

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Скалон Елизавета Кирилловна

Молекулярно-генетический и морфологический анализ природы плазмодия
ортонектид (Orthonectida)

Научная специальность: 1.5.17. Паразитология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор
Слюсарев Георгий Сергеевич

Санкт-Петербург – 2024

Оглавление

1. Введение.....	4
1.1. Актуальность.....	4
1.2. Цель и задачи.....	5
1.3. Теоретическая и практическая значимость.....	5
1.4. Научная новизна.....	6
1.5. Методология.....	6
1.6. Степень достоверности и апробация результатов.....	7
1.7. Личный вклад автора.....	8
1.8. Основные научные результаты.....	8
1.9. Основные положения, выносимые на защиту.....	9
2. Обзор литературы.....	10
2.1. Первое описание ортонектид.....	10
2.2. Филогенетическое положение ортонектид.....	10
2.3. Жизненный цикл ортонектид.....	11
2.4. Половые особи ортонектид и расселительная личинка.....	13
2.5. Паразитический плазмодий.....	14
3. Материалы и методы.....	17
3.1. Сбор материала.....	17
3.2. Морфологический анализ.....	17
3.2.1. Гистология.....	17
3.2.2. Иммуногистохимия.....	17
3.2.3. Трансмиссионная электронная микроскопия.....	18
3.2.4. Block-face сканирующая электронная микроскопия.....	18
3.3. Молекулярно-генетический анализ.....	19
4. Результаты.....	22
4.1. Морфологический анализ.....	22
4.1.1. Общая морфология плазмодия.....	22
4.1.2. Поверхность плазмодия.....	24
4.1.3. Цитоплазма плазмодия.....	25
4.1.4. Репродуктивные клетки.....	29
4.1.5. Самцы и самки ортонектид.....	31
4.1.6. Механизм выхода зрелых ортонектид из хозяина.....	33
4.2. Молекулярно-генетический анализ.....	33
5. Обсуждение.....	36
5.1. Морфология плазмодия.....	36
5.2. Плазмодий-специфичные гены ортонектид и соответствующие им белки.....	40

5.3. Природа плазмодия ортонектид.....	43
6. Заключение.....	48
7. Выводы.....	50
8. Благодарности.....	51
9. Список литературы.....	53

1. Введение

1.1. Актуальность

Паразитизм крайне широко распространен в природе [1,2]. В ходе эволюции паразитизм независимо и неоднократно возникал в различных таксонах [3]. Паразитические организмы оказывают значительное влияние на экологию, эволюцию и поведение хозяев. Они контролируют численность популяций, регулируют динамику и структуру экосистем, участвуют в энергетическом обмене и вносят вклад в трофические взаимодействия в экосистемах [1]. Паразиты - одни из важнейших компонентов биосферы, что подчеркивает необходимость исследований перехода к паразитизму у разных таксонов, эволюции паразитизма и адаптаций к паразитизму.

Изучение перехода к паразитизму в некоторых группах осложняется отсутствием дошедших до нас "переходных форм". В эту категорию попадают такие группы, как Мухозоа, Rhizocephala, Microsporidia и Orthonectida. Ортонектиды традиционно считались примитивной промежуточной формой между протистами и настоящими многоклеточными организмами [4–7]. Однако последние работы по анализу молекулярных данных подтвердили их принадлежность к Spiralia [8–13]. Ортонектиды значительно отделились от других спиралей, претерпели вторичное упрощение и стали эндопаразитами.

Ортонектиды реализуют сложный жизненный цикл с чередованием бесполого и полового поколения. Паразитический плазмодий, растущий в тканях хозяина, представляет собой бесполое поколение. Цитоплазма плазмодия содержит не только типичные клеточные органеллы, но и отдельные клетки и развивающиеся эмбрионы следующей половой стадии, что не встречается у других Bilateria. Развитые половые особи ортонектид, самцы и самки, выходят во внешнюю среду, копулируют и производят личинок, которые заражают новых хозяев.

В подавляющем большинстве исследований, посвященных ортонектидам, рассматриваются различные аспекты морфологии половых стадий и их значимость для филогении [14–21], хотя основным эволюционным приобретением ортонектид является именно паразитический плазмодий. Свободноживущие стадии живут во внешней среде всего несколько дней, участвуя только в половом размножении и расселении, в то время как паразитический плазмодий выполняет все остальные функции: питание, рост, поддержание развития половых особей, взаимодействие с хозяином и расселение по его тканям. Несмотря на то, что плазмодий является основной адаптацией ортонектид к паразитическому образу жизни, многие вопросы

его развития, функционирования и взаимодействия с хозяином остаются нерешенными. До сих пор нет единого мнения о природе плазмодия: является ли он измененной клеткой хозяина или паразитическим организмом, развивающимся в тканях хозяина [22–25].

За последние 40 лет было опубликовано всего четыре статьи по морфологии плазмодия ортонектид, и за последние 15 лет не появилось ни одной оригинальной работы по этой теме. Ограниченное количество исследований, посвященных плазмодию, не позволяет ответить на многие вопросы, касающиеся природы и функционирования этого необычного паразитического организма. Всестороннее исследование паразитической стадии ортонектид с использованием современных морфологических и молекулярных методов позволит расширить современные представления о паразитизме ортонектид и в конечном итоге решить вопрос о природе плазмодия.

1.2. Цель и задачи

Цель данного исследования - провести комплексный анализ природы плазмодия ортонектид, используя современные молекулярно-генетические и морфологические методы.

Задачи:

- 1) Сбор в природе немертин *Lineus ruber*, зараженных ортонектидами *Intoshia linei*, и их содержание в лабораторных условиях
- 2) Описание тонкого строения плазмодия *I. linei* с помощью морфологических методов (оптическая микроскопия и гистология, конфокальная микроскопия и иммуногистохимия, трансмиссионная электронная микроскопия, серийная сканирующая электронная микроскопия)
- 3) Поиск и аннотация генов ортонектид, экспрессирующихся исключительно на паразитической стадии *I. linei*, с помощью анализа данных РНК-секвенирования

1.3. Теоретическая и практическая значимость

В настоящее время изучение происхождения и эволюции паразитизма — это одна из ведущих задач для эволюционных биологов и паразитологов. С развитием современных методов все больше усилий прилагается к тому, чтобы понять, как происходит переход от свободноживущего организма к паразитическому. В широком смысле исследование паразитической стадии ортонектид представляет фундаментальный биологический интерес, поскольку оно направлено на изучение природы паразитизма в одной из самых необычных паразитических групп. В более узком смысле данное исследование играет важную роль для

понимания биологии ортонектид, способствуя разрешению давних вопросов, касающихся происхождения и природы плазмодия ортонектид.

Ортонектиды заражают широкий спектр морских беспозвоночных, влияя на различные морские экосистемы. Изучение паразитизма ортонектид имеет важное значение для морской экологии и марикультуры. Поскольку данное исследование дает представление о разнообразии паразит-ассоциированных генов ортонектид, результаты могут потенциально применяться и в практических целях, таких, как поиск новых мишеней для противопаразитарных препаратов и разработка систем защиты сельскохозяйственных животных и растений от паразитарных инвазий.

1.4. Научная новизна

Исследований паразитической стадии ортонектид проводилось крайне мало, и в качестве объектов таких исследований использовались всего четыре вида ортонектид. Для описания строения плазмодия использовались в основном методы оптической и трансмиссионной электронной микроскопии. На протяжении XX и XXI веков вышло всего четыре оригинальные статьи, посвященные паразитической стадии ортонектид [22–25]. Последняя статья о плазмодии ортонектид датируется 2009 годом. Настоящая работа качественно отличается от предыдущих исследований, поскольку в ней используется сразу несколько современных методик, таких, как иммуногистохимия, серийная сканирующая электронная микроскопия и анализ данных РНК-секвенирования. Важно отметить, что эти методы впервые применяются для изучения паразитической стадии ортонектид. Работа представляет новые данные о развитии и функционировании плазмодия ортонектид, а также о паразит-хозяинных взаимоотношениях ортонектид.

1.5. Методология

Все методы, использованные в данном исследовании, подробно описаны в разделе "Материалы и методы" и в опубликованных статьях [26,27].

Исследование проводилось на паразитической стадии ортонектид *Intoshia linei* Giard, 1877 [5], паразитов немертин *Lineus ruber* Müller, 1774 [28] (Nemertea: Pilidiophora: Heteronemertea). Зараженных хозяев наблюдали под биноклем и содержали в лабораторных условиях до фиксации.

Описание тонкого строения плазмодия было сделано при помощи оптической микроскопии (парапластовые срезы: окраска азаном по методу Гейденгайна; полутонкие срезы:

окраска метиленовым синим), иммуногистохимии (замороженные срезы: окраска DAPI, TRITC-конъюгированным фаллоидином, антителами против ацетилованного α -тубулина и серотонина), трансмиссионной электронной микроскопии и серийной сканирующей электронной микроскопии.

Для анализа генов ортонектид, специфичных для стадии плазмодия, РНК была выделена из трех образцов (зараженный хозяин, незараженный хозяин, половые особи) и отсекована. Биоинформатический анализ включал контроль качества прочтений, сборку транскриптомов, выравнивание на референс, анализ дифференциальной экспрессии генов и функциональную аннотацию белков, и был проведен для поиска генов ортонектид, экспрессирующихся исключительно на паразитической стадии жизненного цикла ортонектид, и соответствующих им белков.

1.6. Степень достоверности и апробация результатов

Результаты этого исследования были представлены на следующих конференциях:

1. Скалон, Е.К. (2017). Исследование плазмодия ортонектид (Orthonectida). 1-я ежегодная Студенческая Научная сессия Учебно-научной базы «Беломорская» СПбГУ. 10 февраля 2017 года. Санкт-Петербург, Россия.
2. Скалон, Е., & Слюсарев, Г. (2018). Есть ли ядра в плазмодии ортонектид (Orthonectida)? 2-я Студенческая Научная сессия Учебно-научной базы «Беломорская» СПбГУ. 9 февраля 2018 года. Санкт-Петербург, Россия.
3. Скалон, Е. К. (2018). Природа плазмодия ортонектид (Orthonectida): иммуногистохимические и ультраструктурные данные. Международный молодежный научный форум "Ломоносов-2018". 9–13 апреля 2018 года. Москва, Россия.
4. Скалон, Е., & Слюсарев, Г. (2019). "Плазмодий" ортонектид - что это? 3-я ежегодная Студенческая Научная сессия Учебно-научной базы «Беломорская» СПбГУ. 8 февраля 2019 года. Санкт-Петербург, Россия.
5. Skalon, E., Slyusarev, G., & Bondarenko, N. (2021). Discovering orthonectids plasmodium-specific genes (Bilateria: Orthonectida). Международная конференция "Bioinformatics: From Algorithms to Applications". 12–13 августа 2021 года. Санкт-Петербург, Россия.
6. Skalon, E., Bondarenko, N., & Slyusarev, G. (2021). New insights into the origin of the orthonectids' parasitic plasmodium (Bilateria: Orthonectida). 13th European Multicolloquium of Parasitology. 12–15 октября 2021 года. Белград, Сербия.

По результатам этого исследования были опубликованы три статьи в международных рецензируемых журналах, индексируемых в Web of Science Core Collection и Scopus.

1. Skalon, E. K., Starunov, V. V., Bondarenko, N. I., & Slyusarev, G. S. (2023). Plasmodium structure of *Intoshia linei* (Orthonectida). *Journal of Morphology*, 284(7), [e21602]. <https://doi.org/10.1002/jmor.21602>

2. Slyusarev, G. S., Skalon, E. K., & Starunov, V. V. (2023). Evolution of Orthonectida body plan. *Evolution and Development*. <https://doi.org/10.1111/ede.12462>

3. Skalon, E.K., Starunov, V.V., Slyusarev, G.S. RNA-seq analysis of parasitism by *Intoshia linei* (Orthonectida) reveals protein effectors of defence, communication, feeding and growth. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution*. <https://doi.org/10.1002/jez.b.23247>

1.7. Личный вклад автора

Автор данной работы принимал активное участие во всех этапах исследования: в постановке цели и задач, полевых работах, включая сбор материала, в получении и интерпретации результатов, в написании научных статей и представлении результатов на конференциях. Поиск и анализ литературы, экспериментальная работа (оптическая, электронная и конфокальная микроскопия), биоинформатический анализ выполнены лично автором. Фиксация и подготовка срезов для гистологического окрашивания, гистологическое окрашивание, а также выделение и секвенирование РНК были выполнены Виктором Вячеславовичем Старуновым. Некоторые схемы были подготовлены совместно автором данной работы, В.В. Старуновым, А.В. Бурнусуз и Г.С. Слюсаревым.

1.8. Основные научные результаты

1. Исследована морфология плазмодия ортонектид вида *I. linei*. Плазмодий ортонектид впервые изучен иммуногистохимическим методом, а также при помощи серийной сканирующей электронной микроскопии [26, стр. 3]. Новые данные о строении плазмодия получены также с использованием гистологических методик и трансмиссионной электронной микроскопии [26, стр. 3]. Подробно описано тонкое строение плазмодия [26, стр. 3-7]. Проведен анализ литературы и сравнение деталей строения плазмодия ортонектид и плазмодия миксосоев [26, стр. 7-8]. На основании полученных морфологических данных проведен анализ природы плазмодия ортонектид [26, стр. 9-11]. Предложена схема развития плазмодия ортонектид и его расселения по тканям хозяина [26, стр. 11]. Результаты опубликованы в [26]. Личное участие

автора в получении данных результатов: сбор материала, пробоподготовка, анализ полученных морфологических данных, анализ литературных данных, интерпретация результатов, написание статьи.

2. Проведен молекулярно-генетический анализ плазмодия ортонектид вида *I. linei*. Впервые получены данные РНК-секвенирования плазмодия [27, стр. 2]. Охарактеризованы белки, соответствующие генам *I. linei*, экспрессирующимся исключительно на паразитической стадии [27, стр. 3]. Найдены вероятные молекулярные эффекторы, участвующие в различных процессах, связанных с функционированием плазмодия ортонектид [27, стр. 3-5]. Проанализированы литературные данные о белках, играющих ключевую роль в жизнедеятельности других эндопаразитов [27, стр. 4-5]. Результаты опубликованы в [27]. Личное участие автора в получении данных результатов: сбор материала, биоинформатический анализ, анализ литературных данных, интерпретация результатов, написание статьи.

3. На основании литературных данных показано, что плазмодии всех изученных на данный момент видов ортонектид обладают сходным планом строения [21, стр. 6]. Описаны характерные черты организации плазмодия ортонектид [21, стр. 6]. Результаты опубликованы в [21]. Личное участие автора в получении данных результатов: анализ литературных данных, интерпретация результатов, написание раздела статьи, посвященного плазмодию ортонектид.

1.9. Основные положения, выносимые на защиту

1. Плазмодий ортонектид является тканевым паразитом. Плазмодий ортонектид - это многоядерный организм, содержащий в своей цитоплазме многочисленные репродуктивные клетки, дающие начало половым особям, и различные стадии формирования половых особей ортонектид.

2. Гены ортонектид, экспрессирующиеся исключительно на стадии плазмодия, и соответствующие им белки включают эффекторы, известные для других эндопаразитов и необходимые для выживания плазмодия в организме хозяина. Они участвуют в различных ключевых процессах, таких как рост в тканях хозяина, получение сигналов от хозяина, защита от хозяина, поглощение веществ, а также поддержка развития половой стадии.

2. Обзор литературы

2.1. Первое описание ортонектид

Первое упоминание об ортонектидах относится к 1869 году. Вернер Кеферштейн обнаружил загадочных овальных животных в турбелляриях [29]. Пять лет спустя Макинтош [30] наблюдал маленьких ресничных животных во время препарирования немертины. Оба исследователя представили подробные иллюстрации найденных организмов, но не сопроводили их описаниями. Группа *Orthonectida* была описана только в 1877 году Альфредом Жиаром. Он описал свою загадочную находку из офиуры *Ophiocoma neglecta* (ныне *Amphipholis squamata*) [5,31]. Препарируя центральный диск офиуры, Жиар обнаружил в бурсах загадочных животных, похожих на крупные инфузории. Он присвоил этим паразитическим организмам ранг вида, назвав вид "*Rhopalura ophiocomae*". В той же статье он описал еще два вида ортонектид, которые были найдены ранее, но не описаны: *Intoshia linei* из немертины *Lineus gesserensis* (ныне *Lineus ruber*) и *Intoshia leptoplanae* из турбеллярии *Leptoplana tremellaris*. Он объединил все три вида в отдельную группу, которую назвал "Orthonectida" из-за их способности плавать по прямой линии. Изначально Жиар описал ортонектид как многоклеточных планулообразных двухслойных животных, покрытых ресничками и имеющих метамерное строение [6, р. 19]. Альфред Жиар был первым, кто задался вопросом, является ли примитивное строение ортонектид изначальным состоянием или же оно обусловлено вторичной редукцией и адаптацией к паразитическому образу жизни. Важно подчеркнуть, что, несмотря на ограниченный набор методов, доступных в конце XIX века, Жиар успешно классифицировал ортонектид как отдельный таксон высокого ранга, и эта классификация остается неоспоримой до сих пор.

2.2. Филогенетическое положение ортонектид

Филогенетическое положение ортонектид не ясно, и дискуссии о нем продолжаются до сих пор. Традиционно таксон считали примитивным и относили к группе *Mesozoa*, эволюционно промежуточным формам между *Protozoa* и *Metazoa*, вместе с другой загадочной паразитической группой *Dicyemida* [4–7].

Однако монофилетичность, а иногда и сам факт существования группы *Mesozoa* ставили под сомнение сначала Коллери и Мениль [32], а затем и другие исследователи [16,33–35]. Хотя Коллери и Мениль отмечали сходство между ортонектидами и дициемидами, проводя

параллели между жизненными циклами этих животных, эти исследователи предполагали, что ортонектиды претерпели вторичное упрощение из-за их паразитического образа жизни [32]. Впоследствии анализ последовательностей 18S рДНК подтвердил, что Mesozoa полифилетичны, а ортонектиды представляют собой группу трехслойных животных неопределенного филогенетического положения [35].

Ортонектид сближали и с другими группами беспозвоночных. Предположения об их родстве с Annelida вначале основывались на морфологических данных [36,37]. В XXI веке близость аннелид и ортонектид была подтверждена анализом митохондриальных и ядерных генов [8,10–12]. Однако некоторые недавние филогенетические работы возрождают классическую гипотезу о монофилетичности Mesozoa (Orthonectida + Dicyemida), базируясь на молекулярных данных, и группу относят либо к Gastrotricha [9], либо к Platyhelminthes/Gnathifera [13].

2.3. Жизненный цикл ортонектид

Илья Ильич Мечников внес значительный вклад в изучение жизненного цикла ортонектид. Он впервые описал, что эмбрионы и взрослые особи ортонектид развиваются внутри так называемых "протоплазматических трубок" ("protoplasmatische Schläuche") или "плазмодиальных мешков" ("die Plasmodiumsäcke") в тканях хозяина [36]. В этом исследовании Мечников выдвинул первую гипотезу о том, как реализуется жизненный цикл ортонектид. Он предположил, что оплодотворение самок ортонектид происходит в окружающей среде. Оплодотворенная самка затем заражает офиуру *Amphiura squamata* (в случае вида *Rhopalura giardii*, описанного Мечниковым) и полностью превращается в то, что он назвал "плазмодиальным мешком". Эмбрионы, развивающиеся внутри оплодотворенной самки, напоминали Мечникову эмбрионы, которые он наблюдал внутри "плазмодиального мешка".

В конце XIX — начале XX века Морис Коллери и Феликс Мениль предложили схему жизненного цикла ортонектид [32,38]. Согласно им, половые особи ортонектид развиваются в так называемом плазмодии ("un plasmode"), растущем в тканях хозяина. Полностью развитые половые особи покидают хозяина и копулируют в окружающей среде. Затем неизвестная форма заражает нового хозяина и превращается в плазмодий [38]. Они называли многоядерную стадию плазмодия паразитической и отмечали ее автономность, поскольку она могла расти и размножаться внутри хозяина, порождая ресничные половые формы.

