio, Y., Melby, P. C., Chandrasekar, B., Arteaga, L., & Saravia, N. G. (2002). Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with Leishmania spp. *Infection and Immunity*, 70(5), 2288–2296.
- Turetz, M. L., Machado, P. R., Ko, A. I., Alves, F., Bittencourt, A., Almeida, R. P., Mobashery, N., Johnson, W. D., Jr., & Carvalho, E. M. (2002). Disseminated Leishmaniasis: A new and emerging form of leishmaniasis observed in Northeastern Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(12), 1829–1834.
- Turner, R. J. (1994). Immunology: A comparative approach. Michigan university.
- Valenzuela, J. G., Belkaid, Y., Garfield, M. K., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E. D., Sacks, D. L., & Ribeiro, J. M. (2001). Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: Characterization of a protective salivary protein. *The Journal of experimental medicine*, 194(3), 331–342.
- Valigurová, A. (2007). Comparative morphology of developmental stages of gregarines and cryptosporidia with an emphasis on host-parasite interactions. Brno. Ph.D. Thesis. Masaryk University.
- Vanderberg, J. P., & Frevert, U. (2004). Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. *International Journal for Parasitology*, 34(9), 991–996.

- van Griensven, J., Carrillo, E., López-Vélez, R., Lynen, L., & Moreno, J. (2014). Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4), 286–299.
- Varga, V., Moreira-Leite, F., Portman, N., & Gull, K. (2017). Protein diversity in discrete structures at the distal tip of the trypanosome flagellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(32), E6546–E6555.
- Vera-Izaguirre, D. S., Vega-Memije, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., & Arenas, R. (2006). Leishmaniasis. A review. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 4(4), 252–260.
- Volf, P., Horák, P. (2007). Paraziti a jejich biologie. 1. vyd. Triton, Praha.
- Waitumbi, J., & Warburg, A. (1998). *Phlebotomus papatasi* saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxide production by murine macrophages. *Infection and Immunity*, 66(4), 1534–1537.
- Walters, L. L. (1993). Leishmania differentiation in natural and unnatural sand fly hosts 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40(2), 196–206.
- Warburg, A., & Schlein, Y. (1986). The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 35(5), 926–930.
- Warburg, A., & Ostrovska, K. (1987). Cytoplasmic polyhedrosis viruses in *Phlebotomus papatasi* inhibit development of *Leishmania major*. *The Journal of Parasitology*, 73(3), 578–583.
- Wei, X., Charles, I. G., Smith, A., Ure, J., Feng, G., Huang, F., Xu, D., Mullers, W., Moncada, S., & Liew, F. Y. (1995). Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, 375(6530), 408–411.
- WHO Fact Sheets: Leishmaniasis. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Verze z 8.1.2022.
- Wilson, R., Bates, M. D., Dostalova, A., Jecna, L., Dillon, R. J., Volf, P., & Bates, P. A. (2010). Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 4(9), e816.
- Young, D. G., & Duran, M. A. (1994). *Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)*. Walter reed army inst of research washington DC.
- Yurchenko, V. Yu., & Kolesnikov, A. A. (2001). Minicircular Kinetoplast DNA of Trypanosomatidae. *Molecular Biology*, 35(1), 1–10.
- Zandbergen, G. van, Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., & Laskay, T. (2004). Cutting Edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *The Journal of Immunology*, 173(11), 6521–6525.
- Zer, R., Yaroslavski, I., Rosen, L., & Warburg, A. (2001). Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *International journal for parasitology*, 31(8), 810–814.
- Zijlstra, E. E. (2014). PKDL and other dermal lesions in HIV co-infected patients with Leishmaniasis: Review of clinical presentation in relation to immune responses. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(11), e3258.
- Zuk, M., & McKean, K. A. (1996). Sex differences in parasite infections: Patterns and processes. *International Journal for Parasitology*, 26(10), 1009–1024.