

Санкт-Петербургский Государственный университет
Биологический факультет
Кафедра зоологии беспозвоночных

Скалон Елизавета Кирилловна

Строение плазмодия *Intoshia linei* (Orthonectida) и его
природа

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Научный руководитель
д.б.н.,
профессор кафедры зоологии беспозвоночных
биологического факультета СПбГУ
Г.С. Слюсарев

Санкт-Петербург
2019

Оглавление

Введение	3
Обзор литературы.....	4
История изучения группы Orthonectida.....	4
Филогенетическое положение группы Orthonectida.....	6
Вопрос о природе плазмодия ортонектид.....	7
Плазмодий в жизненных циклах других животных.....	9
Материалы и методы	15
Объект исследования.....	15
Сбор материала	15
Прижизненные фотографии половых особей ортонектид и зараженных немертин... 15	15
Изготовление гистологических срезов и изучение их методами световой микроскопии	15
Изготовление полутонких и ультратонких срезов.....	16
Окрашивание и изучение полутонких срезов методами оптической микроскопии	16
Контрастирование и изучение ультратонких срезов методами трансмиссионной электронной микроскопии	16
Иммуногистохимическое окрашивание замороженных срезов и изучение их на конфокальном микроскопе	17
Результаты.....	18
Обсуждение.....	34
Выводы	39
Дальнейшие направления исследований.....	40
Благодарности	40
Список литературы	41

Введение

Orthonectida Giard, 1877 - небольшая группа паразитических беспозвоночных. Ортонектиды паразитируют у немертин, турбеллярий, моллюсков и других морских Metazoa. Долгое время филогенетическое положение ортонектид оставалось неясным, но по последним молекулярным данным группа входит в состав Annelida и близка к Clitellata (Bondarenko, 2019). Группа насчитывает порядка 30 видов (WoRMS, 2019).

Жизненный цикл ортонектид включает свободноживущее поколение, представленное половыми особями и личинками, а также паразитическую стадию, исторически именуемую плазмодием. В плазмодии развиваются самки и самцы, которые выходят во внешнюю среду для полового размножения и продукции личинок, заражающих новых хозяев.

Половые особи ортонектид изучены достаточно подробно (Kozloff, 1969; Slyusarev, 1994, 2000, 2003, 2004). При кажущейся, на первый взгляд, примитивности, половые особи ортонектид обладают развитой мышечной и нервной системой (Slyusarev & Starunov, 2016).

В то же время, данных по плазмодию ортонектид крайне мало и они противоречивы. За практически двухсотлетнюю историю исследования ключевые вопросы о формировании плазмодия и о его природе так и не были решены. С точки зрения некоторых исследователей (Kozloff, 1994, 1997), плазмодий представляет собой разросшуюся под воздействием внедрившейся паразитической массы ткань самого хозяина. Другие (Caullery & Lavalee, 1912; Slyusarev & Miller, 1998) полагают, что в тканях хозяина личинка ортонектид преобразуется в самостоятельный организм.

Цель работы: решение вопроса о природе плазмодия ортонектид на примере вида *Intoshia linei*

Задачи работы:

1. исследовать строение плазмодия ортонектид морфологическими методами (световая микроскопия, трансмиссионная электронная микроскопия, конфокальная микроскопия);
2. проанализировать литературные данные по плазмодиям других организмов

Обзор литературы

История изучения группы *Orthonectida*

История изучения ортонектид (*Orthonectida*) началась более 150 лет назад, в 1877 году, когда французский зоолог Альфред Жиар описал загадочную находку из офиуры *Ophiocoma neglecta* (сейчас *Amphipholis squamata*) (Giard, 1877, 1878). Следует сказать, что обнаружены ортонектиды были за несколько лет до выхода исследований Жиара. Кеферштейн (Keferstein, 1869) нашел их в турбеллярии, а МакИнтош (McIntosh, 1874) в немертине. Эти авторы привели подробные рисунки ортонектид, но не привели их описание. Жиар писал, как, вскрыв центральный диск офиуры, он увидел в бурсальных сумках многочисленных животных, напоминавших больших покрытых ресничками инфузорий. Он присвоил этим паразитическим организмам ранг вида, который назвал *Rhopalura ophiocomae*. Жиар в той же статье дал названия еще двум найденным ранее, но не описанным видам ортонектид - *Intoshia linei* из немертин *Lineus gesserensis* (сейчас *Lineus ruber*) и *Intoshia leptoplanae* из турбеллярий *Leptoplana tremellaris*. Все найденные виды он объединил в группу под названием “*Orthonectida*” за способность животных при плавании вращаться вокруг своей оси. Жиар описывал ортонектид как многоклеточных планулообразных животных, покрытых ресничками и имеющих метамерное строение (Giard, 1879).

Значительный вклад в изучение ортонектид внес Илья Ильич Мечников (Metschnikoff, 1881). Он впервые описал, что эмбрионы и взрослые ортонектиды в теле хозяина содержатся в неких “протоплазматических трубках” (“*protoplasmatische Schläuche*”), которые Мечников также называл “плазмодиальными мешками” (“*die Plasmodiumsäcke*”). Мечников в этой работе сделал предположения относительно реализации жизненного цикла ортонектид. Он считал, что оплодотворение самок ортонектид происходит во внешней среде, а затем такая самка попадает внутрь офиуры *Amphiura squamata* (в случае вида *Rhopalura giardii*, описанного им же) и целиком преобразуется в “плазмодиальный мешок”. При этом эмбрионы, содержащиеся в оплодотворенной самке, напоминают Мечникову эмбрионы, которые он видит внутри “плазмодиального мешка”.

В конце 19 - начале 20 вв. ортонектид изучали французские ученые Коллери и Мениль (Caullery & Mesnil, 1899, 1901). Они продолжили высказывать предположения касательно жизненного цикла ортонектид и предложили схему, в которой половые особи выходят из хозяина во внешнюю среду для копуляции, оплодотворения самки и развития в ней оплодотворенных яиц. По их мнению, нового хозяина заражает некая неизвестная

расселительная форма, которая затем превращается в плазмодий (“un plasmode”) (Caullery & Mesnil, 1901). Именно многоядерная плазмодиальная стадия и является в их трактовке паразитической. Они отмечали полную автономию плазмодия, который может расти и размножаться, порождая ресничные половые формы. По Коллери и Мениль, в плазмодии вокруг ядра будущего зародыша обособляется цитоплазма, и образовавшаяся клетка делится, развиваясь сначала в морулу, а затем и в планулу. Постепенно такой эмбрион приобретает реснички, в нем формируются половые продукты.

В 1908 г. Коллери в соавторстве с Лавалле (Caullery & Lavallee, 1908) опубликовал детальное описание эмбрионального развития ортонектид от оплодотворения самки до образования подвижной ресничной личинки; таким образом, стало очевидным существование расселительной формы, которая заражает хозяина и превращается в плазмодий. Существование личинки, отраждаемой оплодотворенной самкой, в дальнейшем было подтверждено Аткинсом (Atkins, 1933) и Накано (Nakano et al., 2018), однако до сих пор не существует морфологического описания ее строения.

Схема жизненного цикла ортонектид была окончательно подтверждена в серии экспериментов упомянутых авторов (Caullery & Lavallee, 1912). Коллери и Лавалле помещали офиур *Amphipholis squamata* вместе с личинками ортонектид *Rhopalura ophiocomae*, а затем через различные промежутки времени наблюдали на срезах личинок в половых щелях офиур, а также молодых плазмодиев в стенках гонад.

Итак, в середине 20 века ортонектид четко определяли как “формы, у которых половое поколение формируется бесполом путем из генеративных клеток, продуцируемых паразитическим плазмодием” (“The Orthonectida are forms in which the sexual generation is formed asexually from germ cells produced in a parasitic plasmodium”) (Atkins, 1933), а генеральная схема жизненного цикла “паразитический плазмодий -> половые особи -> личинка -> паразитический плазмодий” уже не вызывала сомнений.

Большинство исследований конца 20го-начала 21го века были посвящены другим вопросам биологии ортонектид: разнообразию группы (Штейн, 1953; Kozloff, 1992), описанию морфологии половых особей (Kozloff, 1969; Slyusarev, 1994, 2000, 2003, 2004), а также уточнению филогенетических взаимоотношений между ортонектидами и другими беспозвоночными (Mikhailov et al., 2016; Schiffer et al., 2018; Bondarenko et al., 2019)

Стоит отметить вопрос о наличии мышечной и нервной системы у половых особей ортонектид. В ранних работах (Giard, 1878) самок и самцов называли “планулообразными”, подчеркивая исключительную простоту их строения. Отмечалось, что мезодерма зачаточная. Предполагалось, что взрослые самки и самцы передвигаются в толще воды лишь за счет ресничной локомоции. В последних работах Коллери (Caullery, 1961) по виду *Rhopalura ophicomae* упоминается, что ортонектиды вообще не имеют мышечной системы. Однако в более современных исследованиях американского исследователя Козлова (Kozloff, 1969, 1971) приводится описание сократимых клеток у этого вида. Позднее такие клетки были описаны Слюсаревым (Slyusarev, 1994), которым также наблюдалось, что самки ортонектид могут сокращать одну сторону тела. В начале 21 века полноценная мышечная система действительно была продемонстрирована с помощью окраски фаллоидином (Слюсарев, 2003). Нервная система ортонектид также была найдена и продемонстрирована методами иммуногистохимии (Slyusarev & Starunov, 2016).