В 1908 году Морис Коллери вместе с Альфонсом Лаваль [39] опубликовали подробное описание эмбрионального развития ортонектид, начиная с оплодотворения самки и заканчивая

формированием подвижной ресничной личинки. В этой работе описана расселительная форма, которая заражает хозяина и превращается в плазмодий. Существование личинки, порождаемой оплодотворенной самкой, было впоследствии подтверждено Аткинсом [40] и Накано [41]. Однако детальное описание строения личинки отсутствует до сих пор.

Предложенная схема жизненного цикла ортонектид была подтверждена в ходе экспериментов, проведенных упомянутыми выше авторами [42]. Хозяева, офиуры *Amphipholis squamata*, содержались вместе с личинками ортонектид вида *Rhopalura ophiocomaе*. Авторы отмечали, как личинки проникают через бурсальные щели офиур, а затем на серии срезов наблюдали молодые плазмодии в эпителии бурсы.

В середине XX века ортонектиды описывались как "формы, у которых половое поколение формируется бесполом путем из генеративных клеток, образующихся в паразитическом плазмодии" [40]. В настоящее время понимание жизненного цикла ортонектид остается на том же уровне. Ортонектиды - облигатные эндопаразиты с прямым однохозяинным жизненным циклом: паразитическая стадия живет в одном хозяине, свободноживущая стадия дает начало личинкам, которые заражают следующих хозяев. Жизненный цикл характеризуется чередованием бесполого и полового поколений, также называемого метагенезом. Бесполое поколение представлено паразитическим плазмодием, растущим в тканях хозяина. Следующее половое поколение, представленное червеобразными ресничными самцами и самками, развивается в цитоплазме плазмодия из репродуктивных клеток. Самцы и самки покидают хозяина, двигаясь при помощи ресничной локомоции по отросткам плазмодия, направленным к внешней среде. Половые особи копулируют в морской воде, расселительные личинки развиваются в самках и выходят в воду. Личинки затем заражают новых хозяев, проникая через эпителий, и развиваются в плазмодий [43] (Рис. 1). Механизм превращения личинок в плазмодий пока не описан.

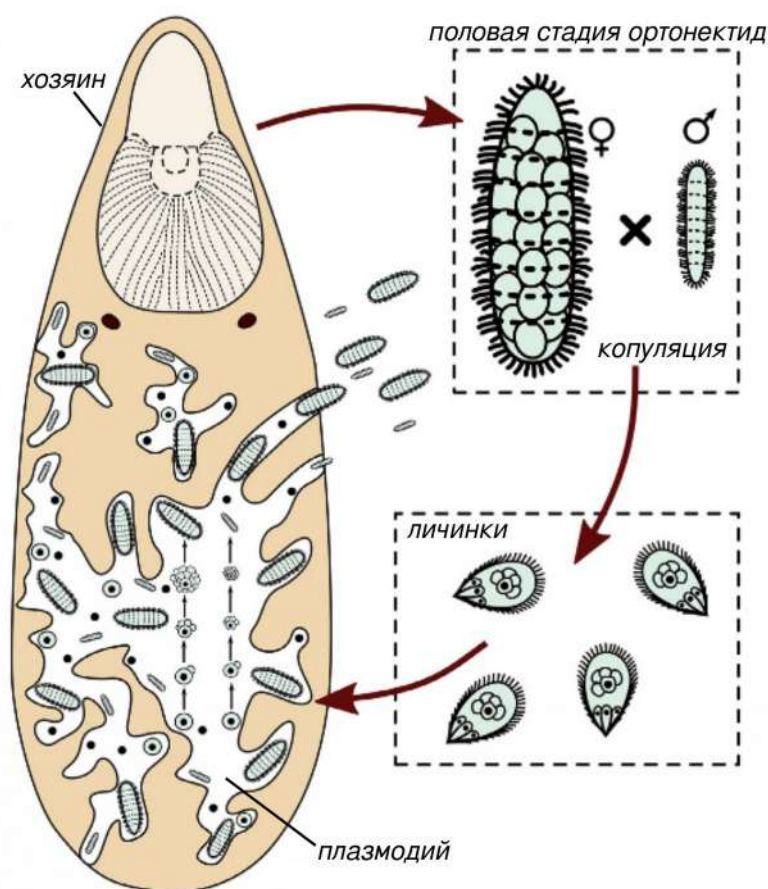


Рисунок 1. Жизненный цикл ортонектид. Из [44], с изменениями.

2.4. Половые особи ортонектид и расселительная личинка

В ранних работах Жиара [31] половые самки и самцы ортонектид были описаны как "planuliform" ("планулообразные"), что подчеркивало исключительную простоту их строения. Отмечалось, что у половых особей ортонектид из зародышевых листков представлены только эктодерма и эндодерма, а мезодерма рудиментарна. Предполагалось, что самцы и самки передвигаются в воде исключительно с помощью ресничной локомоции, поэтому половых особей ортонектид сравнивали с инфузориями. В последней работе Коллери [45] на виде *Rhopalura ophicomaе* упоминается, что ортонектиды вообще не обладают мышечной системой. О наличии нервной системы у ортонектид не упоминается. Долгое время преобладающими оставались подобные взгляды на морфологию взрослых особей, что искажало понимание филогенетического положения ортонектид и общего уровня их организации.

В более поздних работах Козловым [14,15] представлено описание сократительных клеток у *Rhopalura ophicomaе*. Впоследствии Слюсарев [46] подтвердил наличие таких клеток, а также отметил, что самки ортонектид могут изменять свою форму за счет сокращения

мускулатуры. В начале XXI века с помощью окрашивания актиновых филаментов фаллоидином у ортонекид была продемонстрирована полностью развитая мышечная система [17]. Нервная система ортонекид также была обнаружена и продемонстрирована с помощью иммуногистохимических методов [18]. Новые данные, полученные с помощью методов электронной и флуоресцентной микроскопии, существенно изменили представление об ортонекидах. Ортонекид перестали рассматривать как примитивных "планулообразных" организмов, а их родство с более эволюционно продвинутыми беспозвоночными больше не вызывало сомнений.

В настоящее время имеются подробные описания самок и самцов нескольких видов ортонекид [14–20]. И самки, и самцы имеют червеобразную форму, длина их тела в зависимости от вида и пола варьирует от 25 до 250 мкм. Их тело состоит из клеток четырех типов: эпителиальных (ресничных и не ресничных), мышечных, нервных и половых. Тело покрыто кутикулой. У половых особей ортонекид отсутствуют выделительная, пищеварительная и кровеносная системы. Самцы и самки остаются живыми в морской воде на короткий период (предположительно, нескольких дней), в течение которого они копулируют и производят следующую стадию - расселительную личинку [43].

Исследователи всего несколько раз наблюдали личинок ортонекид. Их описывают как сферические организмы длиной около 15 мкм, покрытые ресничками [40,41].

2.5. Паразитический плазмодий

Первое описание плазмодия ортонекид было сделано Мечниковым в 1881 году. Мечников отметил, что половые особи ортонекид располагаются внутри тела хозяина в многоядерных "мешках", которые он назвал "плазмодиями" [36]. С этого момента паразитическая стадия ортонекид в научном сообществе стала называться "плазмодием". Однако до сих пор нет единого мнения о природе плазмодия ортонекид.

Число исследований, посвященных паразитической стадии ортонекид, ограничено. Детальное морфологическое описание плазмодия ортонекид было сделано Козловым [22,23] и Слюсаревым с соавторами [24,25]. Вопросами о природе и функционировании плазмодия занимались также Коллери и Лаваль [42,45].

В начале XX века серия экспериментальных заражений, проведенных Коллери и Лаваль, позволила исследователям реконструировать возможную схему развития паразитической стадии [42]. Авторы работали с ортонекидами *Rhopalura ophicomae* и офиурами *Amphiura squamata* (ныне *Amphipholis squamata*). Они предположили, что личинка ортонекиды заражает

хозяина, проникая в организм через бурсальные щели. Затем несколько клеток внутри личинки высвобождаются и активно проникают в эпителий бурсы. Следующая стадия - молодой плазмодий, в котором постепенно увеличивается количество ядер. Ядра плазмодия дифференцированы - одни ядра называются вегетативными и служат для поддержания жизни паразитического организма, другие являются репродуктивными. Цитоплазма, окружающая репродуктивные ядра, обособляется, образуя в цитоплазме плазмодия отдельные репродуктивные клетки, которые впоследствии дают начало эмбрионам ортонектид. По мнению авторов, плазмодий в основном выполняет трофическую функцию, выступая в качестве посредника между организмом хозяина и развивающимися половыми особями.

В конце XX века Козлов предложил альтернативную трактовку природы плазмодия ортонектид, которая получила значительную поддержку в научном сообществе. В своей первой работе, посвященной плазмодию уже упомянутого выше вида *Rhopalura ophicomae* [22], Козлов не подтвердил наличие ядер в цитоплазме плазмодия, на что ранее указывали Коллери и другие авторы [38,45]. Согласно гипотезе Козлова, инфекционные клетки из личинки проникают через эпителий бурсальных щелей или кишечника офиуры и внедряются в мышечные клетки хозяина, расположенные между эпителием и целомической выстилкой. Инфицированная клетка хозяина гипертрофируется, и репродуктивные клетки ортонектид (по терминологии Козлова, генеративные) внутри нее дают начало эмбрионам ортонектид. Таким образом, Козлов утверждал, что плазмодий — это не паразит, а видоизмененная клетка хозяина, а ортонектиды - внутриклеточные паразиты.

Вторая работа Козлова о плазмодии ортонектид [23] подтвердила и расширила идеи, изложенные в первой работе. Исследование было посвящено ортонектидам *Ciliocincta sabellariae*, паразитирующим в аннелиде *Sabellaria cementarium*. В этой работе Козлов обнаружил несколько ядер в цитоплазме плазмодия, но объяснил их наличие либо артефактом, либо диссоциацией репродуктивных или эмбриональных клеток, цитоплазма и клеточная мембрана которых исчезли, а ядро оказалось внутри цитоплазмы плазмодия.

Слюсарев и Миллер, работавшие в основном с ортонектидами *Intoshia variabili*, паразитами турбеллярий *Macrorhynchus crocea* (ныне *Graffiellus croceus*), отстаивали иную трактовку природы плазмодия [24]. Они продемонстрировали наличие в цитоплазме плазмодия множества свободных ядер, отличающихся от ядер хозяина, используя как электронную микроскопию, так и, позднее, флуоресцентное окрашивание с DAPI [47]. По мнению авторов, плазмодий ортонектид имеет паразитическую природу и развивается во внеклеточном матриксе хозяина. Плазмодий описывается как бесформенный многоядерный организм, покрытый двумя плазматическими мембранами и содержащий в своей цитоплазме ядра, а также репродуктивные

клетки, эмбрионы и половых особей ортонектид на разных стадиях развития. Плазмодий образует многочисленные пальцевидные отростки, проникающие в ткани хозяина, что может нарушать целостность тканей [43]. Плазмодий питается окружающими клетками хозяина путем фагоцитоза и пиноцитоза [25]. Также сообщалось, что проникновение плазмодия в гонады хозяина не приводит к его кастрации [40], но заражение ганглиев хозяев травмирует их и, предположительно, может изменять их поведение [22].

В настоящее время в научном сообществе нет единого общепринятого мнения о природе плазмодия ортонектид.

3. Материалы и методы

Все использованные методы подробно описаны в опубликованных статьях [26,27]. Ниже приводится краткое описание основных этапов работы.

3.1. Сбор материала

Материалом для исследования послужили ортонектиды *Intoshia linei* Giard, 1877, паразитирующие в немуртинах *Lineus ruber* Müller, 1774 (Nemertea: Pilidiophora: Heteronemertea). Немуртин собирали в августе 2017–2023 гг. (по 150–200 особей ежегодно) на литорали Баренцева моря в районе морской биологической станции Дальние Зеленцы (69°07' с.ш., 36°05' в.д.). Собранных немуртин содержали в чашках Петри с фильтрованной морской водой при температуре 4°C и просматривали на предмет заражения ортонектидами под бинокляром. В зависимости от года от 7 до 10% собранных экземпляров были заражены ортонектидами. Выход свободноживущей стадии из хозяина провоцировали повышением температуры воды до 15-20°C.

3.2. Морфологический анализ

Процесс выхода ортонектид из зараженных хозяев наблюдали под бинокляром. Зараженные экземпляры *L. ruber* расслабляли в 7.5% растворе MgCl₂ и фиксировали в зависимости от метода.

3.2.1. Гистология

Зараженные хозяева были зафиксированы в жидкости Буэна, затем дегидрированы и заключены в парапласт. Серийные срезы толщиной 5 мкм были подготовлены с помощью микротомы Leica Autocut. Срезы монтировали на предметные стекла, окрашивали азаном по методу Гейденгайна и исследовали под микроскопом Leica DM2500, оснащенным камерой Nikon DS-Fi3.

3.2.2. Иммуногистохимия

Зараженные хозяева были зафиксированы в 4% растворе параформальдегида в фосфатном буфере (PBS), затем промыты в PBS с Тритоном X-100 (PBT), заключены в среду Tissue-Tек O.C.T. и нарезаны с помощью криостатирующего микротомы Leica CM3050S. Срезы толщиной 15-20 мкм затем были перенесены на предметные стекла, промыты в PBS,

блокированы в PBT с добавлением 1% бычьего альбумина и проинкубированы с первичными антителами против ацетилированного α -тубулина и серотонина на протяжении ночи. Затем срезы были промыты в PBT и проинкубированы со вторичными антителами на протяжении ночи. После этого срезы окрашивались TRITC-конъюгированным фаллоидином и DAPI. Окрашенные срезы заключали в Mowiol и исследовали с помощью лазерного конфокального микроскопа Leica TCS SPE.

3.2.3. Трансмиссионная электронная микроскопия

Зараженные хозяева были зафиксированы в 2,5% растворе глутаральдегида в 0.1 М какодилатном буфере (pH 7.3) с 6,85% сахарозы, затем перенесены в 1% раствор OsO₄ в том же буфере. После фиксации образцы промывали в 0.1 М какодилатном буфере, затем обезживали в серии растворов этанола и заключали в эпоксидную смолу Epon 812. Срезы были подготовлены с использованием ультрамикротомы Leica EM UC7 и алмазного ножа. Полутонкие срезы окрашивали 1% раствором метиленового синего и исследовали под оптическим микроскопом Leica DM2500 с камерой Nikon DS-Fi3. Тонкие срезы изучались при помощи трансмиссионного электронного микроскопа Jeol JEM-1400 STEM после контрастирования уранил ацетатом и цитратом свинца.

3.2.4. Block-face сканирующая электронная микроскопия

Зараженные хозяева были зафиксированы в 2,5% растворе глутаральдегида с 2 мМ хлорида кальция в 0,15 М какодилатном буфере (pH 7,4), затем промыты и перенесены в смесь 4% раствора OsO₄ и 3% ферроцианида кальция в 0,3 М какодилатном буфере с 4 мМ хлорида кальция. После фиксации образцы были отмыты и проинкубированы в растворе тиокарбондразида. После инкубации и отмывки образцы были перенесены в 2% раствор тетроксид осмия в ddH₂O, а затем в 1% раствор уранил ацетата. После окраски аспартатом свинца образцы были отмыты и обезвожены в серии разведений этанола и ацетона, а затем заключены в твердую эпоксидную смолу Epon 812. Образцы были обработаны с помощью сканирующего электронного микроскопа Thermo Scientific Volumescape 2. Стопки серийных изображений были выровнены с использованием плагина TrackEM2 для ImageJ2.

Все изображения были обработаны в программах ImageJ2, GIMP v.2.10.36 и Inkscape v.1.3.2. Все схемы были созданы в Inkscape v.1.3.2.

3.3. Молекулярно-генетический анализ

Тотальная РНК была выделена из трех образцов: 1) половые особи *I. linei*, как самцы, так и самки, вышедшие из хозяина в воду (2 биологические повторности); зараженный хозяин *L. ruber*, содержащий плазмодий ортонектид (1 биологическая повторность), и незараженный хозяин *L. ruber* (2 биологические повторности) (Рис. 2). Библиотеки для всех образцов были подготовлены по протоколу TruSeq компании Illumina. Парные прочтения длиной 100 пар оснований получали с помощью секвенатора Illumina HiSeq2500, после чего проводили оценку качества прочтений и фильтрацию. Была проведена de-novo сборка и оценка качества транскриптома незараженного хозяина *L. ruber*. Чтобы отфильтровать последовательности хозяина из прочтений зараженного хозяина, их сначала выравнивали на собранный транскриптом *L. ruber*, а затем на геном *I. linei* (NCBI: GCA_001642005.1), объединенный с геномом *Lineus longissimus* (Ensembl: GCA_910592395.2), ближайшего отсеквенированного родственника *L. ruber*, как рекомендуется для экспериментов dual-seq [48,49]. После очистки от последовательностей хозяина и от других возможных контаминаций оставшиеся прочтения ортонектид из зараженного хозяина были подсчитаны для каждой кодирующей последовательности *I. linei*. Выравнивание, фильтрацию и количественную оценку повторили и для прочтений половых особей *I. linei*. Учитывая, что ортонектиды в зараженном хозяине представляют собой смешанную популяцию, состоящую из паразитического плазмодия и находящихся внутри него половых особей (Рис. 2), для выявления генов, экспрессирующихся только на стадии паразитического плазмодия, был проведен анализ дифференциальной экспрессии генов между двумя образцами: половыми особями *I. linei*, вышедшими из хозяина, и ортонектидами (плазмодием и половыми особями, содержащимися внутри него) из зараженного хозяина. Гены, не экспрессирующиеся в образце с половыми особями, считались также не экспрессирующимися в половых особях ортонектид, отсеквенированных вместе с зараженным хозяином. Таким образом, гены, демонстрирующие значительную экспрессию у ортонектид из зараженного хозяина, но не экспрессирующиеся на половой стадии, считались плазмодий-ассоциированными генами ортонектид. Несмотря на ограниченное число повторностей (две в одной группе и одна в другой), их было достаточно для того, чтобы получить значимые результаты [50]. Все образцы имели большую глубину секвенирования, что увеличивает мощность анализа дифференциальной экспрессии [51]. Малое число повторностей может приводить к уменьшению чувствительности метода, однако это не касается генов со значительно изменяющейся экспрессией [48,50,52]. Хотя некоторые слабо экспрессирующиеся гены, специфичные для стадии плазмодия, могли не попасть в итоговый набор, достоверность

полученных генов не вызывает сомнений. Для гипотетических белков *I. linei*, соответствующих выявленным плазмодий-ассоциированным генам, была найдена вероятная клеточная локализация, проверена возможность участия в экскреторно-секреторных путях, и оценено число трансмембранных доменов. Кроме того, они были проаннотированы терминами из базы генной онтологии (Gene Ontology) и отнесены к определенным белковым семействам и суперсемействам.