Филогенетическое положение группы Orthonectida

Обсуждение филогенетического положения ортонектид продолжается и в настоящем времени. Традиционно группу рассматривали в ранге класса и сближали с группой Dicyemida, помещая обоих в тип Mesozoa (Giard, 1878, 1879). Mesozoa - название, предложенное ван Бенеденом в 1876 году для обозначения небольших чрезвычайно просто организованных многоклеточных организмов, находящихся на эволюционном древе между Protozoa и Metazoa (van Beneden, 1876). Таким образом, долгое время ортонектиды считались примитивными, похожими на двухслойную планулу и радиально-симметричными животными (Giard, 1879; Metschnikoff, 1881). Коллери и Мениль в своих работах также отмечали сходство ортонектид с дициемидами и даже проводили параллели между жизненными циклами этих животных, но при этом ставили под сомнение базальное положение группы (Caullery & Mesnil, 1901). Эти исследователи предполагали, что ортонектиды - это вторично упрощенные из-за паразитического образа жизни организмы, которых не следует относить к типу Mesozoa (Caullery & Mesnil, 1899). Существование типа Mesozoa как такового также неоднократно подвергалось сомнению (Stunkard, 1954; Pawlowski et al., 1996).

По мере появления новых данных относительно строения ортонектид исследователи все больше сомневались в их базальном положении. Подробное изучение морфологии свободноживущих особей позволило говорить о наличии мышечных клеток (Kozloff, 1969,

1971), а потом и полноценных мышечной и нервной системах (Слюсарев, 2003; Slyusarev & Starunov, 2016), и справедливость размещения группы Orthonectida внутри Metazoa сомнений уже не вызывала.

С появлением новых молекулярных данных ортонектид стали относить к Bilateria и помещать в группу Spiralia (Mikhailov et al., 2016). В последних работах, в которых были проведены подробные молекулярно-филогенетические анализы, ортонектид причислили к группе Annelida (Schiffer et al., 2018) и сблизили с Clitellata (Bondarenko et al., 2019).

Вопрос о природе плазмодия ортонектид

Впервые данные о паразитической стадии ортонектид появились в литературе в 1881 году. Мечников обратил внимание на то, что самки и самцы ортонектид в теле хозяина лежат в неких многоядерных мешках, называемых им “die Plasmodiumsäcke” (Metschnikoff, 1881). С этого момента паразитическую стадию ортонектид в научном сообществе стали именовать термином “плазмодий”. Однако до сих пор не существует единого мнения относительно того, что представляет собой так называемый “плазмодий” ортонектид.

Число работ, посвященных изучению паразитической стадии ортонектид, крайне невелико. Подробными исследованиями плазмодия ортонектид занимался Юджин Козлов (Kozloff, 1994;1997), а также Юрий Сергеевич Слюсарев (Slyusarev & Miller, 1998; Слюсарев, 2002). Вопросы о функционировании и природе плазмодия также касались Коллери и Лавалле (Caullery & Lavallee, 1912).

Серия экспериментальных заражений, проведенная Коллери и Лавалле в начале 20 века, позволила исследователям реконструировать возможную схему развития паразитической стадии после заражения хозяина личинкой ортонектид (Caullery & Lavallee, 1912). Авторы работали с ортонектидами вида *Rhopalura ophicomae* и с офиурами вида *Amphiura squamata* (сейчас *Amphipholis squamata*). Ими предполагалось, что личинка ортонектид заражает хозяина, внедряясь в организм через бурсальные щели. Несколько внутренних клеток личинки высвобождаются и активно проникают в эпителий бурсальной щели. Следующая стадия - это молодой плазмодий, в котором постепенно увеличивается число ядер. Ядра в плазмодии дифференцированы - некоторые ядра называются вегетативными и служат для обеспечения жизнедеятельности паразитического организма; другие же являются генеративными. Вокруг генеративных ядер обособляется цитоплазма. Так в плазмодии образуются генеративные клетки, впоследствии дающие эмбрионы ортонектид. Плазмодий,

по мнению авторов, выполняет трофическую функцию, выступая посредником между организмом хозяина и развивающимися половыми особями.

В конце 20ого века американским исследователем Козловым была предложена иная трактовка природы плазмодия ортонекид. В первой работе (Kozloff, 1994), посвященной плазмодию ортонекид того же вида, Козлов не подтвердил наличие ядер в плазмодии ортонекид, показанное ранее Коллери и Лавалль, а также другими авторами (Caullery & Lavallee, 1912; Caullery & Mesnil, 1901). По предположению Козлова, инфекционные клетки личинки проникают через эпителий бурсальных щелей или кишки офиуры и внедряются в мышечные клетки, лежащие между эпителием и целомической выстилкой. Зараженная клетка хозяина гипертрофируется; из содержащихся в ней генеративных клеток развиваются эмбрионы ортонекид. Таким образом, Козлов настаивал на том, что плазмодий - не производное ортонекид, а модифицированная клетка хозяина.

Вторая работа Козлова по плазмодию ортонекид (Kozloff, 1998) подтверждает и дополняет идеи первой работы. Исследование выполнено на ортонекидах вида *Ciliocincta sabellariae*, паразитирующих на полихетах *Sabellaria cementarium*. В данной работе Козлов упоминал о встреченных им в цитоплазме плазмодия изолированных ядрах ортонекид. Также он обращал внимание на то, что плазмодий, как и развивающиеся эмбрионы, окружены необычной мембраной, состоящей из двух сближенных унитарных мембран. Присутствие некоторого количества ядер в цитоплазме плазмодия объяснялось разрушением генеративных клеток или клеток эмбрионов и выселением ядер из таких дезорганизованных клеток в цитоплазму плазмодия. Замеченная Козловым дополнительная мембрана вокруг плазмодия (по терминологии Козлова, «матрикса») объяснялась плотным размещением соседних с гипертрофированной клеткой не зараженных клеток хозяина (Схема 1, стр. 9).

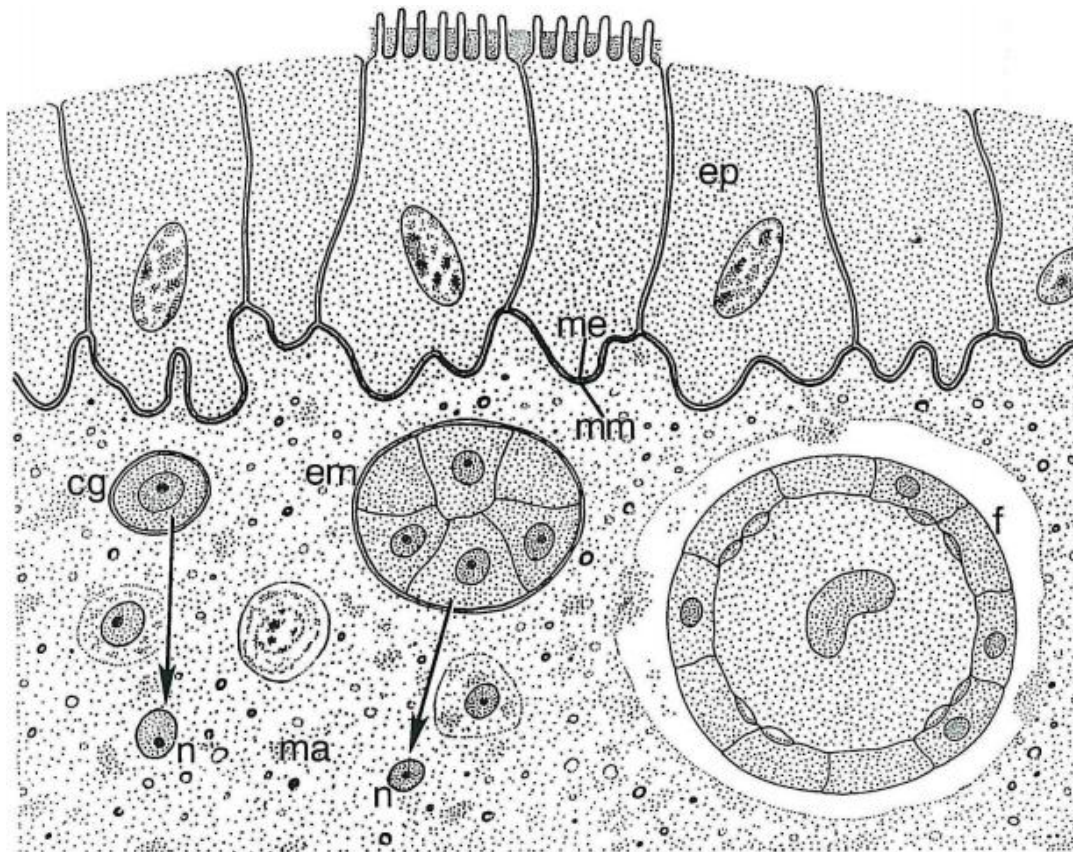


Схема 1. *Ciliocincta sabellariae* в эпидермисе *Sabellaria cementarium*. Схема иллюстрирует предположительные отношения между клетками эпидермиса (*ep*), матриксом (плазмодием), состоящим из дезорганизованной цитоплазмы эпителиальной клетки, и генеративной клеткой (*cg*), эмбрионом (*em*) и взрослой самкой ортонекид (*f*). Также предложены возможные пути, которыми ядра генеративных клеток или ядра клеток эмбрионов могут становиться изолированными ядрами плазмодия (*n*). *me* — унитарная мембрана клетки эпидермиса, *mm* — унитарная мембрана матрикса. По: Kozloff, 1997

Слюсарев и Миллер, работавшие с ортонекидами вида *Intoshia variabili*, паразитами турбеллярий *Macrorhynchus crocea*, не поддерживали трактовку природы плазмодия, изложенную в работах Козлова (Slyusarev & Miller, 1998). Ими было показано наличие свободных ядер плазмодия, отличных от ядер хозяина, как с помощью методов электронной микроскопии, так и с помощью флуоресцентной окраски DAPI (Слюсарев, 2002). По мнению авторов, плазмодий ортонекид имеет паразитарную природу.

Плазмодий в жизненных циклах других животных

Жизненная форма, имеющая название “плазмодий”, известна не только для ортонекид. Стадии плазмодия описаны у множества эукариотических организмов, относящихся к разным ветвям филогенетического дерева. Нами были проанализированы литературные данные по плазмодиям различных протистов и многоклеточных животных. Многоклеточные

грибы и растения, способные к формированию плазмодия, в данной работе рассматриваться не будут, поскольку их биология представляется наиболее отдаленной от биологии ортонектид.

Плазмодиальной стадией обладают представители группы *Plasmodiophora* Zopf, 1884 (сейчас *Phytomyxea*) (*Rhizaria*: *Cercozoa*: *Endomyxa*), известные как плазмодиофориды.

Плазмодиофориды - внутриклеточные паразиты водорослей, растений и грибов. Заражение осуществляется подвижными жгутиковыми стадиями - первичными зооспорами. Зооспора, инфицировавшая клетку хозяина, дает начало трофической стадии - многоядерному плазмодию. Плазмодий развивается внутри паразитофорной вакуоли, образованной плазматической мембраной клетки хозяина. К концу периода роста плазмодий заполняет практически всю клетку хозяина, паразитофорная вакуоль разрушается. Вокруг ядер плазмодия выстраиваются многочисленные везикулы, которые сливаются и разбивают протоплазму плазмодия на одноядерные участки. Так формируются зооспорангии. Зооспорангии претерпевают митотическое деление и формируют одноклеточные вторичные зооспоры, которые могут вновь заражать клетки хозяев с образованием вторичных плазмодиев. Вторичные плазмодии также растут внутриклеточно и могут фрагментироваться. Развитие вторичных плазмодиев завершается разрушением клетки хозяина, обособлением ядер и расчленением на одноядерные цисты. Цисты попадают во внешнюю среду (Алимов, 2000).

Некоторые представители группы *Leptomyxida* Pussard & Pons, 1976 (*Tubulinea*: *Amoebozoa*), обладающие так называемым "сетчатым морфотипом", существуют в виде свободноживущих способных к передвижению плазмодиев (например, вид *Leptomyxa reticulata*). Такие плазмодии размножаются фрагментацией (Алимов, 2000).

В жизненном цикле паразитов из группы *Piroplasmia* Levine, 1961 (*Apicomplexa*: *Alveolata*) многоядерная плазмодиальная стадия в жизненном цикле присутствует как временное явление. Пироплазмы реализуют диксенный жизненный цикл, в роли хозяев обычно выступают клещи и позвоночные. В развитии пироплазм многоядерные стадии чередуются с одноядерными. Одноядерные стадии претерпевают кариогамиию без плазмогамии, и так образуются многоядерные плазмодии. Плазмодии населяют клетки кишечного эпителия, присутствуют в гемолимфе, в гемocyтах и в клетках слюнных желез клеща-переносчика. Впоследствии цитоплазма вокруг каждого ядра обособляется, плазмодий распадается на одноядерные стадии, число которых равно числу ядер в плазмодии (Алимов, 2007).

Большой интерес представляет группа *Microsporidia Balbiani, 1882* (Opisthokonta: Fungi). Микроспоридии - это широко распространенные внутриклеточные паразиты. Хозяин заражается при контакте с одноклеточной спорой. При заражении из нее выбрасывается полярная трубка, по которой инвазионная стадия - спороплазма - попадает в хозяина. В хозяине спороплазма превращается в меронт - пролиферативную стадию. Меронт растет и делится, причем при делении могут появляться многоядерные формы. После периода роста многоядерный плазмодий претерпевает мерогонические деления с образованием одно- и двуядерных стадий. Следующей следует стадия споронта. Споронт отличается наличием второй наружной мембраны, которая секретируется мембраной меронта и по терминологии Оверстрита и Вайднера называется "экзоспоронтной мембраной" ("an exosporont membrane") (Overstreet & Weidner, 1974). В результате спорогонии в споронтах делятся ядра, образуются многоядерные спорогональные плазмодии, которые дают начало споробластам. Споробласты преобразуются в зрелые инвазионные споры.

Плазмодии на стадиях мерогонии и спорогонии могут претерпевать множественные деления путем плазмотомии, шизогонии, вакуолизации и т.д. (Алимов, 2007).

Трофическая стадия паразитических динофлагелляты из группы *Syndiniales Loeblich III, 1976* (*Alveolata: Dinoflagellata*) часто представлена многоядерным плазмодием. Такой плазмодий растет внутри клеток и полостей рыб, ракообразных, водорослей, кишечнополостных и некоторых протистов. Многоядерный трофонт способен полностью фрагментироваться с образованием двужгутиковых спор (Алимов, 2011).

У некоторых видов гетероконтных жгутиконосцев из группы *Apusomonadida Karpov & Mylnikov, 1989* (относятся к супергруппе *Obazoa* по Adl et al., 2018) в жизненном цикле также встречается стадия, в литературе именуемая плазмодием. Плазмодии апузомонад образуются путем слияния нескольких одноклеточных особей и служат вероятнее всего для более эффективной пищедобычи. Особи внутри плазмодия сохраняют свою индивидуальность, например, жгутики. Со временем такие плазмодии либо погибают, либо распадаются обратно на одноклеточные стадии (Алимов, 2011).

Ichthyosporaea Cavalier-Smith 1998 (Opisthokonta) - это тканевые и внутриклеточные паразиты, инфицирующие кишечник рыб, амфибий и ракообразных. Заражение хозяина осуществляется при помощи спор. После заражения одноядерные толстостенные стадии внутри клеток хозяина растут, ядра делятся и образуются плазмодии. Плазмодий разрывает

стенку хозяйской клетки и оказывается в тканях, где может размножаться почкованием. В период спорогенеза вокруг ядер плазмодия обособляется цитоплазма. Такая фрагментация плазмодия приводит к образованию отдельных клеток - инвазионных спор (Алимов, 2011).

Еще одна паразитическая группа, в жизненном цикле которой присутствует трофическая стадия плазмодия - это *Harposporida* Caullery & Mesnil 1899 (Rhizaria: Endomyxa).

Гаплоспоридии - паразиты морских и пресноводных беспозвоночных животных.

Инвазионная спора гаплоспоридий попадает в хозяина, в кишечнике из споры выходит амебоидный зародыш (спороплазма), который может поглощаться гемоцитами или внедрятся в соединительную ткань и эпителий (см. *Схему 2, 1*, стр. 13). В амебоидном трофанте делятся ядра и образуется плазмодий (2). В плазмодии содержится обычный набор клеточных органелл. Ядра часто лежат парами, но примыкают друг к другу неплотно. В цитоплазме плазмодия обнаруживаются мембранные органеллы - так называемые гаплоспоросомы. Гаплоспоросомы образуются в особой зоне плазмодия, отделенной плазматической мембраной. Функция гаплоспоросом обсуждается - возможно, это депо гидролитических ферментов, но, вероятнее всего, гаплоспоросомы играют роль при формировании оболочки споронта.

Плазмодий гаплоспоридий способен фрагментироваться, отпочковывая участки с различным числом ядер (3). Такие дочерние плазмодии могут заглатываться гемоцитами и расселяться в тканях хозяина.

Когда плазмодий приступает к процессу споруляции, на его поверхности появляется тонкая оболочка. Ядра внутри плазмодия делятся мейозом и митозом, вокруг ядер начинает обособляться цитоплазма (4). Плазматическая мембрана будущих споробластов образуется за счет слияния уплощенных везикул, в большом количестве содержащихся в цитоплазме плазмодия. Таким образом, под оболочкой бывшего плазмодия формируются одноядерные гаплоидные споробласты (5). Такая стадия жизненного цикла гаплоспориидей имеет название "споронт". Споробласты сливаются друг с другом попарно с образованием зиготы (6). Зиготы преобразуются в толстостенные споры (7-10), ткани хозяина разрушаются и инвазионные стадии оказываются во внешней среде (Алимов, 2011).