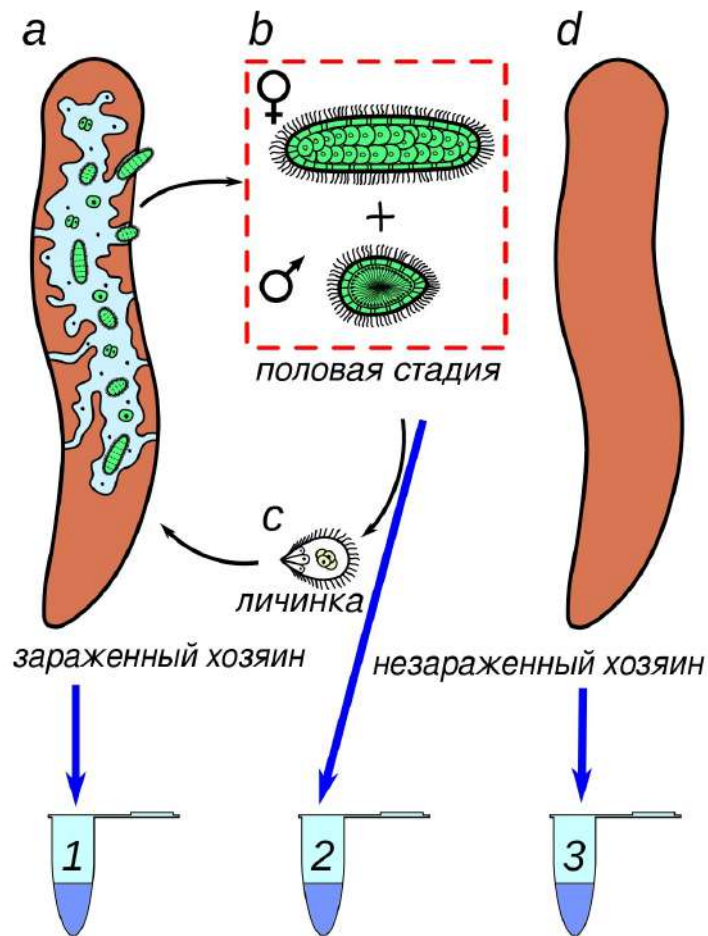


Рисунок 2. Схема жизненного цикла ортонекид *Intoshia linei* с указанием образцов, использованных для анализа РНК-секвенирования. (a) Немуртина *Lineus ruber* (коричневая), зараженная плазмодием ортонекид (светло-голубой), паразитирующим в ее тканях, первый образец. В плазмодии развиваются покрытые ресничками половые особи ортонекид (зеленые). (b) Зрелые половые особи ортонекид, вышедшие из плазмодия в окружающую среду, второй образец. Свободно плавающие самцы и самки копулируют; самцы погибают сразу после копуляции, а самки остаются живыми в течение нескольких дней до выхода личинок. (c) Личинки выходят из самок в морскую воду, заражают хозяина и превращаются в плазмодий. (d)

Немертина *Lineus ruber* (коричневая), не зараженная ортонектидами, третий образец. Из [27], с изменениями.

4. Результаты

4.1. Морфологический анализ

4.1.1. Общая морфология плазмодия

Плазмодий ортонектид виден через стенку тела *Lineus ruber* невооруженным глазом (Рис. 3А-С). Он равномерно вытянут вдоль передне-задней оси хозяина (Рис. 3А). Плазмодий не имеет определенной формы и существует в виде пальцевидных отростков разного диаметра и длины. Некоторые отростки плазмодия очень тонкие, до 3 мкм в диаметре (Рис. 4В, 5А, 7А, 9А).

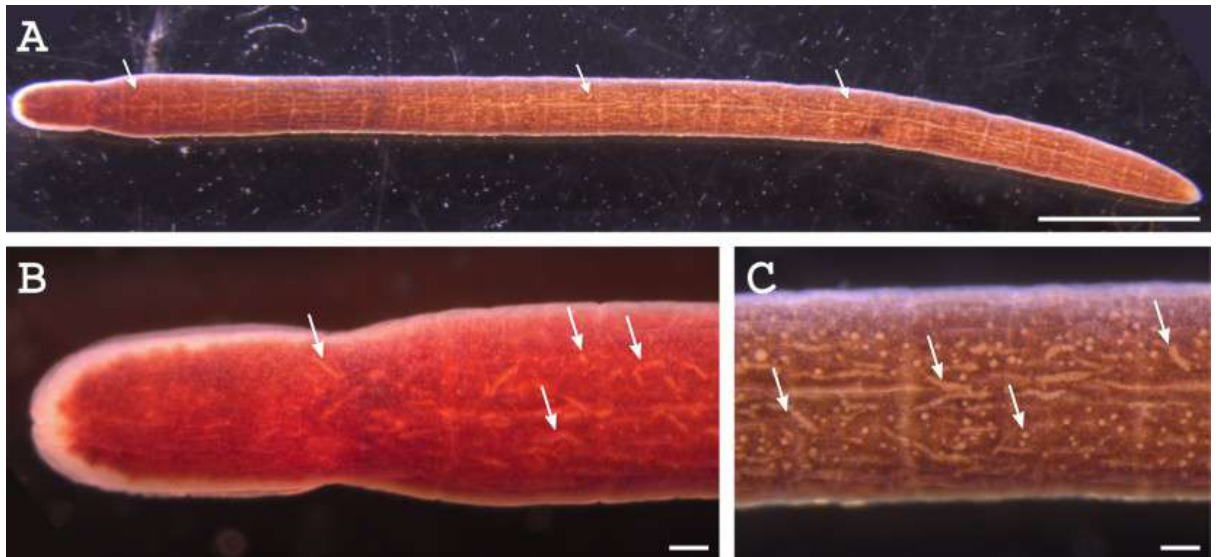


Рисунок 3. Фотографии немертины *Lineus ruber*, зараженной ортонектидами *Intoshia linei*, сделанные под биноклем. (А) Зараженный образец целиком. (В) Передняя часть зараженного хозяина. (С) Детали тела зараженного хозяина. Стрелки указывают на видимые части плазмодия. Масштабные линейки: 1 см в А и 1 мм в В, С. Из [26].

Плазмодий проникает во все внутренние органы хозяина, обычно поражая паренхиму и мышечную ткань, и иногда поражая нервную систему (Рис. 4А, 9А-В). Плазмодий может занимать значительный участок тела хозяина (Рис. 4А).

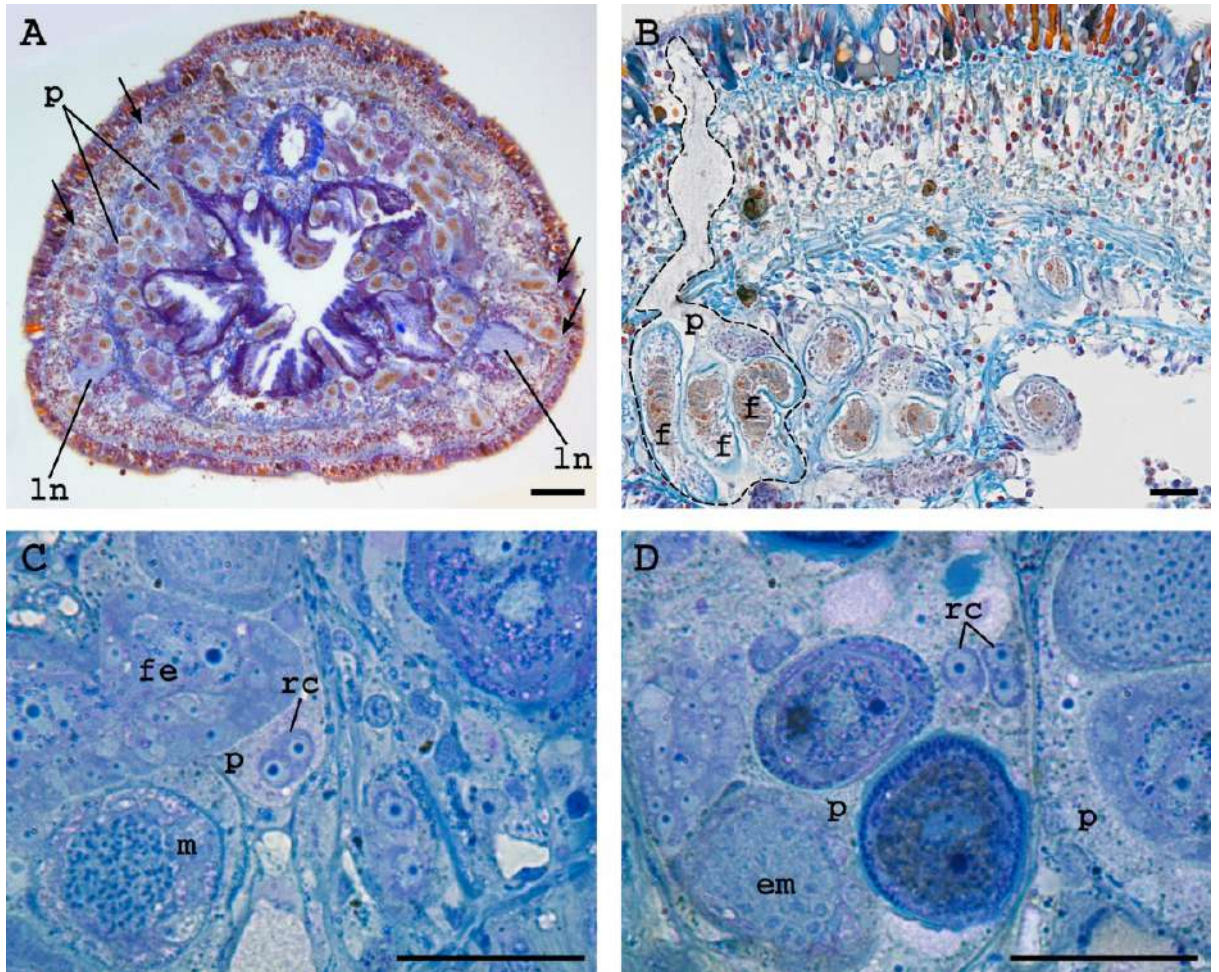


Рисунок 4. Срезы зараженной немуртины *Lineus ruber*. (А) Парапластовый срез; в плазмодии развиваются самки и самцы ортонектид. (В) Парапластовый срез; отросток плазмодия. (С, D) Полутонкие срезы; дублиеты репродуктивных клеток в цитоплазме плазмодия. em - эмбрион ортонектиды; f - самка ортонектиды; fe - женский эмбрион ортонектиды; ln - боковой нервный ствол хозяина; m - самец ортонектиды со спермиями; p - плазмодий; rc - репродуктивные клетки. Стрелками (на А) и пунктирными линиями (на В) обозначены отростки плазмодия, направленные к поверхности тела хозяина для выхода зрелых половых особей. Масштабные линейки: 100 мкм на А и 50 мкм на В, С и D. Из [26].

На некоторых участках поверхность плазмодия образует микровиллярные выросты, зачастую перпендикулярные его поверхности (Рис. 5В, 6В-Д, 8В). Поверхность плазмодия состоит из двух мембран одинаковой плотности и толщины (Рис. 5С-Д).

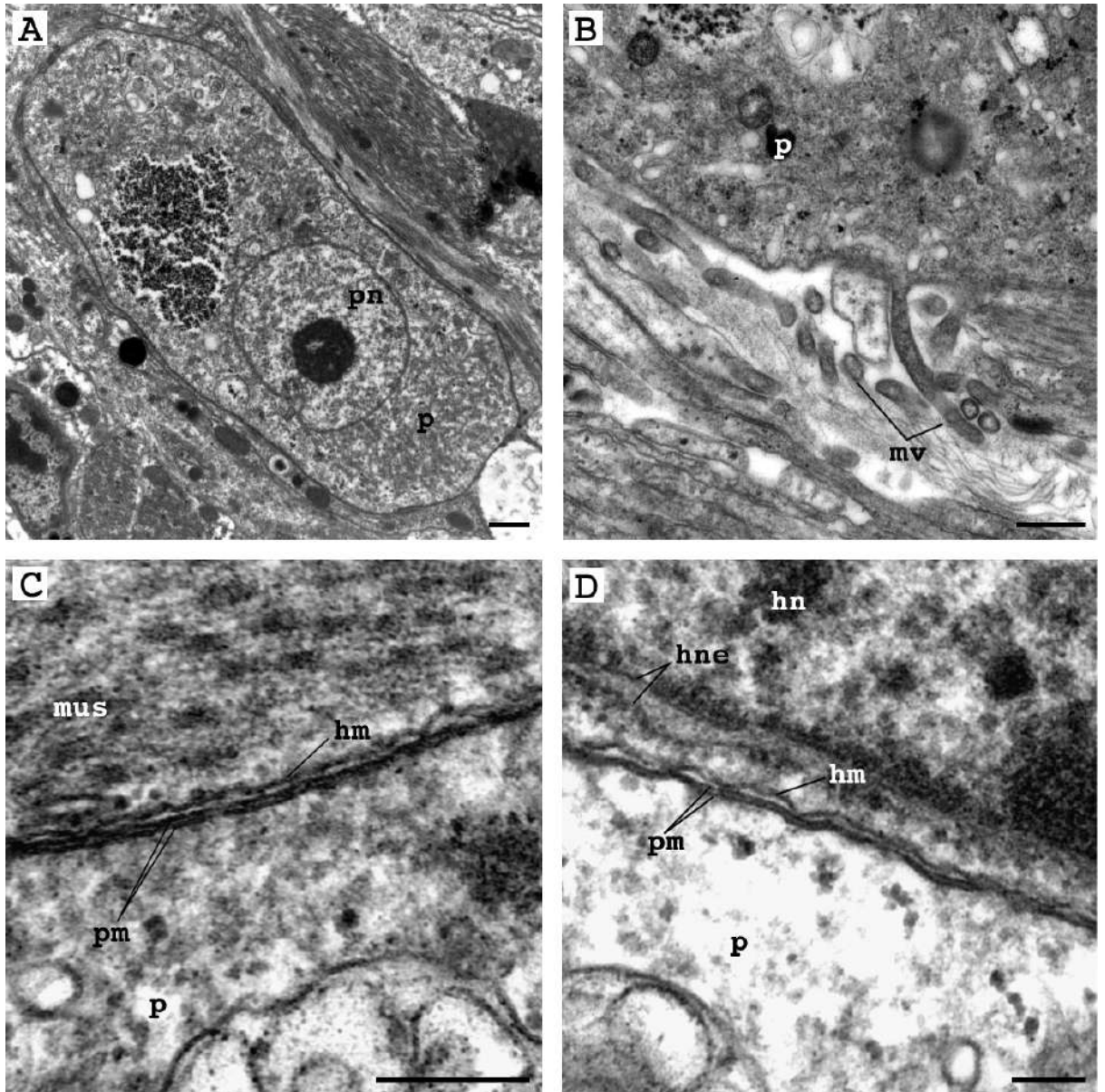


Рисунок 5. Электронные микрофотографии отростков плазмодия и его поверхности. (А) Тонкий отросток плазмодия с ядром. (В) Микровилли на поверхности плазмодия. (С, D) Цитоплазма плазмодия окружена двойной мембраной. hm - мембрана хозяина; hp - ядро хозяина; hne - ядерная оболочка хозяина; mus - мышечная клетка хозяина; mv - микровиллярные выросты плазмодия; p - плазмодий; pm - мембрана плазмодия; pn - ядро плазмодия. Масштабные линейки: 1 мкм в А, В, 200 нм в С, D. Из [26].

4.1.2. Поверхность плазмодия

На серии срезов, полученных при помощи block-face сканирующей электронной микроскопии, видно, что поверхность терминального участка отростка плазмодия покрыта большим количеством микровиллярных выростов, многие из которых вытянуты на большое

расстояние (до 4 мкм) (Рис. 6). Эти микровилли инвагинируют мембрану клетки хозяина, что, вероятно, облегчает поглощение питательных веществ плазмодием.

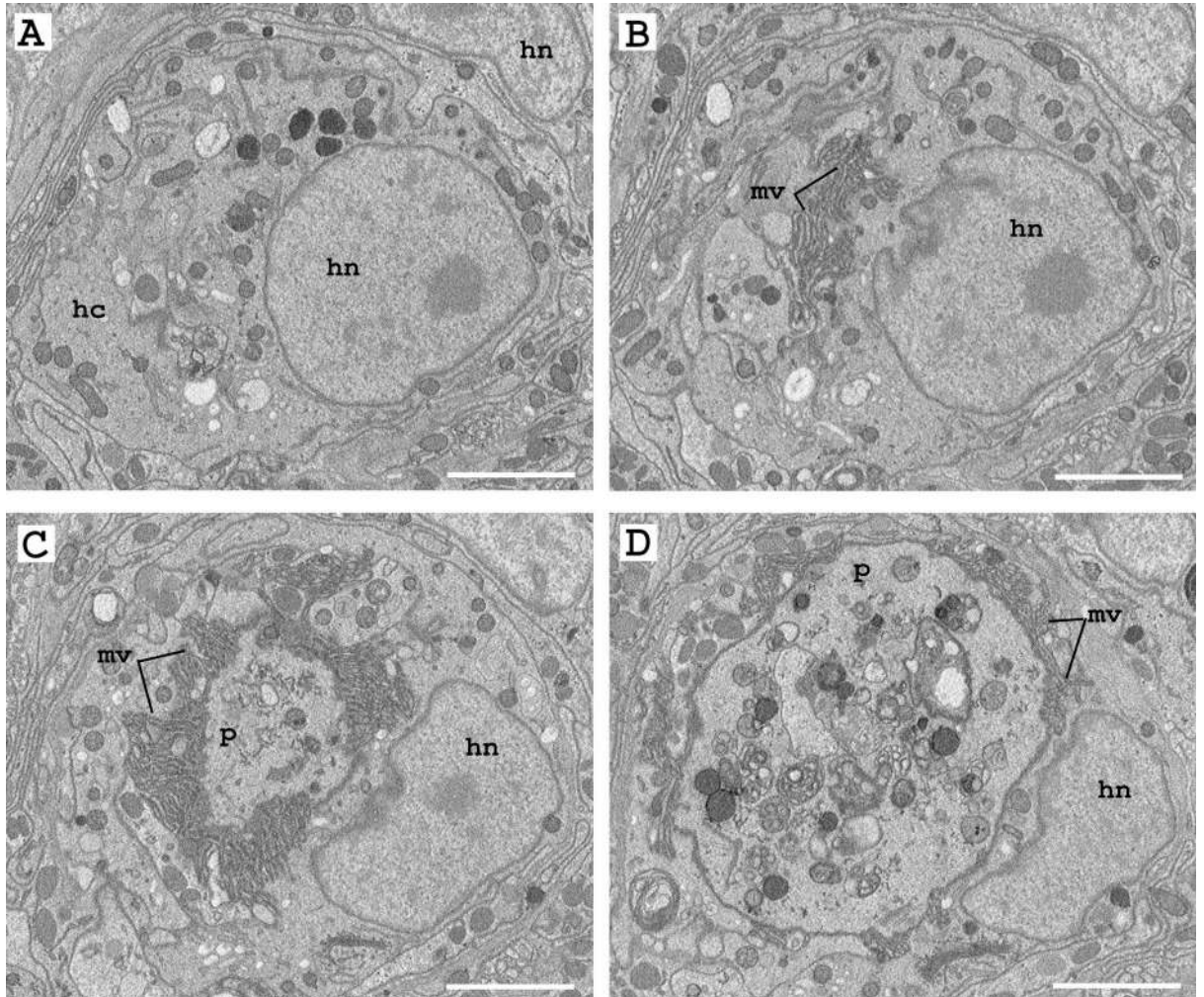


Рисунок 6. Серийные сканирующие электронные микрофотографии терминальной области отростка плазмодия. (А) Клетка хозяина с ядром. (В) В поле зрения попадают микровилли отростка плазмодия. (С, D) Становится видна цитоплазма плазмодия. hc - клетка хозяина; hn - ядро хозяина; mv - микровиллярные выросты плазмодия; p - плазмодий. Масштабные линейки: 5 мкм.

4.1.3. Цитоплазма плазмодия

В цитоплазме плазмодия лежат многочисленные ядра (Рис. 5А, 7А, С-D, 9, 11А, С). Ядра плазмодия отличаются от ядер клеток хозяина по размеру и форме (Рис. 7А, С-D, 11А). Ядра плазмодия равномерно распределены по цитоплазме и присутствуют в том числе в тонких отростках плазмодия (Рис. 5А). Они имеют округлую форму (около 2–2,5 мкм в диаметре) и содержат плотное, четко очерченное ядрышко (Рис. 5А). Некоторые ядра плазмодия находились в процессе митоза, вероятно, в метафазе (Рис. 7D).