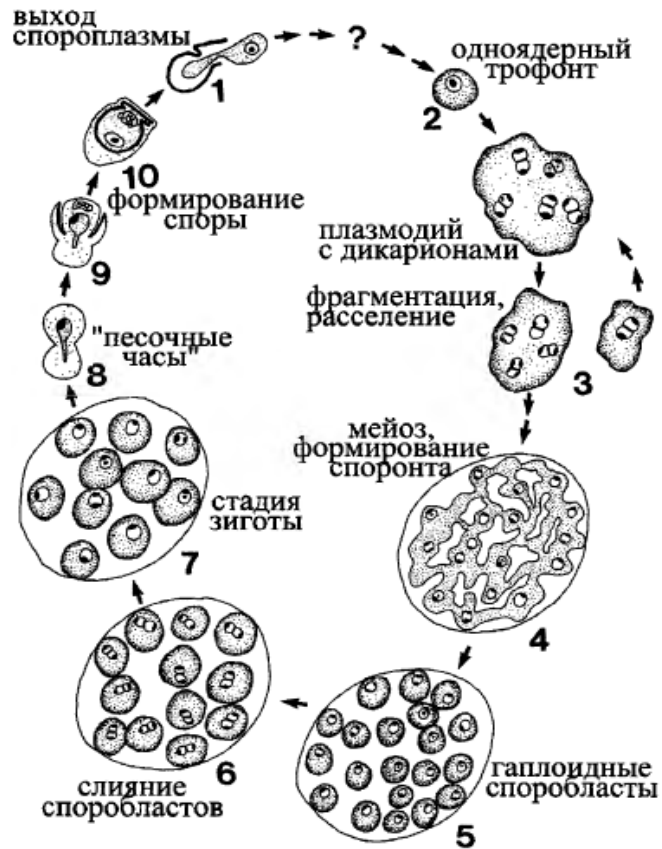


Схема 2. Схема обобщенного жизненного цикла гапლოსпориций. Из: Алимов, 2011.

Среди многоклеточных организмов такая форма организации, как плазмодий, распространена не столь широко. Наиболее известными обладателями плазмодия выступают представители паразитической группы Мухозоа Grassé, 1970 (Opisthokonta: Metazoa: Cnidaria).

Микоспоридии реализуют диксенный жизненный цикл, обычно включающий позвоночного хозяина как промежуточного и беспозвоночного - как окончательного.

Среди Мухозоа принято выделять две кланды - Malacosporea и Мухоспореа. К Malacosporea относятся животные, в качестве хозяев использующие мшанок и рыб; эта группа считается более примитивной, поскольку ее представители на некоторых стадиях жизненного цикла сохраняют эпителиальную и мышечную ткани. В отличие от них, представители группы Мухоспореа распространены гораздо шире и лишены тканей. Окончательными хозяевами чаще всего выступают аннелиды, а промежуточными - как рыбы, так и амфибии и некоторые теплокровные животные.

Заражение микоспоридиями нового хозяина осуществляется при помощи многоклеточных спор, которые образуются внутри трофической стадии, паразитирующей в клетках или тканях (Okamura et al., 2015).

В случае Мухоспореа миксоспора попадает в кишечник окончательного хозяина - беспозвоночного, из споры выходит двуядерная спороплазма, которая внедряется между клетками эпителия либо внутриклеточно (El-Matbouli & Hoffman, 1998, на виде *Mухоболус cerebralis*). Две двуядерные клетки затем сливаются, после чего подвергаются кариотомии с образованием четырех диплоидных ядер. После плазмотомии образуются четыре диплоидные клетки - две клетки, которые затем сформируют оболочку панспороцисты, а также две внутренние генеративные клетки, которые будут развиваться в актиноспоры. В результате серии митотических и мейотических делений формируется панспороциста, содержащая 4 или 8 актиноспор. В теле каждой споры содержится инвазионное начало – спороплазма.

Актиноспоры попадают в воду, где ими заражаются промежуточные хозяева - позвоночные. Многоклеточная спороплазма высвобождается в теле хозяина и внедряется в ткани и клетки (El-Matbouli et al., 1995). Клетки спороплазмы образуют дуэты, в которых вторичная (зародышевая, или генеративная) клетка оказывается окруженной первичной клеткой. Такие дуэты расселяются по организму хозяина. Ядра внешней, первичной клетки, делятся; формируется многоядерное тело с генеративными клетками внутри, которое в литературе называется плазмодием. Такой плазмодий является трофической стадией, он способен питаться с помощью пиноцитоза, его поверхность может образовывать микровилли. В процессе спорогонии одна генеративная клетка, называемая перицитом, обрастает другую и образуется панспоробласт (Morris, 2012). Внутренняя клетка в таком случае претерпевает митотические деления и дает начало клеткам будущей миксоспоры. Образовавшиеся в плазмодии миксоспоры высвобождаются во внешнюю среду и заражают окончательных хозяев.

Жизненный цикл представителей Malacosporea схож с таковым у представителей Мухоспореа, однако трофические стадии представлены многоклеточными мешкообразными или червеобразными организмами, паразитирующими в целомической полости мшанок, а также одноядерным псевдоплазмодием в эпителии почечных канальцев рыб (Okamura et al., 2015).

Анализируя плазмодии разнообразных таксономических групп, становится ясно, что термин “плазмодий” не четко определен и под ним в различных группах подразумеваются различные образования, которых объединяет лишь наличие в цитоплазме нескольких ядер.

Материалы и методы

Объект исследования

В качестве объекта для работы нами был выбран вид ортонектид *Intoshia linei* (Orthonectida: Rhopaluridae) (Giard, 1877), паразитирующий на нематринах вида *Lineus ruber* (Müller, 1774) (Nemertea: Pilidiophora: Heteronemertea: Lineidae). В силу сравнительно высокого для ортонектид процента заражения (около 5 %), а также доступности для сбора хозяина данный вид оказался наиболее удобным для изучения. Плазмодий настоящего вида ортонектид ранее не был подробно исследован.

Сбор материала

Сбор материала проводился в августе 2017 и 2018 гг. в районе поселка Дальние Зеленцы (69° 07' N, 36° 05' E). Немертины были собраны на литорали во время отлива под камнями. В лаборатории черви содержались в чашках Петри при температуре 4°C в фильтрованной морской воде. В дальнейшем живой материал изучался под бинокулярным микроскопом. Был проведен зрительный отбор зараженных немертин. Суммарно за два сезона было собрано порядка 1000 немертин, из них для дальнейшего изучения было отобрано порядка 40 зараженных особей.

Прижизненные фотографии половых особей ортонектид и зараженных немертин

Живые зараженные немертины *Lineus ruber* содержались в лаборатории при температуре 4°C в чашках Петри, рассматривались под бинокулярным микроскопом Leica M205C и фотографировались с использованием зеркального фотоаппарата. Самки и самцы ортонектид, вышедшие из хозяев в чашку Петри, изучались при помощи микроскопа Leica DM2500, оснащенного камерой Nikon DS-Fi3. Фотографии обрабатывались в программе ImageJ.

Изготовление гистологических срезов и изучение их методами световой микроскопии

Часть материала была залита в парафин для получения гистологических срезов. Немертины, предварительно расслабленные в растворе $MgCl_2$, были разделены на кусочки 0,5 - 0,7 мм³. Объекты фиксировались в жидкости Ценкера в течение получаса. После промывки и

обезвоживания материал был залит в парафин. Из парафиновых блоков с помощью ротационного микротомы Leica RM2265 были изготовлены срезы толщиной 5-7 мкм. Стекла со срезами окрашивались по стандартной методике дифференциального окрашивания Маллори. Готовые препараты изучались на световом микроскопе Leica DM2500, оснащенный камерой Nikon DS-Fi3. Фотографии обрабатывались в программе ImageJ.

Изготовление полутонких и ультратонких срезов

Часть материала фиксировалась и переводилась в блоки из эпоксидной смолы для получения тонких и полутонких срезов. Фиксация материала осуществлялась 2,5% глутаральдегидом на 0,2 М какодилатном буферном растворе (pH=7,4) в течение 2 ч при 4°C. После отмывки в смеси какодилатного буферного раствора и сахарозы (осмолярность 1050 мОсм) образцы были перенесены на 1 час в раствор 1% OsO₄ на том же буфере. После фиксации материал был отмыт в 0,1% какодилатном буфере, обезвожен в серии растворов ацетона возрастающей концентрации и заключен в эпоксидную смолу Эпон-Аралдит. Из полимеризованных блоков эпоксидной смолы на ультрамикротоме Leica EM UC7 были изготовлены срезы разной толщины. Срезы толщиной 750 нм размещались на предметном стекле для последующего исследования на оптическом микроскопе. Срезы толщиной 50 нм были перенесены на бленды, покрытые формварной пленкой, и изучались на трансмиссионном электронном микроскопе.

Окрашивание и изучение полутонких срезов методами оптической микроскопии

Полутонкие срезы на стеклах были окрашены 1% метиленовым синим красителем. Окрашенные срезы изучались на световом микроскопе Leica DM2500, снабженном камерой Nikon DS-Fi3. Фотографии обрабатывались в программе ImageJ.

Контрастирование и изучение ультратонких срезов методами трансмиссионной электронной микроскопии

Для контрастирования бленды со срезами помещались на каплю 2% раствора уранилацетата на 50% этаноле на 15 минут. После отмывки дистиллированной водой бленды окрашивались цитратом свинца (по: Reynolds, 1963) в течение 5 минут. Готовые препараты просматривались на просвечивающем электронном микроскопе Jeol JEM-1400, снабженном цифровой фотокамерой Olympus-SIS Veleta. Электронные фотографии обрабатывались в программе ImageJ.