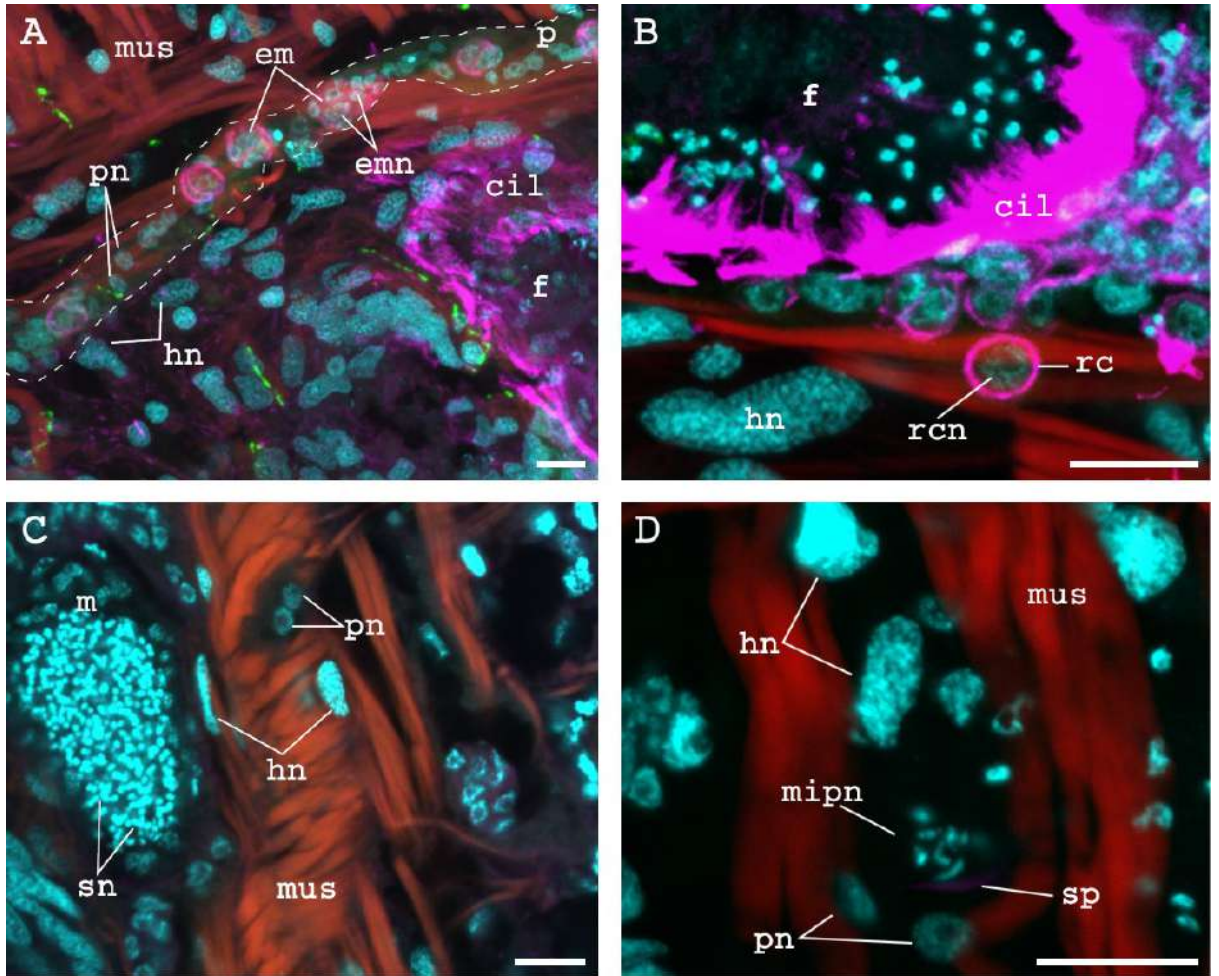


Рисунок 7. Криосрезы зараженного хозяина *Lineus ruber*, окрашенные DAPI (голубой), TRITC-фаллоидином (красный), антителами к α -тубулину (фиолетовый) и антителами к серотонину (зеленый). (A) Отросток плазмодия с ядрами и развивающимися эмбрионами. (B) Репродуктивные клетки в плазмодии. (C) Плазмодий проникает в мышцы хозяина. (D) Ядро плазмодия претерпевает митоз. cil - реснички зрелой половой особи ортонектиды; p - плазмодий; pn - ядро плазмодия; em - эмбрион половой особи ортонектиды, emn - ядро эмбриона ортонектиды; f - самка ортонектиды; hn - ядро хозяина; mus - мышцы хозяина; m - самец ортонектиды; mipn - ядро плазмодия, претерпевающее митоз; rc - репродуктивная клетка; rcn - ядро репродуктивной клетки; sn - ядра сперматозоидов самца ортонектиды; sp - микротрубочки веретена деления. Пунктирными линиями обозначены границы отростка плазмодия. Масштабные линейки: 10 мкм. Из [26].

В цитоплазме плазмодия встречается множество разнообразных везикул и мембранных структур (Рис. 8А-В, D, Рис. 9В, Рис. 10А-В). Это простые пузырьки, липидные гранулы, сложные везикулы, состоящие из более мелких везикул, мультислойные и

мультивезикулярные тела, эндосомы, а также сферические электронно-плотные лизосомы (Рис. 8А-В, D, Рис. 9В, Рис. 10А-В). Многие везикулы в цитоплазме плазмодия одеты двумя мембранами. Скопления везикул были отмечены как в межклеточном пространстве хозяина, так и в цитоплазме плазмодия. Одно скопление лежало во внеклеточном матриксе между плазмодием и мышечной клеткой хозяина (Рис. 8А). Кластер везикул выпячивал мембрану плазмодия, по-видимому высвобождаясь из цитоплазмы плазмодия в межклеточное пространство вблизи нервного ствола хозяина (Рис. 9В).

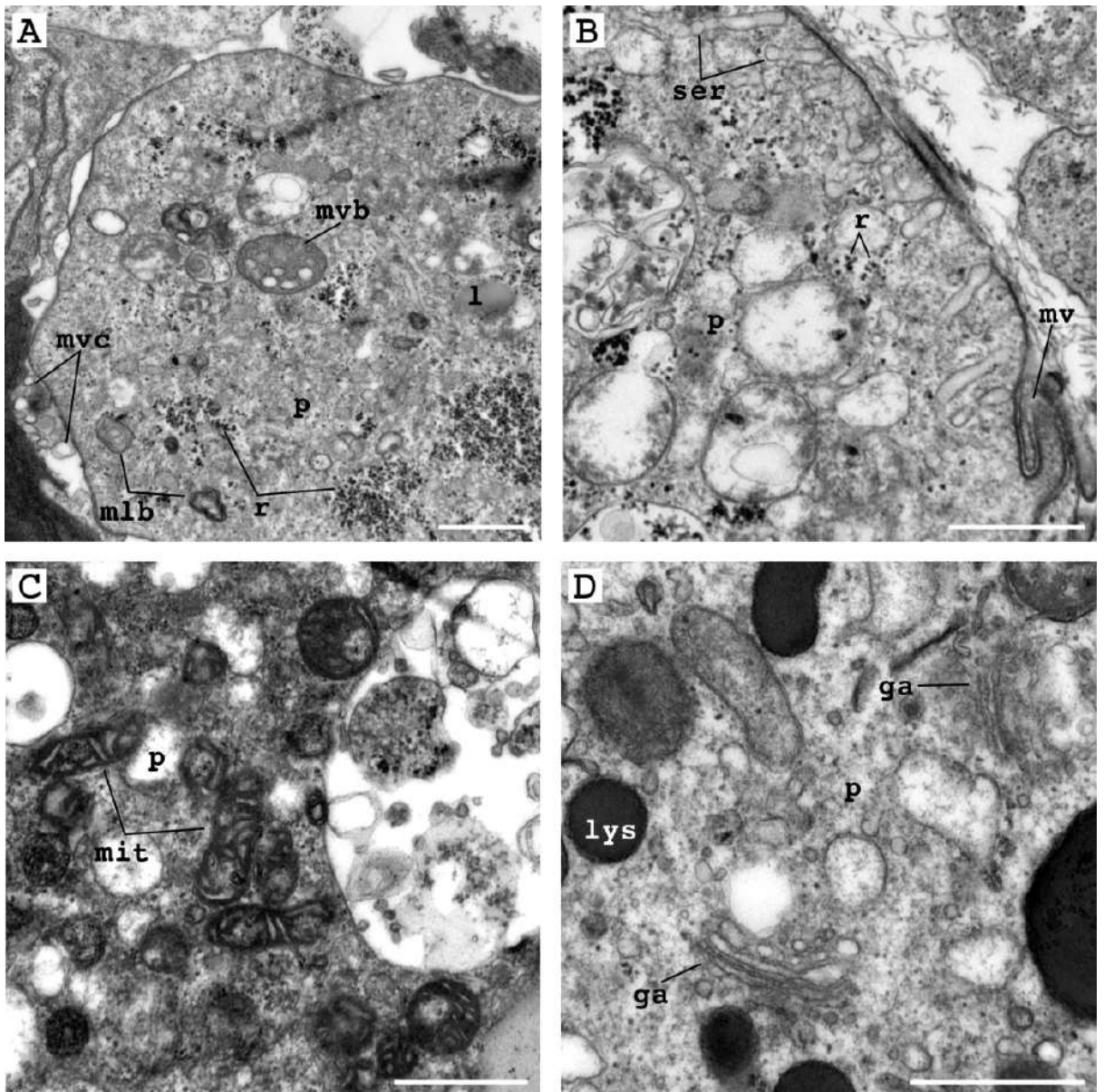


Рисунок 8. Электронные микрофотографии цитоплазмы плазмодия. (А) Различные мембранные тела в цитоплазме плазмодия и скопление везикул в межклеточном пространстве. (В) Тубулярная сеть в цитоплазме плазмодия. (С) Митохондрии плазмодия. (D) Комплексы Гольджи. ga - аппарат Гольджи; l - липидная гранула; lys - лизосома; mit - митохондрии

плазмодия; mlb - мультиламеллярное тело; mv - микроворсинки; mvb - мультивезикулярное тело; mvc - кластер везикул; p - плазмодий; r - рибосома; ser - тубулярная сеть гладкого эндоплазматического ретикулума. Масштабная линейка: 1 мкм в А, 5 мкм в В и 500 нм в С, D. Из [26].

С поверхностью плазмодия связана тубулярная сеть гладкого эндоплазматического ретикулума (Рис. 8В, 10). Многочисленные свободные рибосомы рассеяны по всей цитоплазме плазмодия (Рис. 8А-В). В цитоплазме также встречаются небольшие митохондрии с плотным матриксом (Рис. 8С) и комплексы Гольджи (Рис. 8D).

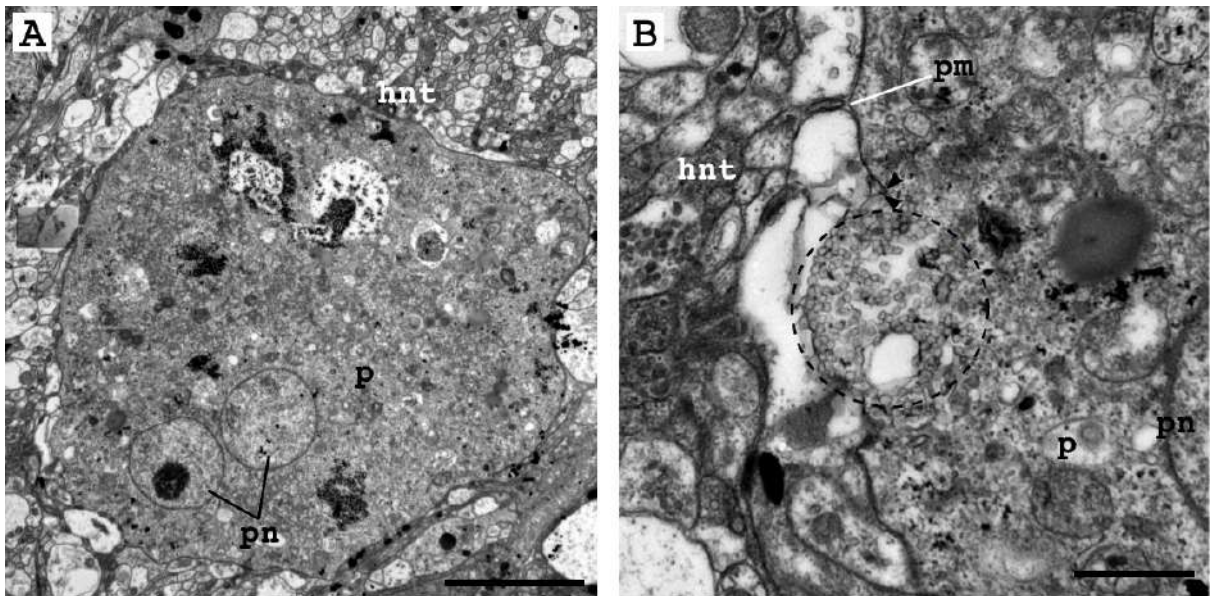


Рисунок 9. Электронные микрофотографии отростка плазмодия, проникшего в нервный ствол хозяина. (А) Общий вид отростка плазмодия с двумя ядрами в нервном стволе хозяина. (В) Выпячивание мембраны плазмодия с многочисленными везикулами, которые высвобождаются в межклеточное пространство нервного ствола хозяина. hnt - нервный ствол хозяина; p - плазмодий; pm - мембрана плазмодия; pn - ядро плазмодия; v - везикулы плазмодия. Пунктирными линиями обведено скопление везикул в цитоплазме плазмодия. Стрелки указывают на места выпячивания мембраны плазмодия. Масштабные линейки: 5 мкм в А, 1 мкм в В. Из [26].

Мы наблюдали процесс образования опущенных везикул за счет инвагинации плазматической мембраны плазмодия, что является свидетельством клатрин-зависимого эндоцитоза (Рис. 10А). Также в плазмодии наблюдался фагоцитоз - в отростке плазмодия, растущем через мышечную ткань хозяина, было отмечено формирование фагосомы (Рис. 10В).

В обоих случаях в цитоплазме плазмодия была заметна хорошо развитая тубулярная сеть, тесно взаимодействующая с плазматической мембраной плазмодия (Рис. 10).

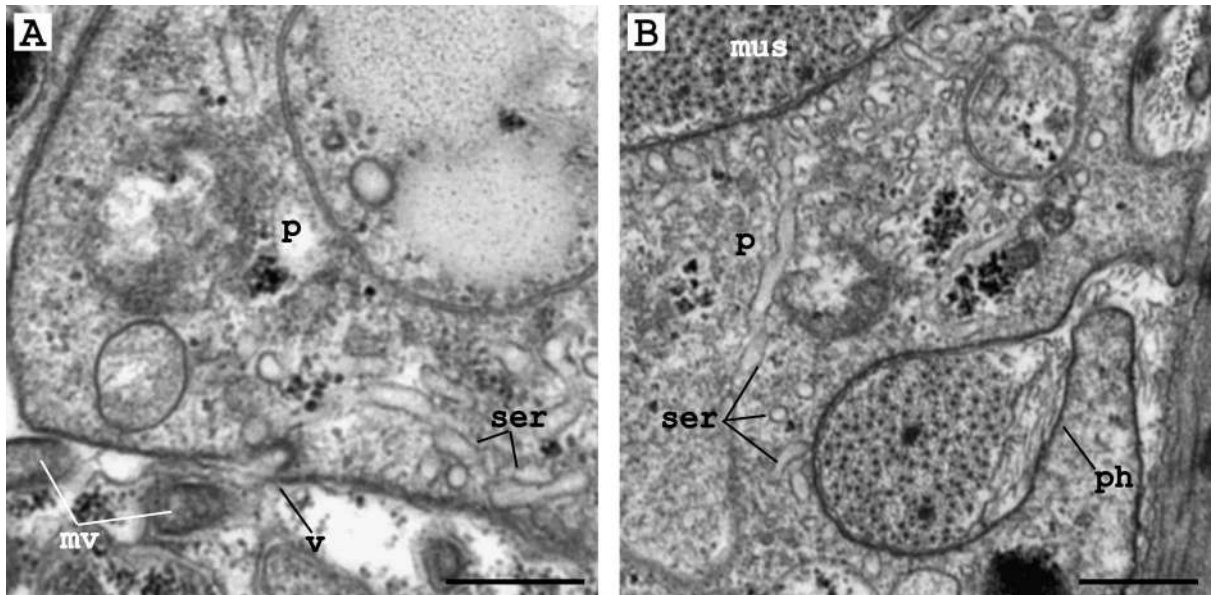


Рисунок 10. Электронные микрофотографии эндоцитоза в плазмодии. (А) Формирование опушенной везикулы. (В) Формирование фагосомы. mv - микровилли; mus - мышечная клетка хозяина; p - плазмодий; ph - фагосома; ser - тубулярная сеть; v - опушенная везикула. Масштабные линейки: 500 нм в А, 1 мкм в В.

В зрелом плазмодии большую часть внутреннего объема цитоплазмы занимают развивающиеся эмбрионы и почти зрелые самцы и самки ортонектид (Рис. 11С, 12А, С).

4.1.4. Репродуктивные клетки

В цитоплазме плазмодия периодически встречаются репродуктивные клетки (герминальные, по терминологии Козлова [22,23]) с хорошо выраженными ядрами. Это небольшие клетки, около 3 мкм в диаметре, имеющие центрально расположенное ядро (Рис. 4С-Д, 11А). Часто вокруг этих клеток видно кольцо из тубулина (Рис. 7В). В цитоплазме плазмодия содержатся как отдельные репродуктивные клетки (Рис. 4С, 7В), так и немного более крупные дублеты (Рис. 4С-Д, 11А), квартеты и так далее вплоть до многоклеточных эмбрионов (Рис. 4Д, 7А, 11С).

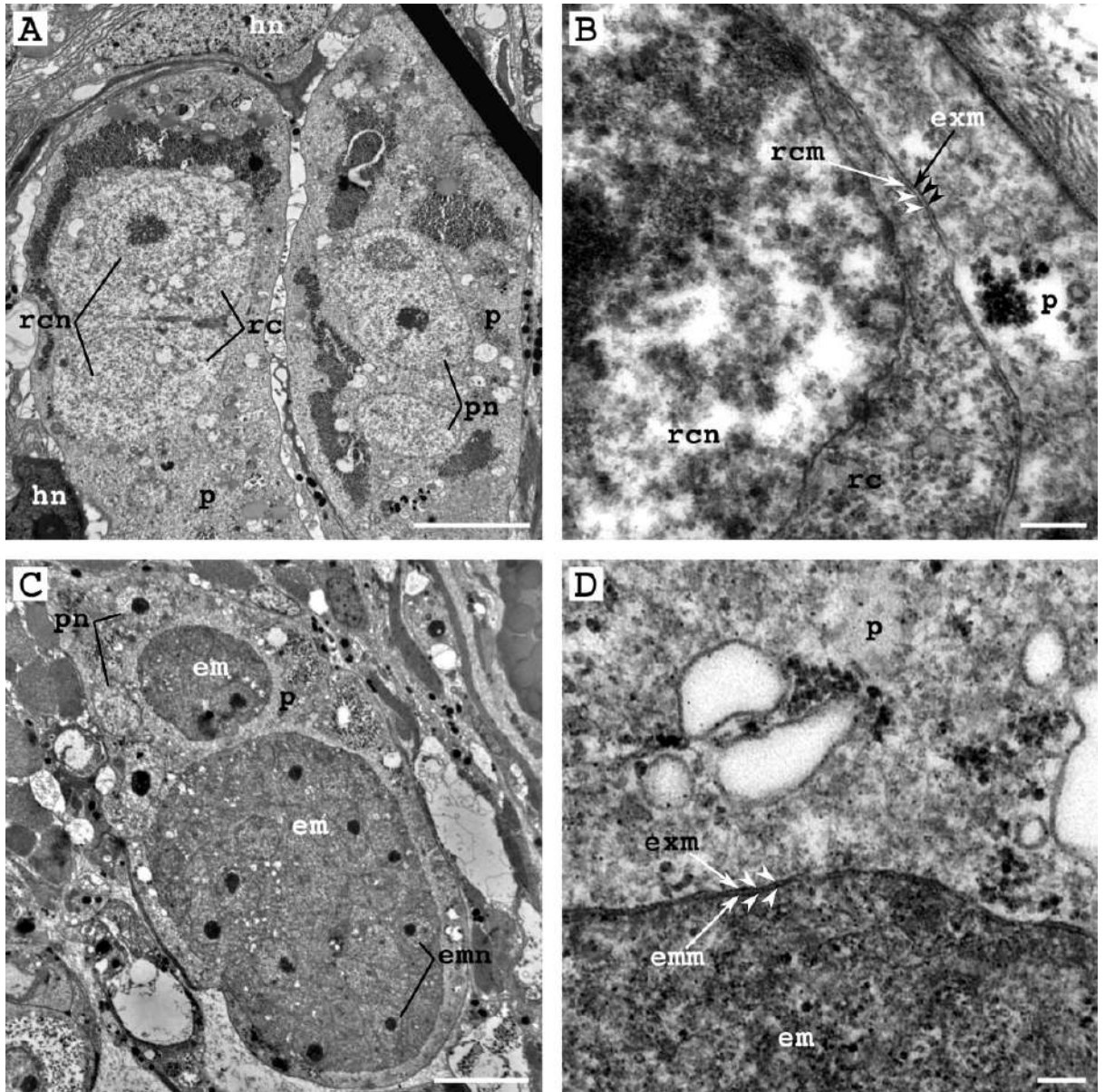


Рисунок 11. Электронные микрофотографии репродуктивных клеток и эмбрионов ортонектид в цитоплазме плазмодия. (А) Репродуктивные клетки и ядра плазмодия. (В) Репродуктивные клетки отделены от цитоплазмы плазмодия дополнительной плазматической мембраной. (С) Эмбрионы ортонектид в плазмодии. (D) Эмбрионы отделены от цитоплазмы плазмодия дополнительной плазматической мембраной. em - эмбрион ортонектиды; emm - клеточная мембрана эмбриона; emn - ядро эмбриона; exm - дополнительная мембрана, отделяющая репродуктивные клетки и эмбрионы от цитоплазмы плазмодия; hn - ядро хозяина; p - плазмодий; pn - ядро плазмодия; rc - репродуктивная клетка; rcm - плазматическая мембрана репродуктивной клетки; rcp - ядро репродуктивной клетки. Масштабные линейки: 5 мкм в А, С, 200 нм в В, D. Из [26].