Иммуногистохимическое окрашивание замороженных срезов и изучение их на конфокальном микроскопе

Живой материал обрабатывался для последующего изучения на конфокальном микроскопе. Зараженные образцы *L. ruber* фиксировались в течение 12 часов в 4% параформальдегиде (PFA) с 0.01 М натрий-фосфатным буфером (PBS). После фиксации образцы были отмыты в смеси PBS и 0,1 % Triton X-100 (PBT). Материал хранился в смеси натрий-фосфатного буфера с 0,1% азидом натрия при температуре +4 °С. Впоследствии при помощи криостатирующего микротомы Leica CM-3050S из фиксированного материала были изготовлены замороженные срезы.

Для окрашивания срезы были выдержаны 2 часа в растворе 1% натрий-фосфатного буфера с Triton X-100 (PBT), а затем инкубированы на ночь в растворе первичных антител к ацетилированному α -тубулину (Sigma, T-6793; разведение 1:1000–1:2000) и к серотонину (Immunostar, 20080, разведение 1:2000). После отмытки образцов в PBT они были инкубированы в растворе вторичных антител (разведение 1:800–1:1000). Использовались следующие вторичные антитела: Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Rabbit (Molecular probes, A-21206) и Alexa Fluor 647 Donkey Anti-Mouse (Molecular probes, A-31571). Для визуализации мышечных элементов после окрашивания антителами образцы были выдержаны 2 часа в растворе phalloidin-TRITC (разведение 1:100). Для визуализации клеточных ядер материал был окрашен флуоресцентным красителем DAPI. Срезы на предметных стеклах заключались под покровное стекло в среду Mowiol 4-88.

Изучение окрашенных срезов проводилось на конфокальном лазерном микроскопе Leica TCS SPE. Стопки изображений были обработаны с помощью пакета FiJI программы ImageJ.

Результаты

Зараженные немертину зрительно отличаются от не зараженных, поскольку самки и самцы, находящиеся в плазмодии, просвечивают через покровы *L. ruber* (Рис. 1).

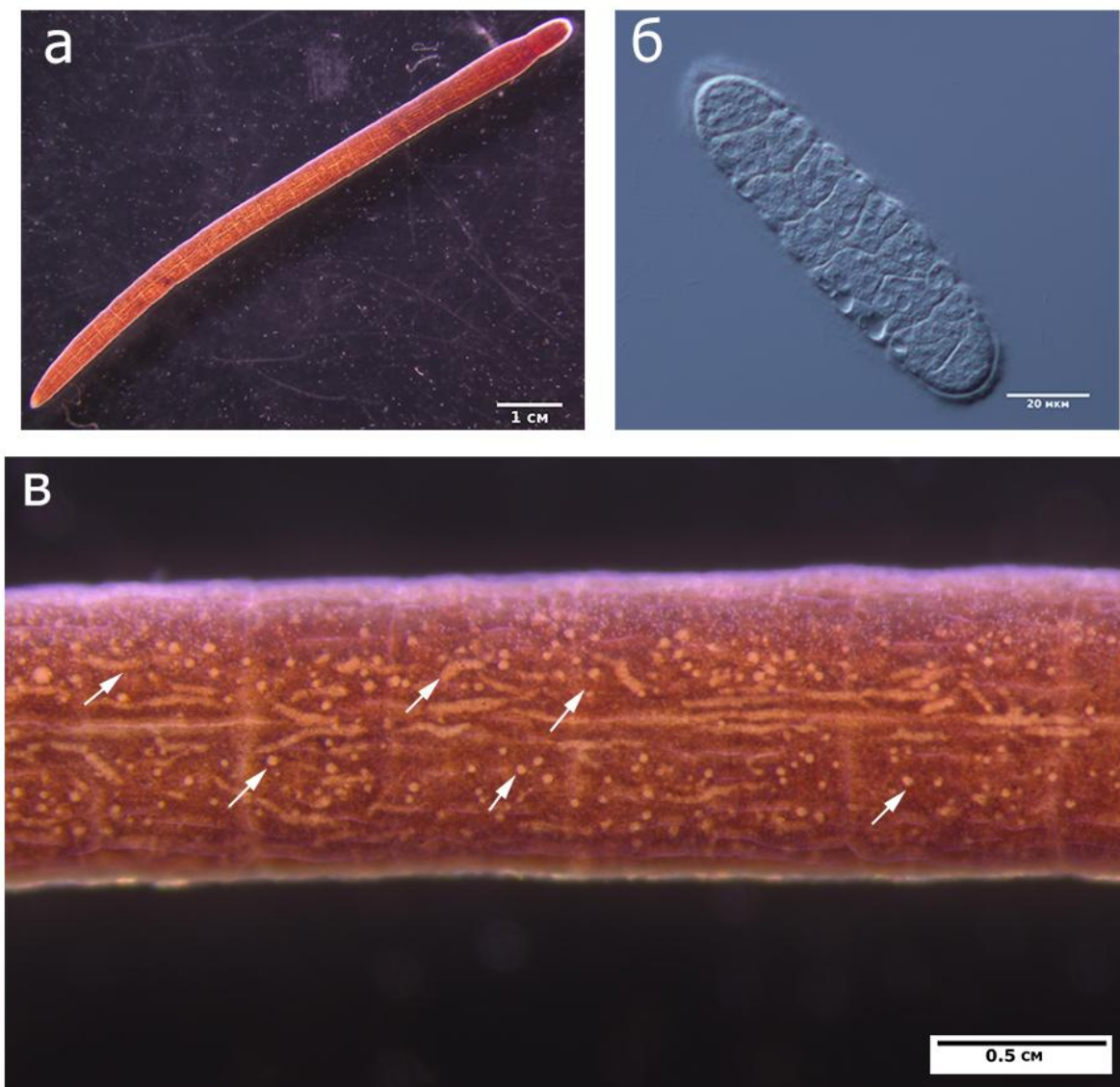


Рис. 1. Прижизненные фотографии. а. Зараженная немертину *L. ruber* – б. Самка *I. linei* – в. Самки и самцы *I. linei* просвечивают через покровы хозяина. Стрелки указывают на взрослых особей ортонектид, находящихся внутри плазмодия.

Границы плазмодия не различимы на светооптическом уровне. Плазмодий может располагаться как по всей длине тела хозяина, так и на небольшом участке, например, в хвосте немертину. Таким образом, максимальная длина плазмодия *I. linei* может составлять 5-7 см.

Плазмодий не имеет определенной формы. Развиваясь в теле хозяина, плазмодий образует многочисленные отростки, пронизывающие все тело хозяина (Рис. 2а).

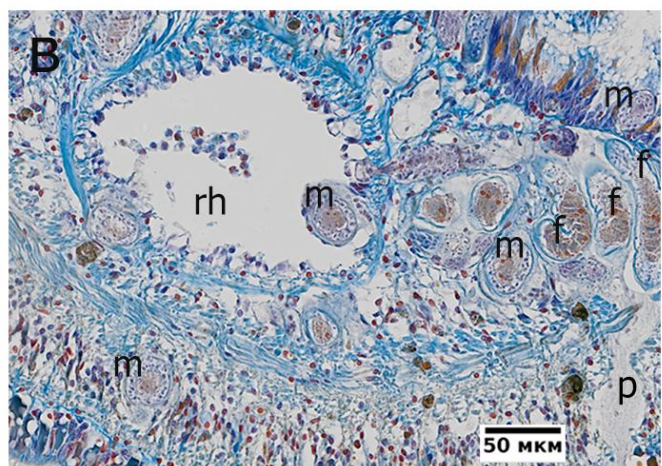
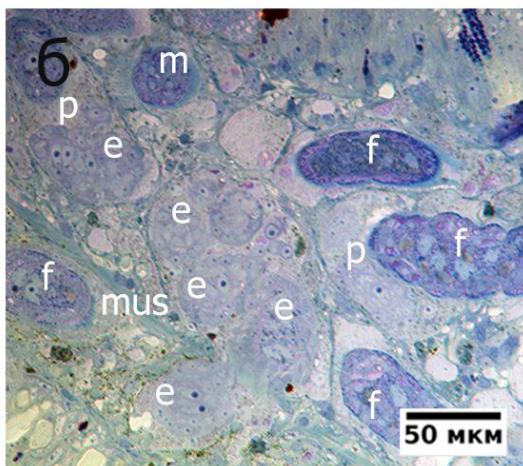
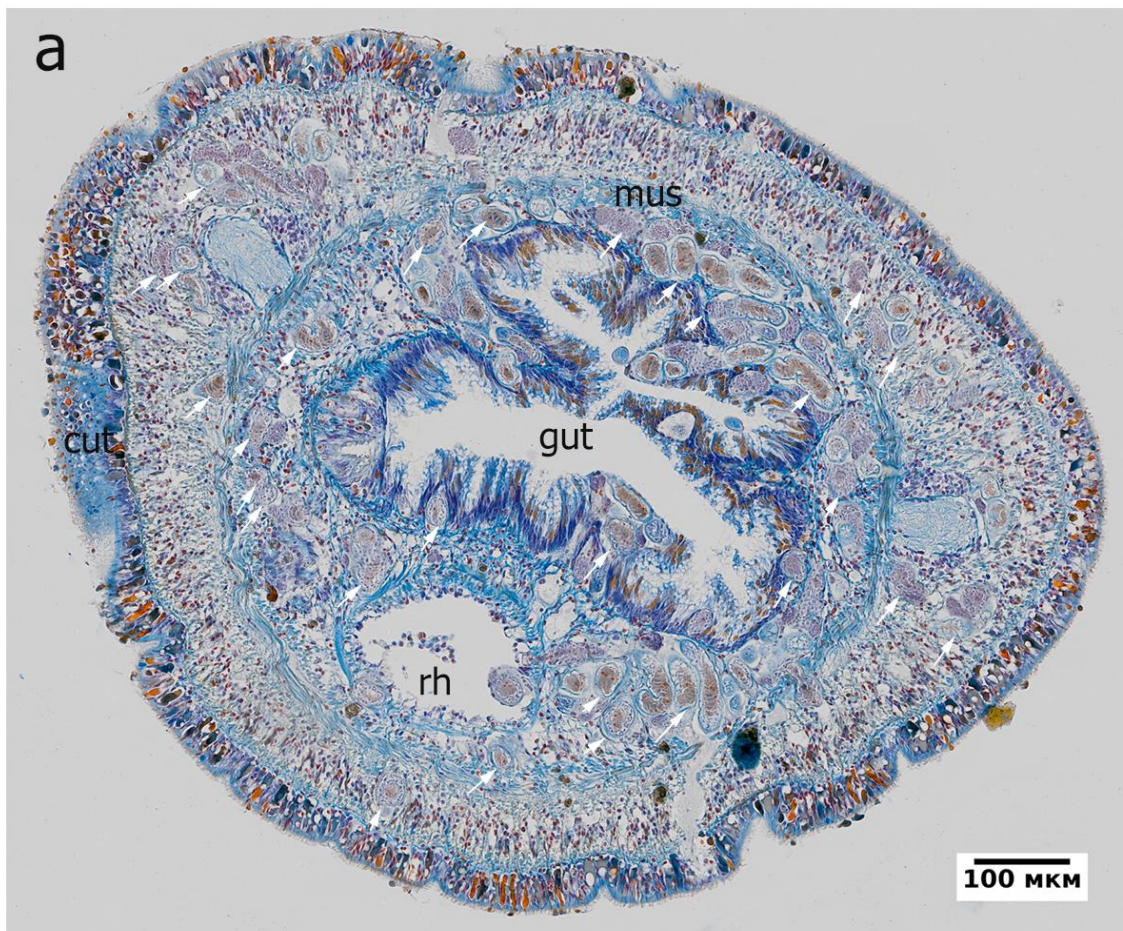


Рис. 2. а, в – парафиновые срезы; 5 мкм; окраска по Маллори. б – полутонкий срез; 750 нм; окраска метиленовым синим. а. Срез зараженной немертины *L.ruber*, общая картина заражения – б. Плазмодий, растущий через слой кольцевых мышц хозяина – в. Пораженная ринхоцель *L.ruber*. *p* плазмодий *I.linei*; *e* эмбрион *I.linei*; *m* самец *I.linei*; *f* самка *I.linei*; *rh* ринхоцель *L.ruber*; *gut* просвет кишки *L.ruber*; *mus* мускулатура *L.ruber*; *cut* покровы *L.ruber*

Отростки плазмодия можно обнаружить в паренхиме, в мышечной, в половой и в нервной системах немертины (Рис. 2, рис. 3). Пищеварительная система, как и ринхоцель, поражаются крайне редко (Рис. 2в).

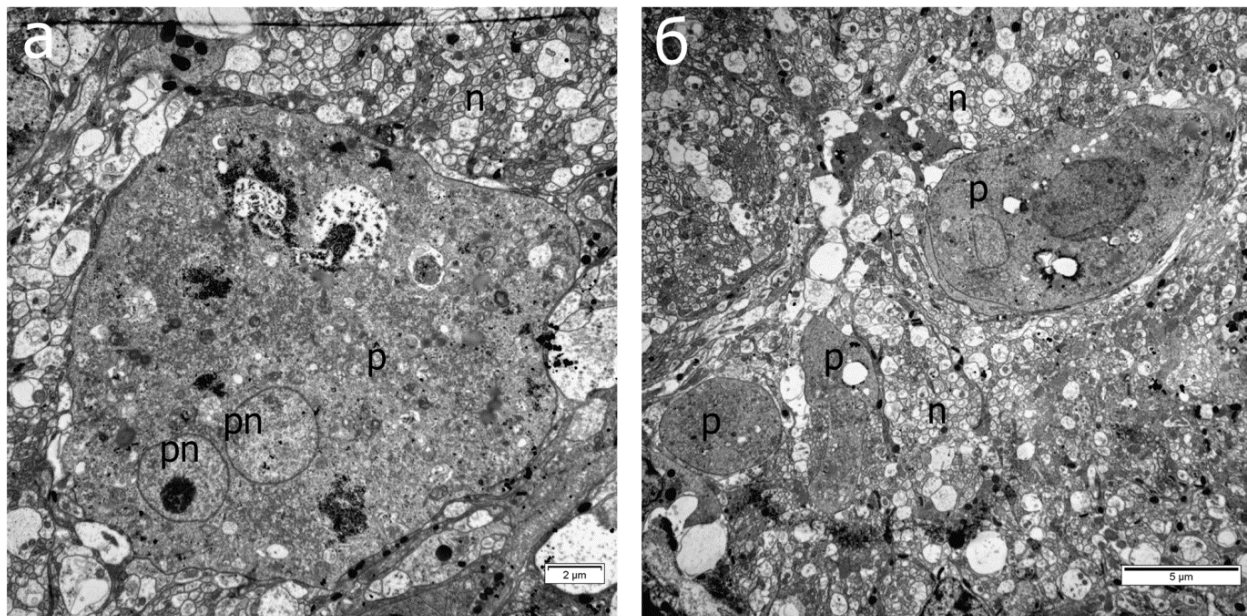


Рис. 3. ТЭМ. а, б. Отростки плазмодия *I. linei* в нервной системе хозяина. *p* плазмодий; *pn* ядро плазмодия; *n* нервный ствол хозяина

Диаметр отростков плазмодия *I. linei* различен и варьирует в пределах 200 - 2 мкм (Рис. 4). Встречаются как массивные отростки, так и очень тонкие ответвления, которые возможно диагностировать исключительно с помощью электронной микроскопии (Рис. 4б,в,г).

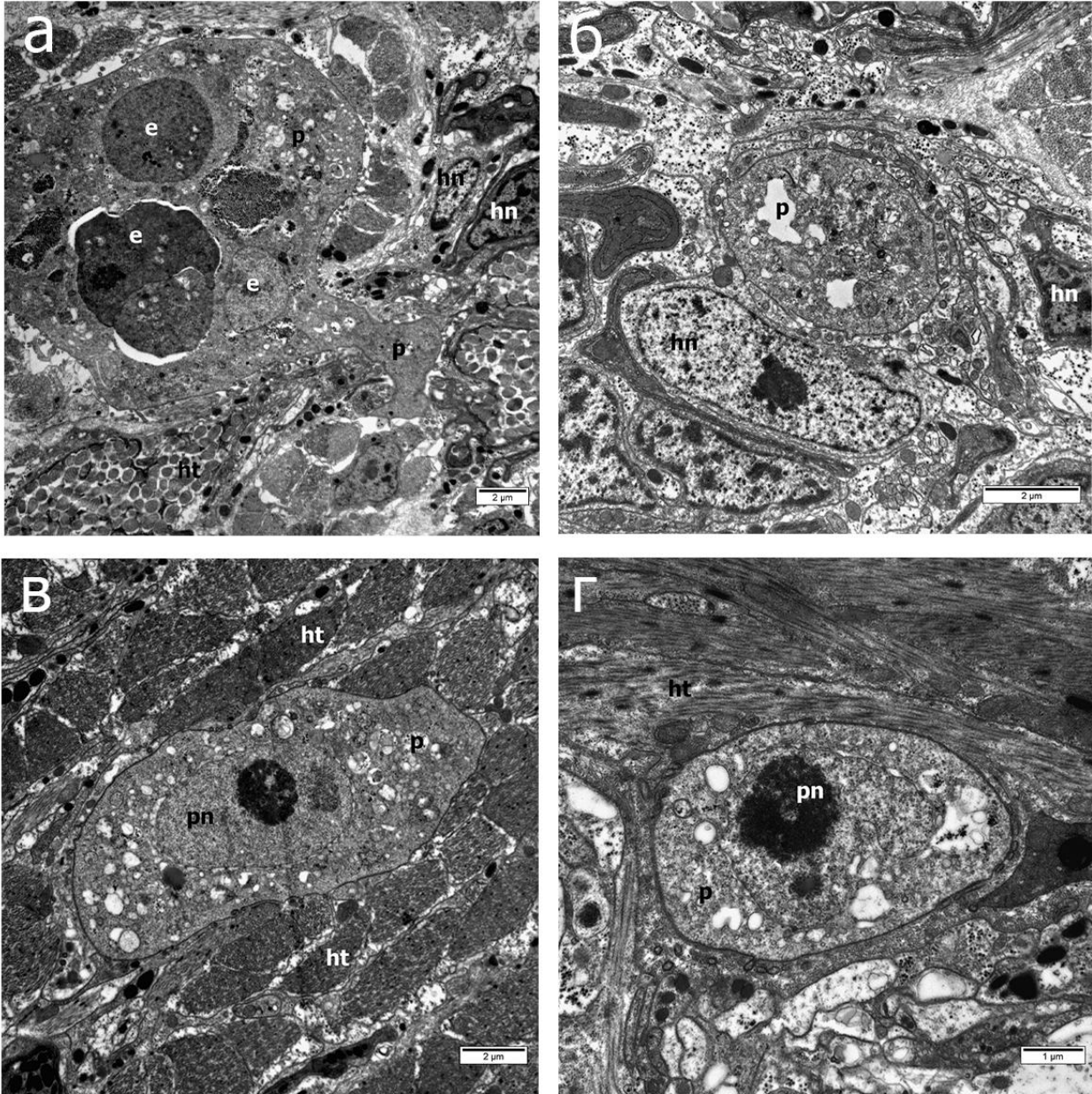


Рис. 4. ТЭМ. Разнообразие отростков плазмодия. *p* плазмодий; *pn* ядро плазмодия; *e* эмбрион; *ht* ткани хозяина; *hn* ядро клетки хозяина