Репродуктивные клетки плазмодия окружены дополнительной мембраной (Рис. 9В). Эта дополнительная мембрана сохраняется вокруг развивающихся эмбрионов до их полного формирования (Рис. 9D, 10В, D) и затем разрывается, предположительно, из-за биения ресничек зрелых половых особей (Рис. 10В, D).

4.1.5. Самцы и самки ортонектид

В цитоплазме плазмодия *I. linei* в результате последовательного деления репродуктивных клеток формируются как самки (Рис. 4В-С, 7А-В, 12А, С), так и самцы ортонектид (Рис. 4С, 7С). В среднем, соотношение самок и самцов составляет примерно 1:1. Зрелые половые особи отличаются наличием ресничек, покрывающих организм (Рис. 7А-В, 12А, С). Самцов можно отличить по ядрам спермиев с сильно конденсированным хроматином (Рис. 4С, 7С). Длина зрелых самцов примерно в два раза меньше, чем самок.

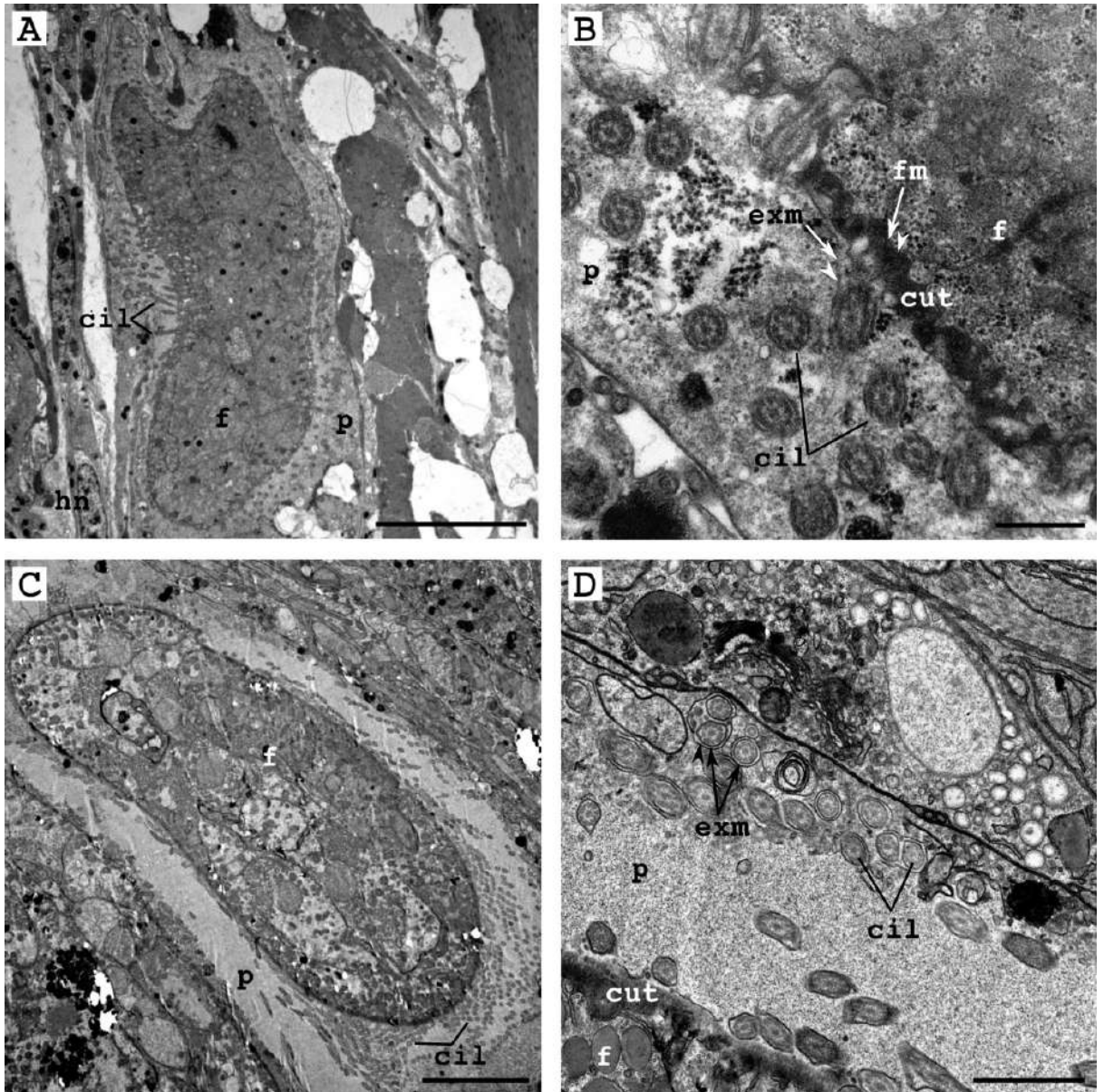


Рисунок 12. Электронные микрофотографии взрослых особей ортонектид в цитоплазме плазмодия и отростка, образуемого плазмодием для выхода взрослых особей ортонектид. (А) Покрытая ресничками самка ортонектиды в цитоплазме плазмодия. (В) Взрослые особи отделены от цитоплазмы плазмодия дополнительной плазматической мембраной. (С) Цитоплазма отростка, образованного для выхода зрелых ортонектид, почти не содержит органелл. (D) Дополнительная мембрана сохраняется вокруг некоторых ресничек полностью развитой самки ортонектиды. cil - реснички самки ортонектиды; cut - кутикула ортонектиды; exm - дополнительная мембрана, отделяющая зрелых ортонектид от цитоплазмы плазмодия; f - самка ортонектиды; fm - клеточная мембрана самки; hn - ядро хозяина; p - плазмодий. 10 мкм в А, 500 нм в В, 5 мкм в С, 1 мкм в D. Из [26].

4.1.6. Механизм выхода зрелых ортонектид из хозяина

Процесс выхода половых особей ортонектид можно наблюдать под бинокляром. Выход зрелых особей из плазмодия происходит по цитоплазматическим выростам плазмодия, направленным к поверхности тела хозяина (Рис. 4А-В). Эти отростки диаметром около 50 мкм встречаются по всему телу хозяина, чаще на спинной и боковых сторонах. Такие отростки проникают в ресничный эпителий хозяина, контактируя с окружающей средой. Стоит отметить, что в цитоплазме таких отростков практически отсутствуют органеллы (Рис. 12С-Д). Наши наблюдения показывают, что, когда такие выросты формируются, зрелые самцы и самки начинают бить ресничками и двигаться по отросткам плазмодия, выходя таким образом из хозяина один за другим.

4.2. Молекулярно-генетический анализ

Секвенирование зараженного хозяина *L. ruber* на приборе Illumina HiSeq дало в общей сложности 31 миллион парных прочтений. В результате очистки от последовательностей хозяина и от других возможных контаминаций было отфильтровано 12 миллионов парных прочтений, не принадлежащих *I. linei*. Путем анализа дифференциальной экспрессии генов между половыми особями ортонектид, вышедшими из хозяина, и плазмодием с развивающимся половым поколением внутри, было найдено 119 генов, которые предположительно экспрессируются исключительно на стадии плазмодия.



Рисунок 13. Клеточная локализация плазмодий-ассоциированных белков *I. linei*. Размер каждого столбца обозначает количество белков, локализованных в различных частях клетки. Из [27], с изменениями.

Большинство найденных плазмодий-ассоциированных белков предположительно имеют цитоплазматическую или ядерную локализацию (Рис. 13). 11 белков связаны с экскреторно-секреторными путями. Предсказание топологии показало, что 25 белков несут трансмембранные домены, что указывает на их роль в транспорте, сигналинге или связывании с другими молекулами (Рис. 14). 9 из них имеют только один трансмембранный домен, остальные - два и более трансмембранных доменов.

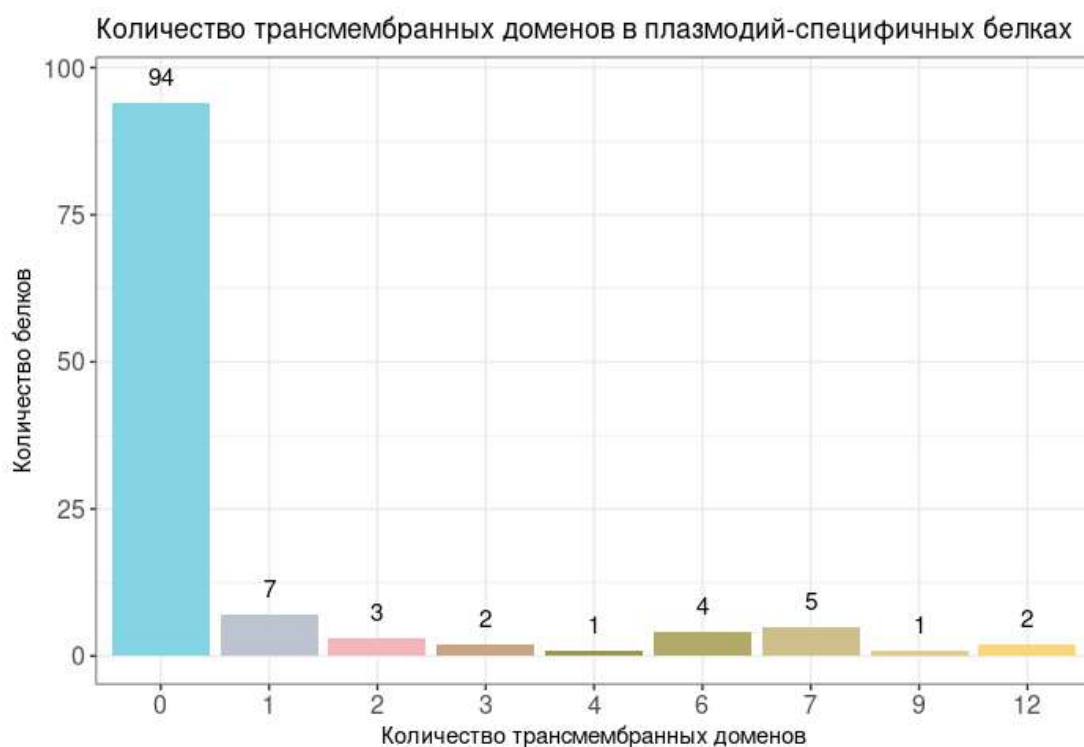


Рисунок 14. Трансмембранные домены в плазмодий-ассоциированных белках *I. linei*. Размер каждого столбца обозначает количество белков, обладающих определенным числом трансмембранных доменов. Из [27], с изменениями.

Категории из базы данных генной онтологии (Gene Ontology) были присвоены 60 белкам плазмодия. Большинство из проаннотированных таким образом белков ассоциированы с клеточными процессами, каталитической активностью, метаболическими процессами, транспортом и регуляцией (Рис. 15).

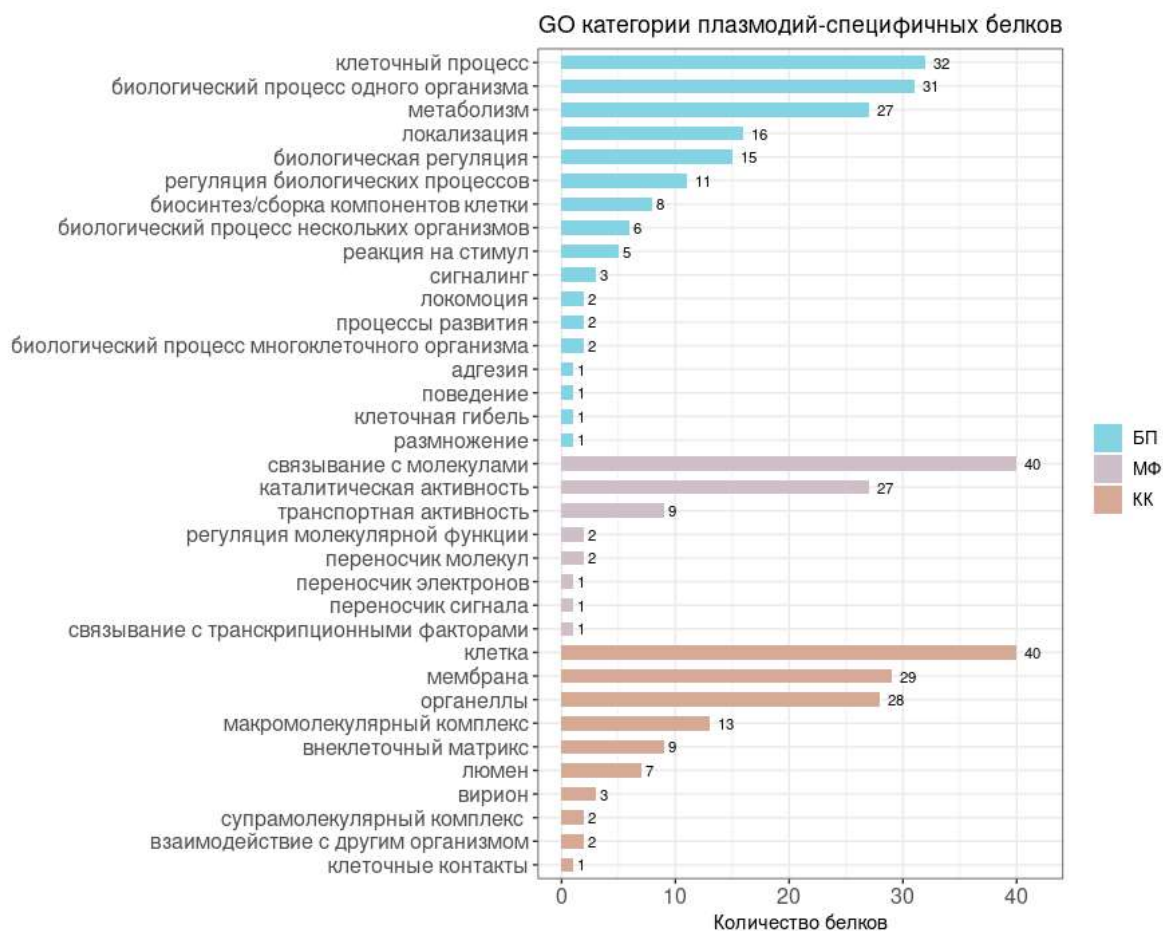


Рисунок 15. Категории генной онтологии (Gene Ontology, GO) плазмодий-ассоциированных белков *I. linei*. Размер каждого столбца отражает количество белков, отнесенных к определенной категории GO в субонтологии биологических процессов (БП), субонтологии молекулярных функций (МФ) и субонтологии клеточных компонентов (КК). Из [27], с изменениями.

35 белков плазмодия идентифицированы как "орфанные", то есть не имеющие гомологии ни с одним из секвенированных организмов, кроме ортонектид. 13 из них гомологичны белкам другого вида ортонектид *Intoshia variabili*. Практически все остальные белки плазмодия (82) были отнесены к известным семействам и суперсемействам белков путем аннотации их структурных и функциональных доменов. Для двух оставшихся белков были найдены гомологи в базе данных NCBI nr, но не найдены известные домены. Объединенные таблицы с аннотацией каждого белка можно найти в дополнительных материалах к статье [27].

5. Обсуждение

5.1. Морфология плазмодия

Основной эволюционный тренд ортонектид в связи с переходом к паразитизму - это перенос ключевой фазы жизненного цикла ортонектид на паразитическую стадию, которая существует длительное время. При этом свободноживущая стадия, задействованная только в реализации полового процесса и расселении, подвергается сильной редукции и миниатюризации [21].

Плазмодии изученных видов ортонектид (*Rhopalura ophiocomaе*, *Ciliocincta sabellariae*, *Intoshia variabili*, *I. linei*) имеют общий план строения [21–26]. Все они не имеют определенной формы, их поверхность покрыта микровиллями и состоит из двух мембран. Цитоплазма у изученных плазмодиев содержит не только клеточные органеллы, но и отдельные репродуктивные клетки, а также половую стадию ортонектид на разных этапах эмбрионального развития. Репродуктивные клетки и половые особи отделены от цитоплазмы плазмодия дополнительной мембраной (Рис. 16). Сходные черты в строении плазмодиев этих четырех видов дают основание предполагать, что плазмодии других видов ортонектид могут иметь похожую организацию [21].

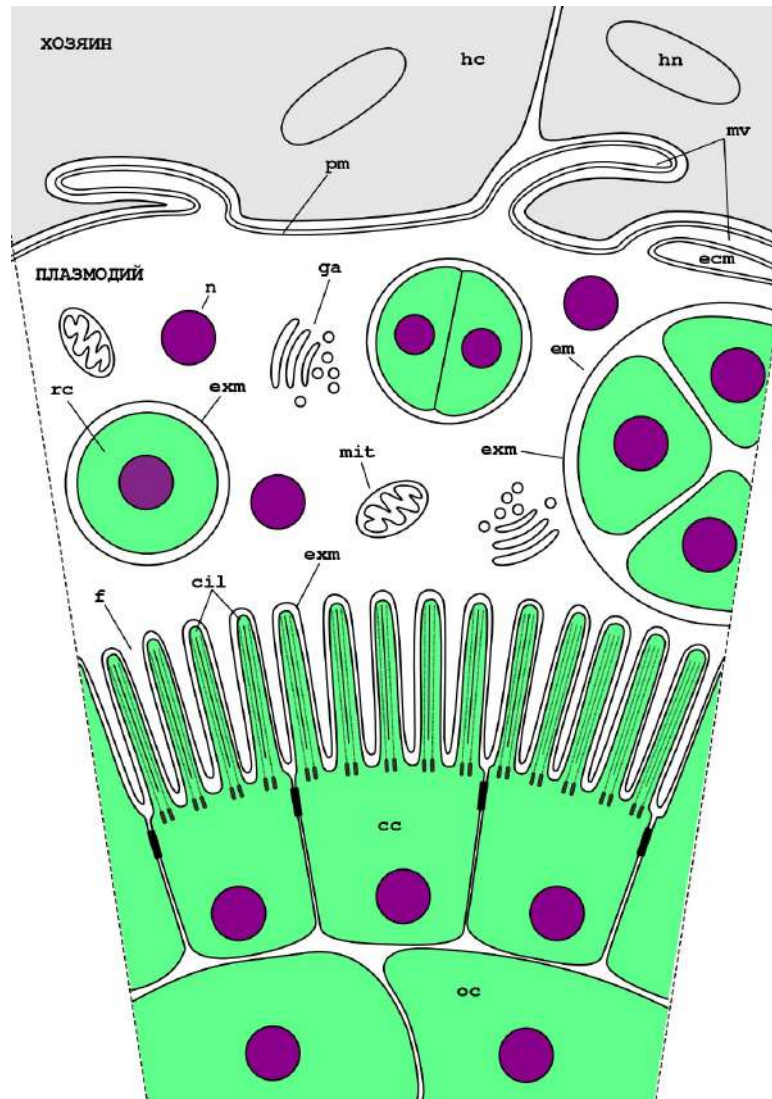


Рисунок 16. Схематическое изображение части цитоплазмы плазмодия с развитой самкой ортонектид, покрытой ресничками. cc - ресничная клетка самки; cil - реснички самки; есм - внеклеточный матрикс; exm - дополнительная мембрана, отделяющая половое поколение ортонектид от цитоплазмы плазмодия; f - самка ортонектиды; га - аппарат Гольджи; hc - клетка хозяина; hn - ядро клетки хозяина; mit - митохондрии плазмодия; mv - микровилли; n - ядро; oc - ооцит самки; pm - двойная мембрана плазмодия; rc - репродуктивная клетка. Из [26], с изменениями.