Ткани хозяина могут плотно прилегать к поверхности плазмодия (Рис. 5а, б). В клетках хозяина, плотно прилежащих к плазмодию, ядра часто принимают вытянутую форму (Рис. 5б). Иногда между клетками хозяина и плазмодием могут образовываться лакуны; ткани немертины “разрыхляются” (Рис. 5в, г).

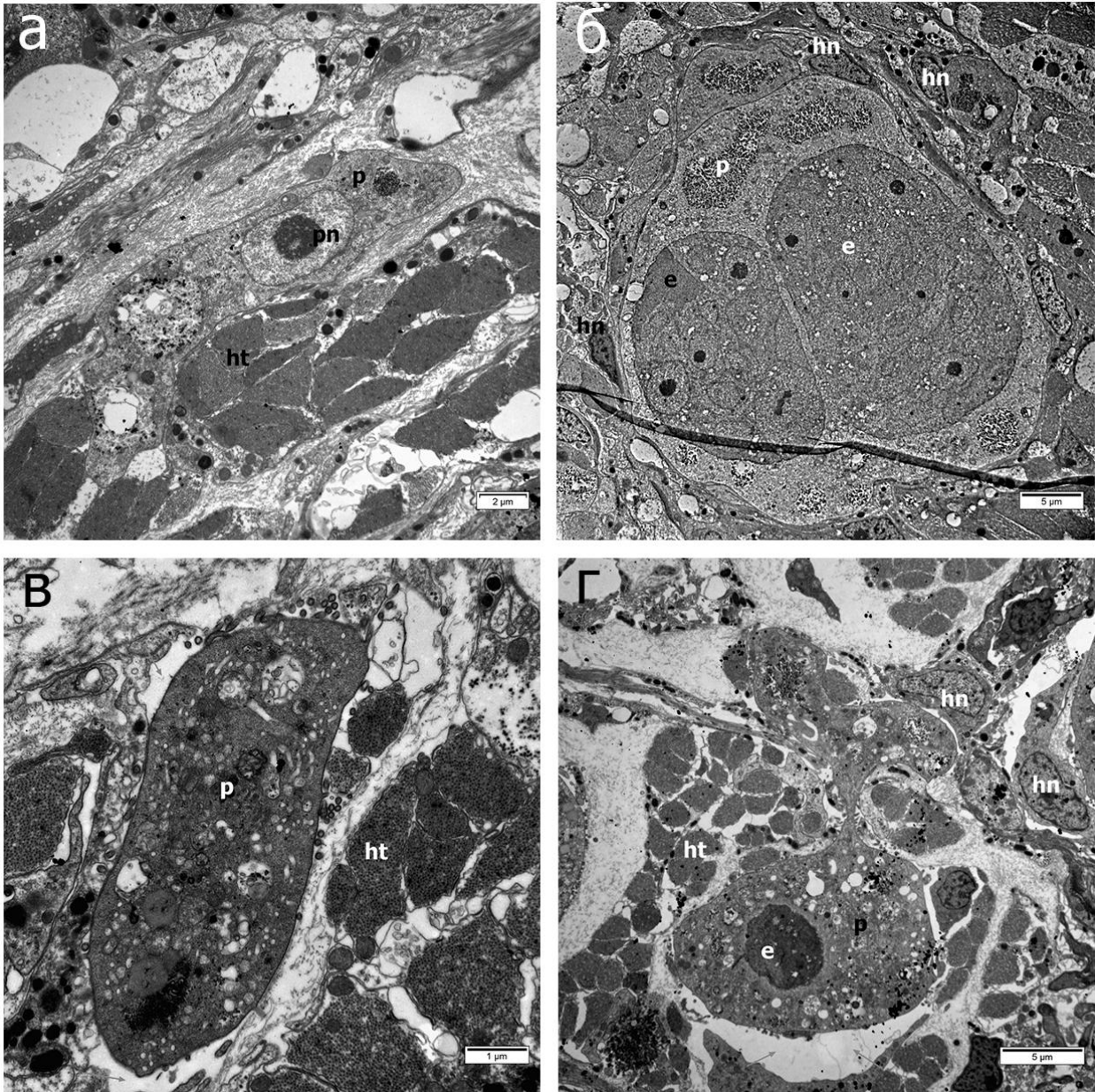


Рис. 5. ТЭМ. а, б. Отростки плазмодия, плотно прилегающие к тканям хозяина – в, г. Отростки плазмодия, лежащие в тканях свободно. *p* плазмодий; *pn* ядро плазмодия; *e* эмбрион; *ht* ткани хозяина; *hn* ядро клетки хозяина. Стрелками показаны лакуны, образующиеся между отростком плазмодия и соседними тканями.

Поверхность плазмодия может быть гладкой, но часто она несет тонкие короткие микровиллы (*Рис. 6*). Микровиллы вдаются в ткани хозяина либо идут параллельно поверхности плазмодия. Диаметр микровилл 100-200 нм, длина около 600 нм.

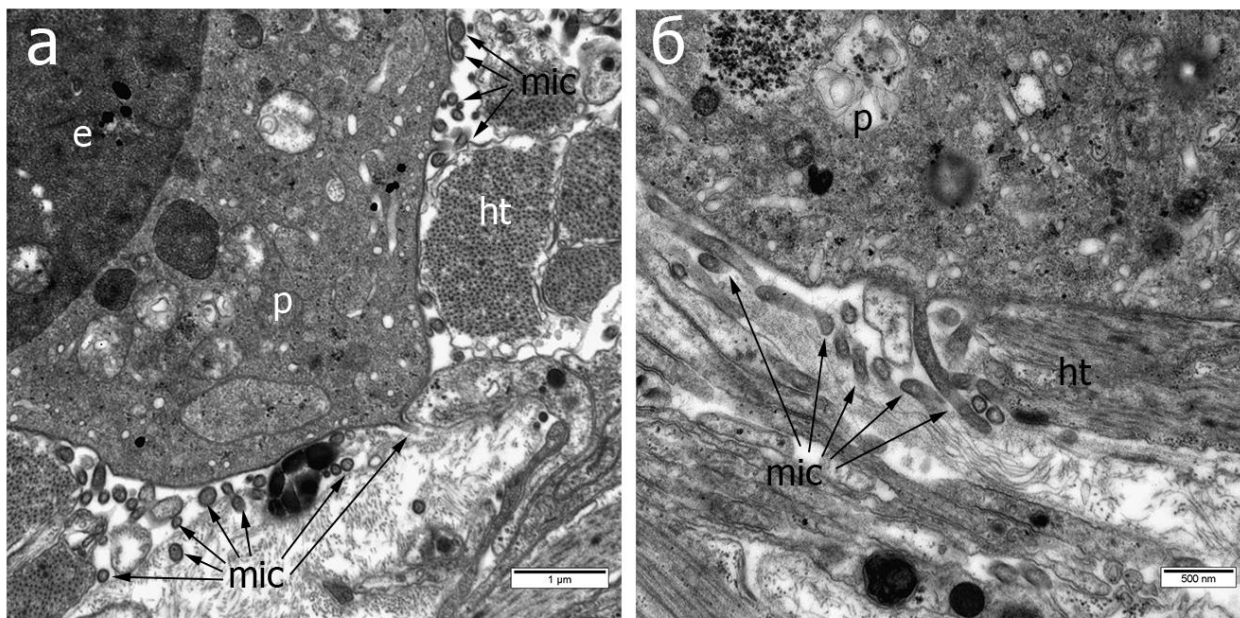


Рис. 6. ТЭМ. Микровиллы плазмодия. p плазмодий; *e* эмбрион; *mic* микровиллы; *ht* ткани хозяина.

Плазмодий на всем протяжении отделен от тканей хозяина хорошо заметной оболочкой. Оболочка плазмодия толще, чем плазматические мембраны окружающих плазмодий клеток хозяина (Рис. 6а). При ближайшем рассмотрении оболочки в ней читаются два липидных бислоя, то есть граница между цитоплазмой плазмодия и тканями хозяина представлена двумя унитарными мембранами (Рис. 6б, в, г). Две мембраны в оболочке плазмодия сближены сильнее, чем в ядерной оболочке. На всем протяжении две мембраны плазмодия находятся на одинаковом расстоянии.