Наличие второй поверхностной мембраны было отмечено у некоторых внутриклеточных паразитических протистов, например, у Microsporidia и Apicomplexa (*Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Babesia* и др.). У представителей этих групп паразит часто бывает отделен от цитоплазмы клетки хозяина дополнительной защитной мембраной спорофорной или паразитофорной вакуоли [53,54]. Дополнительная мембрана, окружающая плазмодий ортонектид, скорее всего, не является мембраной спорофорной/паразитофорной вакуоли, поскольку мембрана плазмодия

отделяет его не от цитоплазмы клетки хозяина, а от его внеклеточного матрикса. Кроме того, обе поверхностные мембраны плазмодия сближены, функционируют как единое целое, и, вероятно, имеют паразитическую природу и поддерживаются за счет самого плазмодия.

Наличие дополнительной поверхностной мембраны также было отмечено у паразитических плазмодиев некоторых видов Мухозоа. В частности, две унитарные мембраны, предположительно паразитической природы, были обнаружены в таких родах Мухозоа, как *Henpeguya* и *Muxobolus* [55–61]. Плазмодий с двойной мембраной не типичен для Мухозоа, и наличие второй мембраны может варьировать у представителей одного вида в зависимости от типа ткани, в которой развивается плазмодий [55,58,62]. Функция такой двумембранной поверхности и механизм ее формирования у Мухозоа остаются неясными. Сходный уровень организации, который можно наблюдать у паразитических стадий Мухозоа и *Orthonectida*, позволяет проводить параллели между этими таксонами. Учитывая данные о том, что дополнительная мембрана поверхности плазмодия миксозоев может формироваться в зависимости от локализации паразита, можно предположить, что такая дополнительная мембрана у ортонектид и миксозоев несет функциональную нагрузку и связана с выживанием паразита в организме хозяина. Многочисленные мембранные структуры в цитоплазме плазмодия, такие как везикулы и тяжи, многие из которых двумембранные, могут служить потенциальным источником для поддержания функционирования двух мембран.

Плазмодий ортонектид активно поглощает питательные вещества хозяина, чтобы обеспечивать развитие полового поколения и свое функционирование. Наличие микровиллей на поверхности плазмодия, вероятно, увеличивает площадь контакта между плазмодием и хозяином, что способствует более активному поглощению веществ. Подобное строение поверхности было отмечено также у плазмодиев Мухозоа, где оно было ассоциировано с трофической функцией [55,63]. Хорошо развитая тубулярная сеть, связанная с поверхностью плазмодия ортонектид, напоминает пиноцитозные каналы, которые известны для некоторых плазмодиев Мухозоа, где они играют роль в питании [25,64,65]. Предположительно, тубулярная сеть принимает участие в процессе пиноцитоза плазмодия ортонектид. Рецептор-опосредованный эндоцитоз и фагоцитоз были также отмечены в плазмодии ортонектид. Цитоплазма плазмодия ортонектид содержит множество органелл, участвующих в эндо- и экзоцитозе. Многочисленные везикулы, гранулы, фагосомы, лизосомы, мультиламеллярные и мультивезикулярные тела свидетельствуют об интенсивности этих процессов в плазмодии.

В плазмодии *I. linei* встречались кластеры везикул, причем в одном случае кластер, по-видимому, находился в процессе высвобождения из плазмодия в межклеточное пространство нервных клеток хозяина, а в другом случае кластер располагался во внеклеточном матриксе

между мышечной клеткой хозяина и плазмодием. Первый случай напоминает процесс высвобождения везикул из телецитов человека [66]: везикулы скапливаются возле плазматической мембраны, вызывая ее выпячивание, а затем выходят из клетки в виде кластера, заключенного в оболочку, образованную клеточной мембраной. После разрушения оболочки везикулы выходят в межклеточное пространство. Если у ортонектид происходит аналогичный процесс, то оболочка кластера везикул, вероятно, состоит из двух мембран, подобно поверхности плазмодия.

Во втором случае везикулы могут принадлежать как плазмодию, так и хозяину, при этом оба варианта могут свидетельствовать о взаимодействии между хозяином и паразитом. Паразиты секретируют везикулы при различных паразитарных заболеваниях, причем такие везикулы зачастую играют важную роль в регуляции иммунного ответа хозяина [67,68]. Хотя представления о работе иммунной системы беспозвоночных ограничены, у беспозвоночных, в том числе у *Lineus ruber* [69], известно несколько механизмов врожденного иммунного ответа [70]. Предположительно, внеклеточные везикулы ортонектид могут обеспечивать выживание паразита, защищая плазмодий от хозяина. Халоти [71] предполагал, что плазмодий ортонектид может выделять литические ферменты, которые могут взаимодействовать с клетками хозяина. Такие ферменты могут содержаться внутри внеклеточных везикул и высвобождаться во внеклеточный матрикс хозяина, облегчая рост и расселение плазмодия по тканям хозяина.

Везикулы, выделяемые плазмодием вблизи нервного ствола хозяина, могут указывать на прямое воздействие паразита на нервную систему хозяина, как это происходит у некоторых паразитических протистов, трематод, паразитических насекомых и *Rhizocephala* [72–75]. И наоборот, везикулы, выделяемые хозяином в межклеточное пространство, могут смягчать течение паразитарного заболевания [76,77].

Первое упоминание о ядрах плазмодия относится к виду *Rhopalura ophiocotae* ([42], стр. 700, рис. 596). Результаты данной работы показывают, что в цитоплазме плазмодия *I. linei* присутствуют многочисленные ядра, которые очень похожи на те, что встречаются в репродуктивных клетках и эмбрионах. При этом ядра плазмодия заметно отличаются от ядер клеток хозяина. Мы впервые наблюдали ядра плазмодия во время метафазы митоза.

В цитоплазме плазмодия *I. linei* лежат репродуктивные клетки, а также самцы и самки ортонектид на разных стадиях эмбрионального развития. Репродуктивные клетки и развивающиеся эмбрионы отделены от цитоплазмы плазмодия дополнительной мембраной. То же самое ранее наблюдали у *Ciliocincta sabellariae* ([23], стр. 156, рис. 4А) и *I. variabili* [25]. Происхождение этой дополнительной мембраны, окружающей репродуктивные клетки и эмбрионы, будет более подробно рассмотрено в разделе 3 "Обсуждения".

Наличие в цитоплазме плазмодия ортонектид отдельных клеток позволяет вновь провести аналогию с плазмодиями Мухозоа. Трофические стадии некоторых миксозоев в промежуточном позвоночном хозяине представляют собой плазмодии, содержащие в своей цитоплазме генеративные клетки, которые в результате спорогонии (бесполого размножения) образуют многоклеточные миксоспоры. Впоследствии споры высвобождаются во внешнюю среду и заражают окончательных хозяев - беспозвоночных [63].

5.2. Плазмодий-специфичные гены ортонектид и соответствующие им белки

Паразитизм в различных таксонах возникал независимо и неоднократно [3]. Несмотря на филогенетическое разнообразие паразитов, у различных паразитов на морфологическом, функциональном и геномном уровне наблюдаются конвергентные черты [3,78–81]. Молекулярные адаптации, общие для эндопаразитов независимо от их филогенетического положения, обычно ассоциированы с процессами проникновения в организм хозяина, защиты от иммунитета хозяина, коммуникации между хозяином и паразитом и поглощения паразитом питательных веществ. Молекулярные эффекторы, общие для эндопаразитов из разных групп, зачастую выявляются путем сравнения генов или белков, наиболее активных на паразитической стадии организма по сравнению со свободноживущей стадией либо со свободноживущими родственными видами [78–81]. В данной работе плазмодий ортонектид был впервые изучен при помощи молекулярных методов, и поиск предполагаемых функций гипотетических белков, ассоциированных с паразитической стадией ортонектид, был основан на существующих исследованиях о генах, ассоциированных с эндопаразитизмом в различных кладах [27].

Большая часть из найденных и проаннотированных генов и соответствующих белков, специфичных для плазмодия — это ферменты и транспортеры. Это согласуется с устоявшимся представлением о плазмодии как о трофической стадии, обеспечивающей эмбриональное развитие половой стадии внутри своей цитоплазмы [22–25]. Обилие в полученных результатах белков, связанных с эндоцитозом, экзоцитозом и транспортом везикул, согласуется с морфологическими данными об активности этих процессов в цитоплазме плазмодия [24,26]. Выявленные метаболические ферменты, скорее всего, обеспечивают интенсивный обмен веществ, необходимый для роста плазмодия и развития половых стадий. Преобладание экскреторно-секреторных белков, транспортеров и рецепторов в полученной аннотации позволяет предполагать взаимодействие между хозяином и паразитом - процесс, который у ортонектид до сих пор не был достаточно изучен.

Плазмодий, развивающийся в тканях хозяина в тесном контакте с его клетками, должен обладать механизмами для взаимодействия с окружающей его средой. К белкам, ассоциированным со взаимодействием эндопаразитов и их хозяев, относятся, например, экскреторно-секреторные белки, которые паразиты могут выделять в окружающие ткани/клетки хозяина [67,68]. Полученный набор плазмодий-специфичных белков включает несколько белков, которые могут выделяться плазмодием во внешнюю среду, поскольку обладают экскреторно-секреторным потенциалом. Особый интерес представляет гомолог лектина типа С, играющий важную роль в защите некоторых паразитов от иммунной системы хозяина [82] и врожденном иммунном ответе беспозвоночных в целом [83,84]. У *L. ruber* реализуется несколько путей врожденного иммунного ответа [69], и ортонектидный лектин типа С может играть роль во взаимодействии с компонентами этих путей. Еще один потенциальный экскреторно-секреторный белок плазмодия относится к суперсемейству α/β -гидролаз, представители которого были обнаружены у паразитических трематод, нематод и протистов (*Cryptosporidium*, *Plasmodium*). α/β -гидролазам приписывается важная роль в развитии и выживании паразитов за счет их способности катализировать деградацию эндогенных липидов и липидов хозяина [85,86]. Также был найден потенциальный член семейства белков теплового шока 70 (HSP70) - белков, часто встречающихся среди компонентов внеклеточных везикул паразитов и участвующих в адаптивной реакции организмов на изменения окружающей среды [87,88]. Кроме того, в качестве потенциального экскреторно-секреторного белка плазмодия был обнаружен вероятный член суперсемейства аспаргиновых протеаз. Поскольку плазмодий растет внутри хозяина и прорастает через его ткани [24,26], ему необходимо иметь механизмы для нарушения адгезии клеток хозяина. В этот процесс потенциально могут быть вовлечены секретлируемые протеазы, в большом количестве найденные в секретах многих эндопаразитов [67,87].

Некоторые плазмодий-специфичные белки не были отнесены к экскреторно-секреторным в процессе анализа, но все же могут играть потенциальную роль во взаимодействии хозяина и паразита. К ним относятся гомологи серпина, аспартатной протеазы, лектин SUEL-типа и металлопротеаза с репролизинным доменом, обнаруженная в протеоме нематоцист некоторых Muxozoa [89].

Экскреторно-секреторные белки выводятся из цитоплазмы клеток во внеклеточный матрикс при помощи внеклеточных везикул [67,68]. Цитоплазма плазмодия ортонектид содержит многочисленные везикулы, мультивезикулярные тела и кластеры везикул, которые могут выводиться из цитоплазмы [24,26]. При анализе плазмодий-ассоциированных белков были выявлены несколько гомологов белков, изученных ранее в контексте паразитических

внутриклеточных везикул [88]. Енолаза, многофункциональный фермент, участвующий в гликолизе, играет роль в паразит-хозяинных взаимодействиях у трематод, нематод и протистов и связана с биогенезом внутриклеточных везикул [90,91]. Тетраспанины, интегральные мембранные белки, способные взаимодействовать с различными мембранными и цитозольными белками, активно участвуют в биогенезе, сортировке и транспорте внутриклеточных везикул у гельминтов [92–94]. Кроме того, в плазмодии были идентифицированы гомологи белков, которые могут быть вовлечены в биогенез везикул, например, белки SNARE и ГТФазы Rab, играющие важную роль в секреции везикул [95].

Еще одна категория белков, способная участвовать в процессе коммуникации между хозяином и паразитом — это мембранные белки. Зачастую ассоциированные с поверхностью паразита, эти белки могут функционировать как рецепторы, реагирующие на стимулы хозяина и иницирующие ответ паразита. Кроме того, они могут служить селективными транспортерами, регулируя обмен химическими веществами между паразитом и хозяином [79]. Некоторые мембранные белки, например, белки SNARE и тетраспанины, могут быть ассоциированы с везикулярными мембранами. Мембранные белки составляют почти треть от общего числа выявленных плазмодий-специфичных белков *I. linei*. Хотя предполагаемые функции большинства из них остаются неизвестными, для некоторых белков обнаружены гомологи среди других беспозвоночных и паразитов.

К мембранным белкам плазмодия были отнесены два потенциальных рецептора, сопряженных с G-белком (серпантинные рецепторы, GPCRs), которые в избытке представлены у эндопаразитов, где они участвуют в реакции на сигналы хозяина [96]. Кроме того, были обнаружены пять вероятных членов суперсемейства MFS-транспортеров, а также гомолог переносчика Co/Zn/Cd. Поскольку плазмодий постоянно растет внутри хозяина, он нуждается в механизме получения сигналов от окружающих его тканей, что обеспечивается различными рецепторами его поверхности. Кроме того, мембранные белки поверхности плазмодия могут способствовать переносу простых молекул как в сторону плазмодия, так и в сторону хозяина. Некоторые из найденных мембранных белков могут быть ассоциированы с мембраной, которая отделяет развивающееся половое поколение от цитоплазмы плазмодия, что, по-видимому, облегчает коммуникацию между плазмодием и эмбрионами.

Эндоцитоз играет ключевую роль в патогенезе многих эндопаразитов [97]. Процесс фагоцитоза в плазмодии ортопектид наблюдался как в данном исследовании, так и в работе Слюсарева и Черкасова [25], наряду с наличием различных эндосом, лизосом, мультивезикулярных и мультиламеллярных тел в цитоплазме плазмодия [24,26]. В этом исследовании впервые было выявлено клатрин-зависимое образование везикул в плазмодии,

что является одной из форм эндоцитоза. Все эти данные свидетельствуют об активных процессах эндо/экзоцитоза, протекающих в плазмодии [24,26]. Анализ выявил несколько специфических для плазмодия белков, потенциально участвующих в процессах эндо- и экзоцитоза плазмодия. К ним относятся гомологи эпсина, плекстрина, субъединицы mu1 клатринового адаптерного комплекса, протеазы, лектины, белки SNARE, ГТФазы Rab, стоматин, тетраспанин, белок, содержащий домен BAR, и рецепторы, сопряженные с G-белком [98].

Около четверти найденных плазмодий-ассоциированных белков *I. linei* в настоящее время не имеют гомологов ни с одним известным таксоном кроме Orthonectida. Это согласуется с дивергентной генетической природой ортонектид [8,44]. Ортонектид сближают с разными таксонами, и последние молекулярные работы подчеркивают неопределенность их взаимоотношений с ныне живущими группами [8–13]. Орфанные гены обычно узко распространены, быстро эволюционируют и обеспечивают адаптацию к конкретной линии [99]. В то время как некоторые орфанные гены, специфичные для плазмодия, могут со временем обрести гомологов по мере секвенирования новых организмов, часть из них может обеспечивать уникальные адаптации ортонектид к паразитизму.

5.3. Природа плазмодия ортонектид

Существует две точки зрения на природу плазмодия ортонектид. Традиционно плазмодий ортонектид рассматривался как тканевой паразит, в цитоплазме которого происходит развитие половых особей [36,38,42,45]. Такой взгляд на природу плазмодия сохранялся вплоть до выхода работ Козлова [22,23]. Согласно терминологии Козлова, только репродуктивные клетки (которые он называл герминальными) плазмодия можно считать паразитическими, тогда как цитоплазма плазмодия — это цитоплазма видоизмененной клетки хозяина. Козлов предполагал, что репродуктивные клетки ортонектид, попадая внутрь клетки хозяина, вызывают ее гипертрофию. Самцы и самки ортонектид формируются за счет деления этих репродуктивных клеток, и организм, который ранее описывался как "плазмодий", на самом деле является видоизмененной клеткой хозяина. Другими словами, хотя деление репродуктивных клеток и развитие взрослых особей происходит внутри плазмодия, сам он не является стадией жизненного цикла ортонектид, то есть ортонектид можно считать внутриклеточными паразитами.

По Козлову [22,23], после проникновения личинки ортонектид в хозяина паразитические клетки личинки внедряются в клетку хозяина. Клетки ортонектид делятся, давая начало

половому поколению. Любые свободные ядра, встреченные в цитоплазме плазмодия, либо являются артефактами [22,23], либо происходят из дезинтегрированных репродуктивных клеток, цитоплазма и клеточная мембрана которых исчезли (см. [23], стр. 157, рис. 5). Судьба ядра хозяина при этом остается неясной - Козлов [23] предполагает, что оно "выходит" из плазмодия, но не приводит никаких подтверждений этой точки зрения.

В дальнейшем Слюсарев и Миллер [24] опровергли предположение Козлова [22] о том, что плазмодий — это гипертрофированная клетка хозяина. Теория Козлова в 1994 году основывалась на отсутствии ядер плазмодия в его цитоплазме. Слюсарев и Миллер опровергли идею Козлова, представив три аргумента против нее. Эти аргументы включали (1) подтверждение наличия свободных ядер в цитоплазме плазмодия *I. variabili* [24] и *R. orphiosomae* [42], (2) подтверждение сходства морфологии ядер плазмодия и ядер клеток эмбрионов ортонектид, и (3) подтверждение наличия специализированных клеток хозяина, отделяющих плазмодий от тканей хозяина, с ядрами, значительно отличающимися от ядер плазмодия. Эти аргументы по-прежнему актуальны в случае плазмодия *I. linei* [26]. Наличие ядер плазмодия, в том числе находящихся в метафазе митоза и без признаков дезинтеграции, подтверждено различными морфологическими методами, что опровергает идею Козлова о том, что эти ядра являются артефактами [22,23].

В 1997 году Козлов [23] предложил альтернативное объяснение, согласно которому свободные ядра, видимые в цитоплазме плазмодия, остаются от дезинтегрированных репродуктивных клеток или клеток эмбрионов. Согласно этой гипотезе, такие изолированные ядра ортонектид продолжают работать в цитоплазме зараженной клетки хозяина, обеспечивая ее жизнедеятельность в течение долгого времени. Хотя существуют данные о том, что у многоклеточных животных ядро одного вида может функционировать в цитоплазме другого вида *in vitro* (межвидовой перенос ядра, [100]), в природе такой механизм не известен. Поэтому единственный возможный сценарий, допускающий то, что плазмодий — это видоизмененная клетка хозяина, подразумевает, что ядра в цитоплазме плазмодия — это ядра хозяина, то есть паразитическими являются только репродуктивные клетки ортонектид и эмбрионы. При таком сценарии плазмодий может напоминать ксеномы — комплексы клеток хозяина, гипертрофированные из-за заражения внутриклеточными паразитами. Они встречаются у организмов, зараженных некоторыми видами Microsporidia, Apicomplexa, Mухozoa и т. д. [101–104]. Паразитарные инфекции, вызывающие гипертрофию клеток хозяина, могут приводить к увеличению и фрагментации ядра клетки хозяина. Однако ядра плазмодия *I. linei* не несут признаков аномалий, гипертрофии или фрагментации. Они неотличимы от ядер других клеток ортонектид, и маловероятно, что ядра хозяина претерпели столь радикальные изменения и

полностью поменяли свою морфологию. Учитывая все имеющиеся данные, ядра плазмодия и цитоплазма плазмодия, окруженная мембраной, принадлежат виду *I. linei*, что подтверждает паразитическую природу плазмодия ортонектид.

Белки, соответствующие генам ортонектид, экспрессирующимся только на стадии плазмодия и выявленным с помощью *in silico* анализа, участвуют в процессах роста плазмодия в организме хозяина и процессах взаимодействия между хозяином и паразитом, а также в эндо/экзоцитозе [27]. Наличие генов, ассоциированных с эндопаразитизмом у других организмов, в геноме ортонектид, а также экспрессия этих генов ортонектид в зараженном хозяине подтверждает то, что плазмодий ортонектид имеет паразитическую природу. Хозяин не мог бы экспрессировать гены ортонектид, а эмбрионы и генеративные клетки не нуждаются в экспрессии набора генов с такими функциями. Кроме того, наличие в плазмодии процессов, подтвержденное при помощи анализа РНК секвенирования, подтверждается и при морфологическом анализе плазмодия.

Имеющиеся данные убедительны и позволяют предположить, что плазмодий — это тканевой паразит, в котором происходит развитие половых особей ортонектид. Мы предлагаем возможную схему развития плазмодия. Предложенный механизм не противоречит фундаментальным биологическим принципам и позволяет объяснить наличие ядер в цитоплазме плазмодия и наличие дополнительной мембраны у генеративных клеток и эмбрионов (Рис. 17).

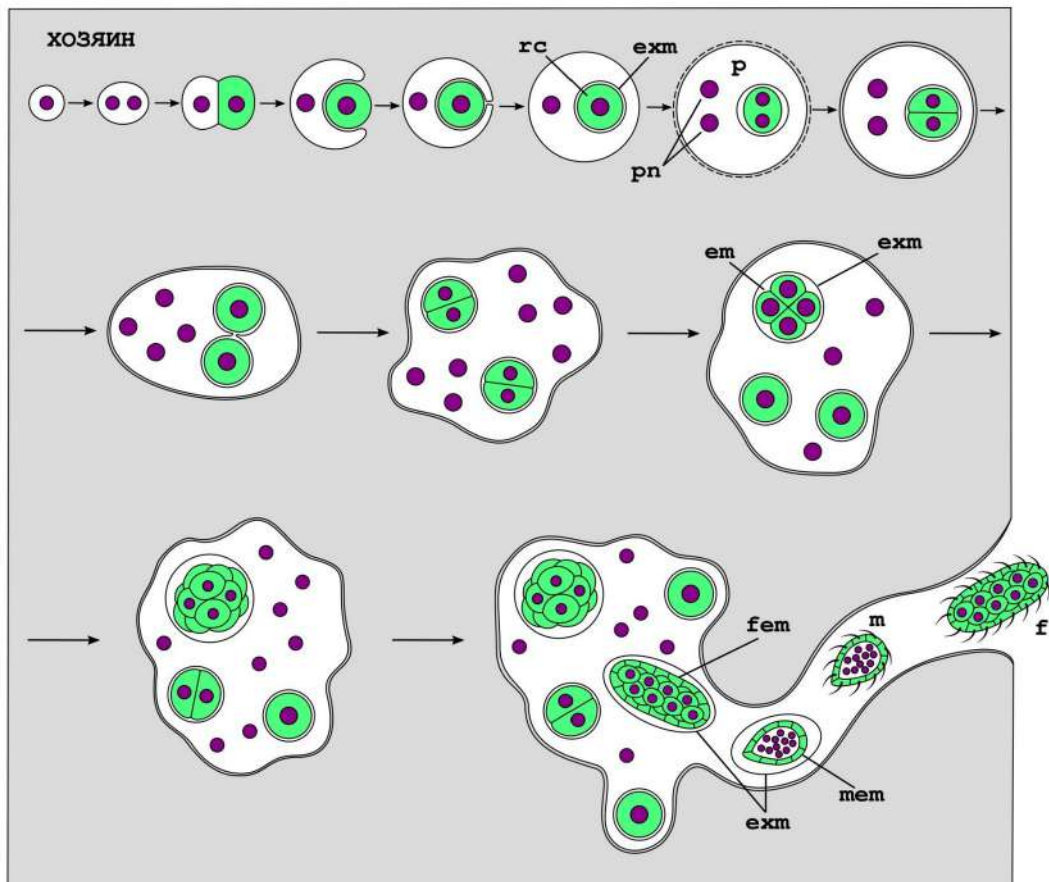


Рисунок 17. Возможный механизм образования и развития плазмодия. em - эмбрион ортонектиды; exm - дополнительная мембрана, отделяющая половое поколение ортонектид от цитоплазмы плазмодия; f - зрелая самка ортонектиды; fem - эмбрион самки ортонектиды; m - зрелый самец ортонектиды; mem - эмбрион самца ортонектиды; p - плазмодий; rc - репродуктивная клетка. Пунктиром показано первое задокументированное появление дополнительной мембраны плазмодия. Из [26], с изменениями.

При заражении хозяина недифференцированные клетки личинки расселяются по тканям хозяина, не проникая в его клетки. Затем каждая паразитическая клетка делится, при этом одна из дочерних клеток обрывает другую, образуя комплекс "клетка-в-клетке". Такой комплекс известен для Cnidaria и часто встречается у Mухozoa, паразитических книдарий [105–107]. Внешняя клетка претерпевает множественные деления ядра без последующего цитокинеза, и ее цитоплазма становится цитоплазмой плазмодия. Одновременно с этим внутренняя клетка, которая теперь окружена дополнительной мембраной из-за того, что была поглощена внешней клеткой, также делится. В результате этого деления образуются репродуктивные клетки и эмбрионы, каждый из которых отделен от цитоплазмы плазмодия дополнительной мембраной.

Так образуется плазмодий ортонектид - многоядерный организм, который развивается между клеток хозяина и содержит репродуктивные клетки и половых особей ортонектид на разных стадиях развития (Рис. 16, 17).

Морфологический анализ позволяет предположить два потенциальных механизма расселения паразитического плазмодия по тканям хозяина. Согласно первому сценарию, плазмодий формирует удлинённые, пальцевидные отростки, которые впоследствии отделяются, давая начало дочерним плазмодиям (Рис. 18, А). По второму сценарию, отдельные репродуктивные клетки выселяются из плазмодия и впоследствии становятся дочерними плазмодиями (Рис. 18, В). Последний механизм был ранее описан для вида *Rhopalura orhiocomaе*. Выход репродуктивных клеток из плазмодия в ткани хозяина наблюдался Коллери и Лаваль [42], а затем Халоти [108].

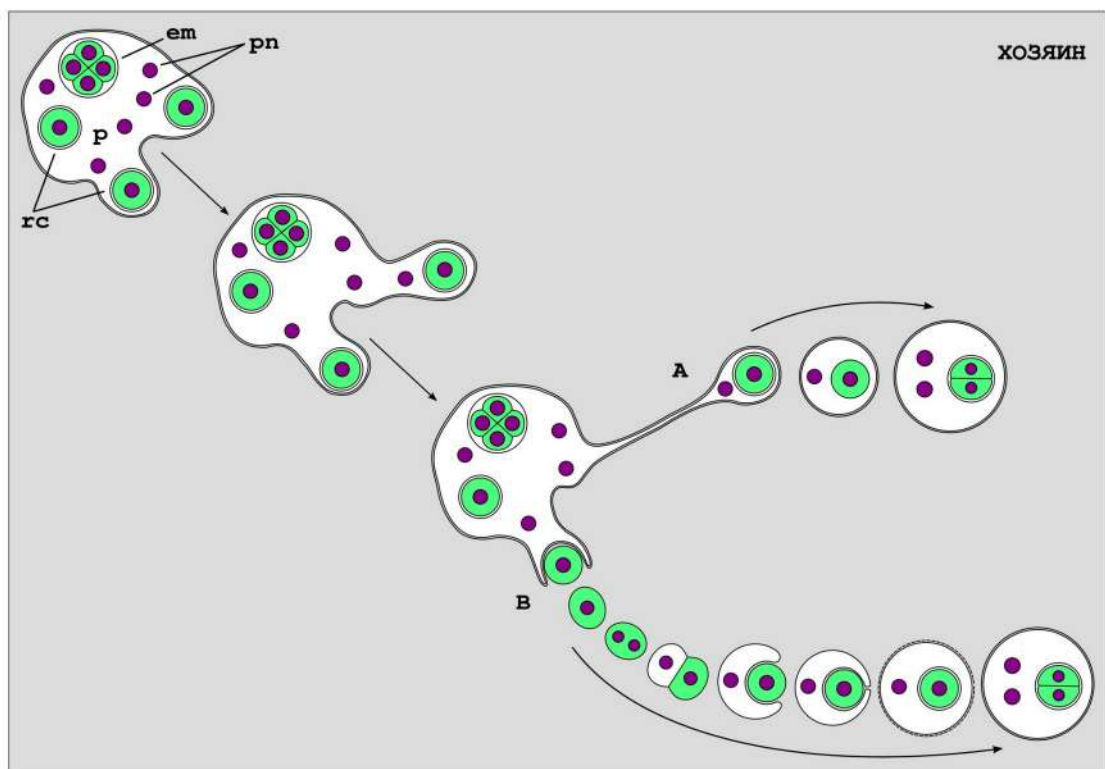


Рисунок 18. Возможные механизмы расселения плазмодия по тканям хозяина. (А) Отделение отростка от плазмодия. (В) Выселение репродуктивной клетки из плазмодия. em - эмбрион ортонектиды; р - плазмодий; рп - ядро плазмодия; гс - репродуктивная клетка. Пунктиром показано первое задокументированное появление дополнительной мембраны плазмодия. Из [26], с изменениями.

6. Заключение

Плазмодий *I. linei* представляет собой многоядерный организм без определенной формы, окруженный двойной мембраной, которая изолирует его от тканей хозяина. Помимо многочисленных ядер, цитоплазма плазмодия содержит органеллы, характерные для других Bilateria, а также репродуктивные клетки и созревающих половых особей ортонектид. Репродуктивные клетки, как и развивающиеся самцы и самки ортонектид, окружены дополнительной мембраной. В цитоплазме плазмодия активно протекают процессы эндо- и экзоцитоза. Плазмодий поглощает вещества хозяина путем пиноцитоза, фагоцитоза и рецептор-опосредованного эндоцитоза, а также непосредственно через плазматическую мембрану, которая образует многочисленные микровилли для увеличения площади контакта. Взаимодействие между хозяином и плазмодием обеспечивается в том числе при помощи внеклеточных везикул. Отростки плазмодия, направленные к поверхности тела хозяина, используются зрелыми половыми особями для выхода из хозяина.

Специфические особенности плазмодия не позволяют сравнить его с другими Bilateria. Однако такие детали, как поверхность из двух мембран, образующая микровилли, хорошо развитая тубулярная сеть и наличие клеток в цитоплазме плазмодия, наблюдаются в плазмодиях некоторых видов Мухозоа. Это позволяет предположить конвергенцию в организации этих паразитов.

Впервые сделанный анализ РНК секвенирования плазмодия выявил набор специфичных для стадии плазмодия белок-кодирующих генов и соответствующих гипотетических белков, которые отличают паразитическую стадию плазмодия от половой стадии *I. linei*. Из 119 плазмодий-специфичных белков для 82 на основе известных доменов предложены предполагаемые функции. 35 из обнаруженных белков являются орфанными, по крайней мере часть из которых может отражать уникальные эволюционные адаптации ортонектид к паразитизму.

Некоторые найденные белки являются эффекторными молекулами, характерными для других эндопаразитов, что указывает на конвергенцию в их эволюции. Белки, специфичные для плазмодия, могут играть роль в защите от хозяина, коммуникации между хозяином и паразитом, питании и поглощении питательных веществ, росте внутри хозяина и поддержке развития половой стадии. Активные процессы эндо- и экзоцитоза и взаимодействие с хозяином через внеклеточные везикулы подтверждено и морфологическими данными. Молекулярные

механизмы, связанные с этими процессами у ортонекид, ранее не были описаны, а специфические белки-эффекторы до сих пор оставались неизвестными.

Предыдущие данные о наличии многочисленных ядер плазмодия в его цитоплазме были подтверждены и в этой работе. Цитоплазма, окружающая эти ядра, принадлежит самому паразиту, при этом за пределами поверхности плазмодия находится внеклеточный матрикс хозяина. Паразит-ассоциированные гены ортонекид экспрессируются в плазмодии для поддержания его функционирования в организме хозяина. Гипотеза, предложенная Козловым и предполагающая хозяйское происхождение цитоплазмы плазмодия, не подтверждена. Плазмодий — это тканевой паразит, представляющий одну из стадий жизненного цикла ортонекид.

Возможный механизм образования плазмодия включает расселение паразитических клеток личинки ортонекид по тканям хозяина с последующим формированием комплекса "клетка-в-клетке". Цитоплазма плазмодия происходит из наружной клетки, которая подвергается множественным ядерным делениям без цитокинеза, в то время как внутренняя клетка делится, давая начало репродуктивным клеткам и эмбрионам. Потенциальный механизм расселения плазмодия по тканям хозяина включает в себя либо выселение репродуктивной клетки, либо отделение отростка плазмодия.

7. Выводы

1. Анализ полученных данных позволяет утверждать, что плазмодий ортонектид не является модифицированной клеткой хозяина, как предполагал Козлов [22,23], а имеет паразитическое происхождение. Он развивается как отдельная стадия жизненного цикла ортонектид во внеклеточном матриксе хозяина.

2. Выявлены гены ортонектид, экспрессирующиеся только на стадии плазмодия и ассоциированные с паразит-хозяинными взаимоотношениями. Гомологи этих генов известны для других эндопаразитов. Один из механизмов взаимодействия плазмодия и хозяина реализуется за счет внеклеточных везикул.

3. Плазмодий поглощает вещества хозяина путем пиноцитоза, фагоцитоза и рецептор-опосредованного эндоцитоза. Найдены белковые эффекторы, участвующие в этих процессах.

4. Для объяснения процессов формирования, развития и распространения плазмодия ортонектид по тканям хозяина были предложены схемы, включающие образование комплекса “клетка-в-клетке”.

8. Благодарности

Я искренне признательна своему научному руководителю Юрию Сергеевичу Слюсареву, под руководством которого начался мой путь в зоологии. Я особенно благодарна за создание доброжелательной атмосферы, способствующей моему научному развитию, за постоянную и безусловную поддержку, вдохновение для освоения биоинформатических методов и возможность поработать на разных морях.

Благодарю Виктора Вячеславовича Старунова, который принимал участие во всех этапах работы, терпеливо обучал меня, помогал с любыми вопросами и на протяжении последних лет руководил сбором материала на Баренцевом море.

Я бы хотела поблагодарить остальных коллег по научной группе за их вклад в данное исследование - Александра Раппопорта, Наталью Зорину и Наталью Ивановну Бондаренко. Хотелось бы выразить отдельную благодарность Александру Раппопорту за предоставление протокола сборки серийных срезов.

В работе тем или иным образом приняли участие многие выпускники, сотрудники и студенты кафедры Зоологии Беспозвоночных СПбГУ: Андрей Игоревич Гранович, Андрей Экскустадианович Вишняков, Сергей Викторович Багров, Алексей Миролюбов, Анастасия Лянгузова, Анна Квач, Антон Ковалев, Валерия Хабибулина, Владимир Крапивин, Георгий Кремнев, Дарья Крупенко, Екатерина Фролова, Елизавета Гафарова, Зинаида Старунова, Мария Домрачева, Станислав Илюткин и другие. Я благодарна за помощь со сбором материала в экспедициях, содействие при работе в лаборатории, ценные рекомендации, участие и дружескую поддержку.

Я благодарю Елену Валентиновну Сабанееву за помощь в редакции статей и Александру Бурнусузу за помощь в подготовке схем.

Работа была выполнена с использованием технической базы ресурсных центров СПбГУ “Развитие молекулярных и клеточных технологий”, “Микроскопии и микроанализа”, “Хромас”, “Биобанк” и ЦКП “Биоинформатика” ИЦиГ СО РАН. Благодарю сотрудников за содействие данному исследованию. В особенности я признательна Александре Николаевне Ивановой,

Максиму Германовичу Воробьеву, Ярославу Геннадьевичу Борисову, Дмитрию Александровичу Рассказову, Константину Александровичу Бенкену и Антону Владимировичу Радаеву.

Благодарю Михаила Владимировича Макарова, а также сотрудников сезонной биостанции в п. “Дальние Зеленцы” ММБИ РАН за предоставление возможностей для сбора материала и работы в лаборатории.

Наконец, я бы хотела выразить сердечную благодарность Екатерине Викторовне Райковой, Андрею Александровичу Добровольскому и своему дедушке, Алексею Андреевичу Веренинову. - именно благодаря Вашему участию в моей жизни я смогла найти свое место в науке.

Работа была поддержана грантами РФФИ № 16-04-00782 и № 19-04-00218, РНФ № 19-74-10013 и № 23-24-00193.

9. Список литературы

1. Price P.W. Evolutionary biology of parasites. Princeton University Press, 1980. P. 237.
2. Windsor D.A. Most of the species on Earth are parasites // International Journal for Parasitology. Pergamon, 1998. Vol. 28, № 12. P. 1939–1941.
3. Poulin R. The many roads to parasitism. A tale of convergence // Advances in Parasitology. 2011.
4. Beneden V. Recherches sur les Dicyemides, survivants actuels d'un embranchement des Mesozories. // Bulletins de l'Académie Royal de Belgique. 1876. Vol. 42. P. 3–111.
5. Giard A. Sur les Orthonectida, classe nouvelle d'animaux parasites des Echinodermes et des Turbellariés // Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences. 1877. Vol. 85, № 5. P. 812–814.
6. Giard M.A. On the organization and classification of the Orthonectida // Annals and Magazine of Natural History. 1879. Vol. 4, № 24. P. 471–473.
7. Hanelt B. et al. The phylogenetic position of *Rhopalura ophiocomae* (Orthonectida) based on 18S ribosomal DNA sequence analysis. // Molecular biology and evolution. 1996. Vol. 13, № 9. P. 1187–1191.
8. Mikhailov K.V. et al. The Genome of *Intoshia linei* Affirms Orthonectids as Highly Simplified Spiralian // Current Biology. Cell Press, 2016. Vol. 26, № 13. P. 1768–1774.
9. Lu T.-M. et al. The phylogenetic position of dicyemid mesozoans offers insights into spiralian evolution // Zoological Letters. 2017. Vol. 3, № 1. P. 6.
10. Schiffer P.H., Robertson H.E., Telford M.J. Orthonectids Are Highly Degenerate Annelid Worms // Current Biology. Elsevier Ltd., 2018. Vol. 28, № 12. P. 1970–1974.
11. Bondarenko N. et al. Comparative analysis of the mitochondrial genomes of Orthonectida: insights into the evolution of an invertebrate parasite species // Molecular Genetics and Genomics. Springer Berlin Heidelberg, 2019. Vol. 294, № 3. P. 715–727.
12. Zverkov O.A. et al. Dicyemida and Orthonectida: Two stories of body plan simplification // Frontiers in Genetics. Frontiers Media S.A., 2019. Vol. 10. P. 443.
13. Drábková M. et al. Different phylogenomic methods support monophyly of enigmatic “Mesozoa” (Dicyemida + Orthonectida, Lophotrochozoa) // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. Royal Society Publishing, 2022. Vol. 289, № 1978.
14. Kozloff E.N. Morphology of the Orthonectid *Rhopalura ophiocomae* // The Journal of Parasitology. Allen Press/The American Society of Parasitologists, 1969. Vol. 55, № 1. P. 171.

15. Kozloff E.N. Morphology of the orthonectid *Ciliocincta sabellariae* // The Journal of Parasitology. JSTOR, 1971. P. 585–597.
16. Slyusarev G.S. Fine structure and development of the cuticle of *Intoshia variabili* (Orthonectida) // Acta Zoologica. 2000. Vol. 81, № 1. P. 1–8.
17. Slyusarev G.S. The fine structure of the muscle system in the female of the orthonectid *Intoshia variabili* (Orthonectida) // Acta Zoologica. 2003. Vol. 84, № 2. P. 107–111.
18. Slyusarev G.S., Starunov V.V. The structure of the muscular and nervous systems of the female *Intoshia linei* (Orthonectida) // Organisms Diversity and Evolution. 2016. Vol. 16, № 1. P. 65–71.
19. Slyusarev G.S., Nesterenko M.A., Starunov V.V. The structure of the muscular and nervous systems of the male *Intoshia linei* (Orthonectida) // Acta Zoologica. Blackwell Publishing Ltd, 2019. Vol. 100, № 4. P. 451–458.
20. Slyusarev G.S. et al. The structure of the muscular and nervous systems of the orthonectid *Rhopalura litoralis* (Orthonectida) or what parasitism can do to an annelid // Organisms Diversity and Evolution. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2022. Vol. 22, № 1. P. 35–45.
21. Slyusarev G.S., Skalon E.K., Starunov V.V. Evolution of Orthonectida body plan // Evolution & Development. 2023. e12462.
22. Kozloff E.N. The Structure and Origin of the Plasmodium of *Rhopalura ophiocomae* (Phylum Orthonectida) // Acta Zoologica. 1994. Vol. 75, № 3. P. 191–199.
23. Kozloff E.N. Studies on the so-called plasmodium of *Ciliocincta sabellariae* (Phylum Orthonectida), with notes on an associated microsporan parasite // Cahiers de Biologie Marine. 1997. Vol. 38, № 3. P. 151–159.
24. Slyusarev G.S., Miller D.M. Fine structure of the mature plasmodium of *Intoshia variabili* (Phylum Orthonectida), a parasite of the platyhelminth *Macrorhynchus crocea* // Acta Zoologica. 1998. Vol. 79, № 4. P. 319–327.
25. Slyusarev G.S., Cherkasov A.S. Structure and supposed feeding mechanisms of the plasmodium of *Intoshia linei* (Orthonectida) // Invertebrate Zoology. 2008. Vol. 5, № 1. P. 47–51.
26. Skalon E.K. et al. Plasmodium structure of *Intoshia linei* (Orthonectida) // Journal of Morphology. 2023. Vol. 284, № 7. e21602.
27. Skalon E.K., Starunov V.V., Slyusarev G.S. RNA-seq analysis of parasitism by *Intoshia linei* (Orthonectida) reveals protein effectors of defence, communication, feeding and growth // Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution. 2024. P. 1–8.
28. Muller O.F. Vermium terrestrium et fluviatilum, ect. 2. Copenhagen, 1774.

29. Keferstein W. Beitrage zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte einiger Seeplanarien von St-Malo // Abhandl. Konigl. Gesellsch. Wissensch. Gotttingen. 1869. Vol. 14. P. 3–38.
30. McIntosh W.C. On the Annelida of the Gulf of St. Lawrence, Canada. // Annals and Magazine of Natural History. 1874. Vol. 13, № 76 part 34. P. 261–270.
31. Giard M.A.A. On the Orthonectida, a new class of animals parasitic on Echinodermata and Turbellaria // Annals and Magazine of Natural History. Taylor & Francis, 1878. Vol. 1, № 2. P. 181–183.
32. Caullery M., Mesnil F. Sur trois Orthonectides nouveaux, parasites des Annelides, et l’hermaphrodisme de l’une d’eux (*Stoecharthrum Giardi* ng, n. sp.) // Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. 1899. Vol. 128. P. 457–460.
33. Stunkard H.W. The life-history and systematic relations of the Mesozoa. // The Quarterly review of biology. Williams and Wilkins, 1954. Vol. 29, № 3. P. 230–244.
34. Kozloff E.N. The genera of the phylum Orthonectida // Cah. Biol. Mar. 1992. Vol. 33. P. 377–406.
35. Pawlowski J. et al. Origin of the mesozoa inferred from 18S rRNA gene sequences // Molecular Biology and Evolution. 1996. Vol. 13, № 8. P. 1128–1132.
36. Metschnikoff E. Untersuchungen über Orthonectiden // Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie. 1881. Vol. 35. P. 282–303.
37. Slyusarev G.S., Kristensen R. Fine structure of the ciliated cells and ciliary rootlets of *Intoshia variabili* (Orthonectida) // Zoomorphology. 2003. Vol. 122, № 1. P. 33–39.
38. Caullery M., Mesnil Félix. Recherches sur les orthonectides. // Arch. Anat. Microsc. 1901. Vol. 4. P. 381–470.
39. Caullery M., Lavallée A. La Fécondation et le développement des oeufs chez un orthonectide (*Rhopalura ophiocomae*). Gauthier-Villars, 1908.
40. Atkins D. *Rhopalura granosa*, sp. nov., an orthonectid parasite of a lamellibranch, *Heteranomia squamula* L., with a note on its swimming behaviour. // Journal of the Marine Biology Association of the UK. East Carolina University, 1933. Vol. 19, № 1880. P. 233–252.
41. Nakano H., Miyazawa H. A New Species of Orthonectida That Parasitizes *Xenoturbella bocki* : Implications for Studies on *Xenoturbella* // The Biological Bulletin. 2018. Vol. 236, № 1. P. 66–73.
42. Caullery M., Lavallee A. Recherches experimentales sur les phases initiales de l’infection d’une ophiure (*Amphiura squamata*) par un Orthonectide (*Rhopalura ophiocomae*). // C.R. Acad. Sci. Paris 146. 1912. Vol. T. 46. P. 139-171.

43. Schmidt-Rhaesa A. (Ed.) Handbook of Zoology: Miscellaneous Invertebrates. NHBS Academic & Professional Books, 2018.
44. Slyusarev G.S. et al. Extreme Genome and Nervous System Streamlining in the Invertebrate Parasite *Intoshia variabilis* // Current Biology. Cell Press, 2020. Vol. 30, № 7. P. 1292-1298.
45. Caullery M. Classe des Orthonectides (Orthonectida Giard 1877) // Traité de Zoologie. Paris Masson & Cie, 1961. Vol. IV, № 1. P. 695–706.
46. Slyusarev G.S. Fine Structure of the Female *Intoshia variabilis* (Alexandrov & Sljusarev) (Mesozoa: Orthonectida) // Acta Zoologica. 1994. Vol. 75, № 4. P. 311–321.
47. Слюсарев Г.С., Манылов О.Г., Черкасов А.С. Выявление ядер плазмодия *Intoshia linei* (Orthonectida) методом ДАПИ окрашивания // Паразитология. МАИК" Наука/Интерпериодика", 2002. Vol. 36, № 3. P. 192.
48. O'Keefe K.R., Jones C.D. Challenges and solutions for analysing dual RNA-seq data for non-model host–pathogen systems // Methods in Ecology and Evolution. 2019.
49. Espindula E. et al. The combined analysis as the best strategy for dual RNA-seq mapping // Genetics and Molecular Biology. Brazilian Journal of Genetics, 2019. Vol. 42, № 4.
50. Anders S., Huber W. Differential expression analysis for sequence count data // Genome Biology. BioMed Central, 2010. Vol. 11, № 10. P. R106.
51. Liu Y., Zhou J., White K.P. RNA-seq differential expression studies: More sequence or more replication? // Bioinformatics. Oxford University Press, 2014. Vol. 30, № 3. P. 301–304.
52. Rapaport F. et al. Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data // Genome Biology. 2013. Vol. 14, № 9. P. 3158.
53. Goldberg D.E., Zimmerberg J. Hardly Vacuous: The Parasitophorous Vacuolar Membrane of Malaria Parasites // Trends in Parasitology. Elsevier, 2020. Vol. 36, № 2. P. 138–146.
54. Cali A., Takvorian P.M. Developmental Morphology and Life Cycles of the Microsporidia // Microsporidia. John Wiley & Sons, Ltd, 2014. P. 71–133.
55. El-Mansy A., Bashtar A.R. Histopathological and ultrastructural studies of *Henneguya suprabranchiae* Landsberg, 1987 (Myxosporea: Myxobolidae) parasitizing the suprabranchial organ of the freshwater catfish *Clarias gariepinus* Burchell, 1822 in Egypt // Parasitology Research. Parasitol Res, 2002. Vol. 88, № 7. P. 617–626.
56. Azevedo C. et al. Ultrastructure of *Myxobolus brycon* n. sp. (phylum Myxozoa), parasite of the piraputanga fish *Brycon hilarii* (Teleostei) from Pantanal (Brazil) // Journal of Eukaryotic Microbiology. Blackwell Publishing Inc., 2011. Vol. 58, № 2. P. 88–93.

57. Abdel-Baki A.A.S. Light and electron microscopic studies on *Myxobolus egyptica* sp. nov. (Myxozoa, Myxosporea), infecting the hornlip mullet *Oedalechilus labiosus* from the Red Sea // *Acta Parasitologica*. De Gruyter, 2011. Vol. 56, № 3. P. 255–262.
58. Current W.L., Janovy J. Comparative study of ultrastructure of interlamellar and intralamellar types of *Henneguya exilis* Kudo from channel catfish // *J Protozool*. 1978. Vol. 25, № 1. P. 56–65.
59. Current W.L., Janovy J. Ultrastructure of interlamellar *Henneguya exilis* in the channel catfish // *J Parasitol*. 1976. Vol. 62, № 6. P. 975–981.
60. Adriano E.A. et al. Light, electron microscopy and histopathology of *Myxobolus salminus* n. sp., a parasite of *Salminus brasiliensis* from the Brazilian Pantanal // *Veterinary Parasitology*. 2009. Vol. 165, № 1. P. 25–29.
61. Naldoni J. et al. Host-parasite and phylogenetic relationships of *Myxobolus filamentum* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea), a parasite of *Brycon orthotaenia* (Characiformes: Bryconidae) in Brazil // *Folia Parasitol (Praha)*. 2015. Vol. 62. P. 2015.014.
62. Abdel-Ghaffar F. et al. Light and electron microscopic study on *Henneguya suprabranchiae* Landsberg, 1987 (Myxozoa: Myxosporea) infecting *Oreochromis niloticus*, a new host record // *Parasitol Res*. 2008. Vol. 103, № 3. P. 609–617.
63. *Myxozoan Evolution, Ecology and Development* / ed. Okamura B., Gruhl A., Bartholomew J.L. Cham: Springer International Publishing, 2015.
64. Naldoni J. et al. *Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epithelial area of gills in the farmed pintado, a South American catfish: Histopathology and ultrastructure // *Veterinary Parasitology*. *Vet Parasitol*, 2009. Vol. 166, № 1–2. P. 52–59.
65. Moreira G.S.A. et al. The morphological and molecular characterization of *Henneguya rotunda* n. sp., a parasite of the gill arch and fins of *Salminus brasiliensis* from the Mogi Guaçu River, Brazil // *Parasitology Research*. Springer Verlag, 2014. Vol. 113, № 5. P. 1703–1711.
66. Fertig E.T., Gherghiceanu M., Popescu L.M. Extracellular vesicles release by cardiac telocytes: electron microscopy and electron tomography // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2014. Vol. 18, № 10. P. 1938–1943.
67. Marcilla A. et al. Extracellular vesicles in parasitic diseases // *Journal of Extracellular Vesicles*. Co-Action Publishing, 2014. Vol. 3, № 1.
68. Montaner S. et al. The role of extracellular vesicles in modulating the host immune response during parasitic infections // *Frontiers in Immunology*. *Front Immunol*, 2014. Vol. 5.

69. Orús-Alcalde A., Børve A., Hejnal A. The localization of Toll and Imd pathway and complement system components and their response to *Vibrio* infection in the nemertean *Lineus ruber* // BMC Biology. BioMed Central Ltd, 2023. Vol. 21, № 1. P. 1–17.
70. E. S. Locker. On being a parasite in an invertebrate host: a short survival course - PubMed // J Parasitol. 1994. Vol. 80, № 5. P. 728–747.
71. Haloti S., Vernet G. Etude du parasite et du parasitisme: l'Orthonectide *Intoshia linei* endoparasite de l'Hétéronémerte *Lineus ruber*. 1993.
72. Lafferty K.D., Shaw J.C. Comparing mechanisms of host manipulation across host and parasite taxa // J Exp Biol. 2013. Vol. 216, № 1. P. 56–66.
73. Miroljubov A. et al. Specialized structures on the border between rhizocephalan parasites and their host's nervous system reveal potential sites for host-parasite interactions // Sci Rep. 2020. Vol. 10, № 1. P. 1128.
74. Lianguzova A.D. et al. Specialised rootlets of *Sacculina pilosella* (Rhizocephala: Sacculinidae) used for interactions with its host's nervous system // Arthropod Struct Dev. 2021. Vol. 60. P. 101009.
75. Lianguzova A. et al. Tricks of the puppet masters: morphological adaptations to the interaction with nervous system underlying host manipulation by rhizocephalan barnacle *Polyascus polygeneus* // PeerJ. 2023. Vol. 11. P. e16348.
76. Sampaio N.G., Cheng L., Eriksson E.M. The role of extracellular vesicles in malaria biology and pathogenesis // Malaria Journal. 2017. Vol. 16, № 1. P. 245.
77. Schorey J.S. et al. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions // EMBO Rep. 2015. Vol. 16, № 1. P. 24–43.
78. Laing R. et al. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery // Genome Biology. BioMed Central, 2013. Vol. 14, № 8. P. R88.
79. Zarowiecki M., Berriman M. What helminth genomes have taught us about parasite evolution // Parasitology. Cambridge University Press, 2015. Vol. 142, № Suppl 1. P. S85–S97.
80. Schwarz E.M. et al. The genome and transcriptome of the zoonotic hookworm *Ancylostoma ceylanicum* identify infection-specific gene families // Nature Genetics. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 47, № 4. P. 416–422.
81. Viney M. The genomic basis of nematode parasitism // Briefings in Functional Genomics. Oxford University Press, 2018. Vol. 17, № 1. P. 8–14.

82. Maizels R.M., Smits H.H., McSorley H.J. Modulation of Host Immunity by Helminths: The Expanding Repertoire of Parasite Effector Molecules // *Immunity*. Cell Press, 2018. Vol. 49, № 5. P. 801–818.
83. Schulenburg H. et al. Specificity of the innate immune system and diversity of C-type lectin domain (CTLN) proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans* // *Immunobiology*. Urban & Fischer, 2008. Vol. 213, № 3–4. P. 237–250.
84. Pees B. et al. High Innate Immune Specificity through Diversified C-Type Lectin-Like Domain Proteins in Invertebrates // *Journal of Innate Immunity*. S. Karger AG, 2016. Vol. 8, № 2. P. 129–142.
85. Groat-Carmona A.M. et al. A *Plasmodium* α/β -hydrolase modulates the development of invasive stages // *Cellular Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd, 2015. Vol. 17, № 12. P. 1848–1867.
86. Lu M. et al. A Novel α/β Hydrolase Domain Protein Derived From *Haemonchus contortus* Acts at the Parasite-Host Interface // *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 2020. Vol. 11. P. 1388.
87. Marcilla A. et al. Extracellular Vesicles from Parasitic Helminths Contain Specific Excretory/Secretory Proteins and Are Internalized in Intestinal Host Cells // *PLoS ONE* / ed. Langsley G. Public Library of Science, 2012. Vol. 7, № 9. P. e45974.
88. Nawaz M. et al. Research progress on the composition and function of parasite-derived exosomes // *Acta Tropica*. Elsevier B.V., 2019. Vol. 196. P. 30–36.
89. Americus B. et al. The cnidarian parasite *Ceratomyxa shasta* utilizes inherited and recruited venom-like compounds during infection // *PeerJ*. PeerJ Inc., 2021. Vol. 9.
90. Marcilla A. et al. *Echinostoma caproni*: Identification of enolase in excretory/secretory products, molecular cloning, and functional expression // *Experimental Parasitology*. Academic Press, 2007. Vol. 117, № 1. P. 57–64.
91. Coakley G., Maizels R.M., Buck A.H. Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections // *Trends in Parasitology*. Elsevier Ltd, 2015. Vol. 31, № 10. P. 477–489.
92. Andreu Z., Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function // *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 2014. Vol. 5. P. 442.
93. Drurey C., Maizels R.M. Helminth extracellular vesicles: Interactions with the host immune system // *Molecular Immunology*. Elsevier Ltd, 2021. Vol. 137. P. 124–133.

94. Chaiyadet S. et al. Silencing of *Opisthorchis viverrini* Tetraspanin Gene Expression Results in Reduced Secretion of Extracellular Vesicles // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A., 2022. Vol. 12. P. 1.
95. Gurung S. et al. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling // *Cell Communication and Signaling*. BioMed Central Ltd, 2021. Vol. 19, № 1. P. 47.
96. Campos T.D.L. et al. Identification of G protein-coupled receptors in *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni* by comparative genomics // *Parasites and Vectors*. BioMed Central Ltd., 2014. Vol. 7, № 1. P. 1–11.
97. Yang Y. et al. The genome of the myxosporean *Thelohanellus kitauei* shows adaptation to nutrient acquisition within its fish host // *Genome Biology and Evolution*. Oxford University Press, 2014. Vol. 6, № 12. P. 3182–3198.
98. Kumari S., Mg S., Mayor S. Endocytosis unplugged: Multiple ways to enter the cell // *Cell Research*. Nature Publishing Group, 2010. Vol. 20, № 3. P. 256–275.
99. Khalturin K. et al. More than just orphans: are taxonomically-restricted genes important in evolution? // *Trends in Genetics*. Trends Genet, 2009. Vol. 25, № 9. P. 404–413.
100. Beyhan Z., Iager A.E., Cibelli J.B. Interspecies nuclear transfer: implications for embryonic stem cell biology // *Cell Stem Cell*. 2007. Vol. 1, № 5. P. 502–512.
101. Lom J., Dyková I. Microsporidian xenomas in fish seen in wider perspective // *Folia Parasitol (Praha)*. 2005. Vol. 52, № 1–2. P. 69–81.
102. Ciancio A., Scippa S., Cammarano M. Ultrastructure of trophozoites of the gregarine *Lankesteria ascidiae* (Apicomplexa: Eugregarinida) parasitic in the ascidian *Ciona intestinalis* (Protochordata) // *European Journal of Protistology*. 2001. Vol. 37, № 3. P. 327–336.
103. Dyková I., Tylml T., Kostka M. Xenoma-like formations induced by *Soricimyxum fegati* (Myxosporea) in three species of shrews (Soricomorpha: Soricidae), including records of new hosts // *Folia Parasitol (Praha)*. 2011. Vol. 58, № 4. P. 249–256.
104. Williams B.A.P. Unique physiology of host–parasite interactions in microsporidia infections // *Cellular Microbiology*. 2009.
105. Morris D.J. Cell formation by myxozoan species is not explained by dogma // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society, 2010. Vol. 277, № 1693. P. 2565–2570.
106. Morris D.J. A new model for myxosporean (Myxozoa) development explains the endogenous budding phenomenon, the nature of cell within cell life stages and evolution of parasitism from a cnidarian ancestor // *International Journal for Parasitology*. Int J Parasitol, 2012. Vol. 42, № 9. P. 829–840.

107. Benayahu Y., Weil D., Malik Z. Entry of algal symbionts into oocytes of the coral *Litophyton arboreum* // *Tissue and Cell*. Churchill Livingstone, 1992. Vol. 24, № 4. P. 473–482.
108. Haloti S., Vernet G. The sexual reproduction of *Intoshia linei* (Orthonectida) endoparasite of *Lineus ruber* (Heteronemertea) // *Invertebrate Reproduction and Development*. 1995. Vol. 27, № 1. P. 73–76.