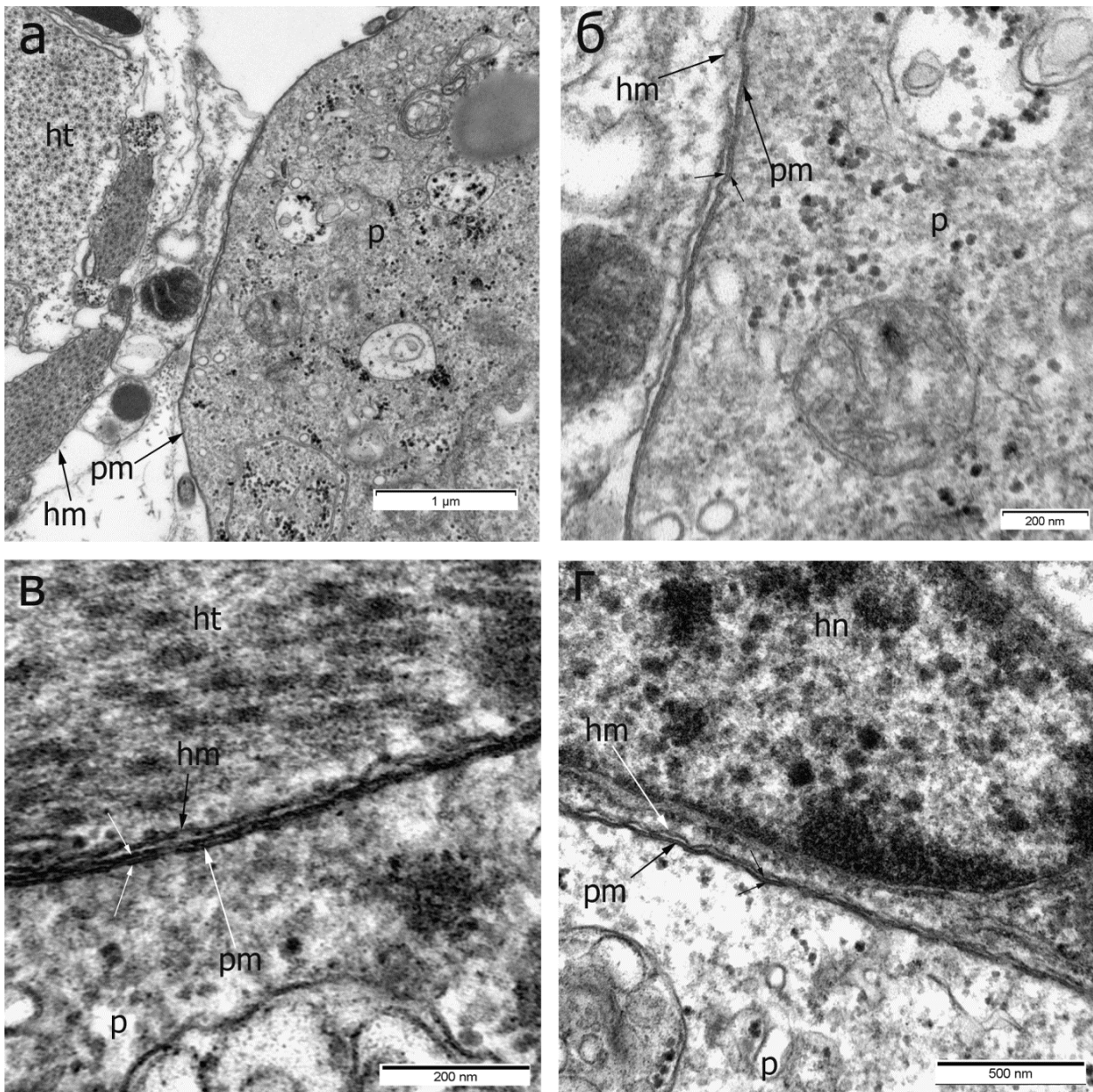


Рис. 7. ТЭМ. Плазмодий на всем протяжении одет двойной мембраной. *p* плазмодий; *pm* мембраны плазмодия; *pn* ядро плазмодия; *ht* ткани хозяина; *hn* ядро клетки хозяина; *hm* мембрана клетки хозяина. Стрелки указывают на два липидных бислоя, из которых состоит оболочка плазмодия.

Цитоплазма плазмодия содержит множество различных по структуре и размеру гранул и включений (Рис. 8а), в том числе различные везикулы, как моно-, так и мультиламеллярные (Рис. 8б). В кортикальной зоне плазмодия мощно развита тубулярная сеть эндоплазматического ретикулума (Рис. 8в, г).

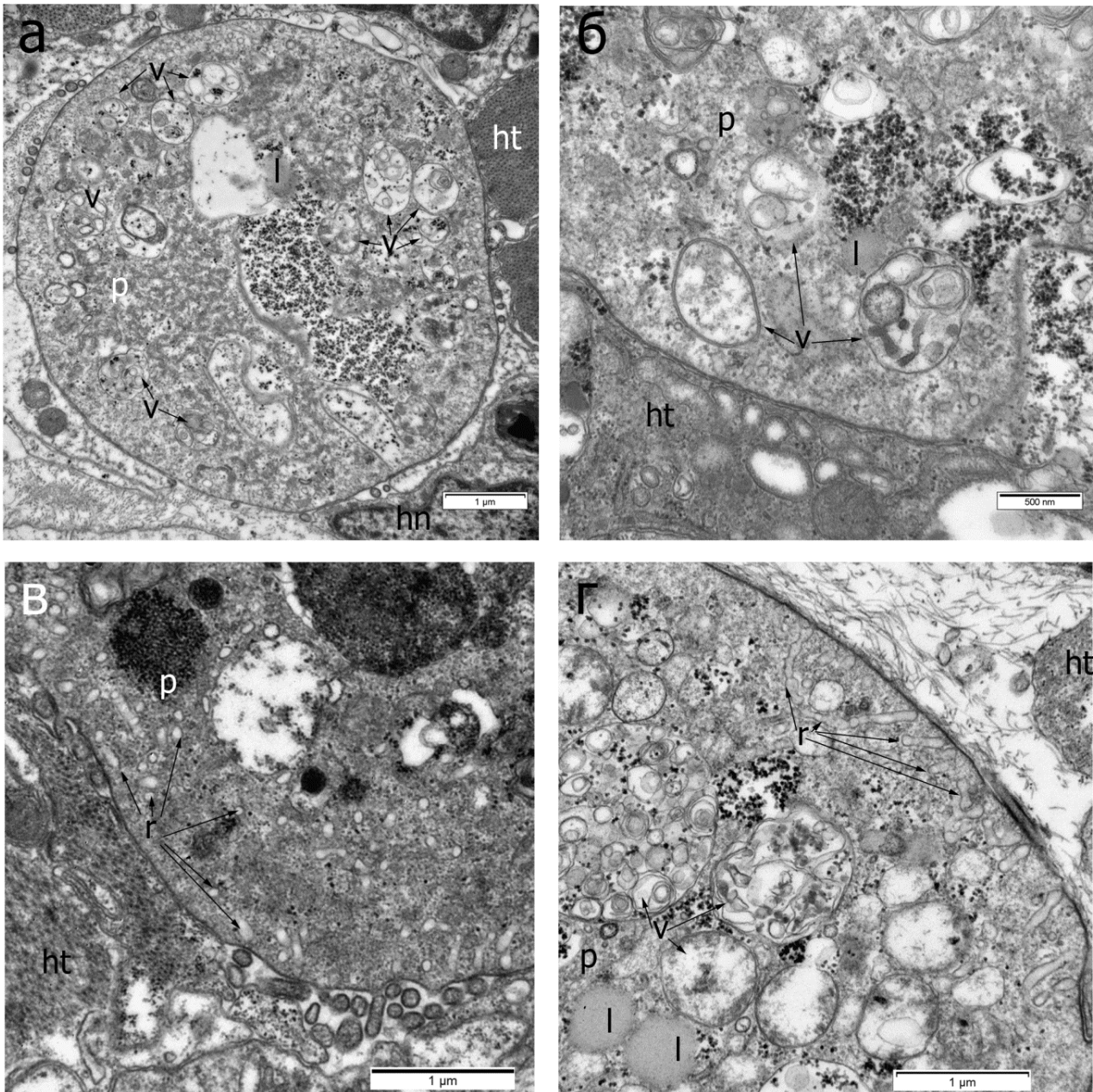


Рис. 8. ТЭМ. а. Общее соотношение различных компонентов цитоплазмы плазмодия – б. Везикулы в цитоплазме плазмодия – в, г. Кортикальная сеть эндоплазматического ретикулума цитоплазмы плазмодия. *p* плазмодий; *v* везикулы; *l* липидная гранула; *r* тубулярная сеть ЭПР; *ht* ткани хозяина; *hn* ядро клетки хозяина

В цитоплазме присутствуют митохондрии с пластинчатыми кристами (Рис. 9а, г), встречаются диктиосомы аппарата Гольджи (Рис. 9б, в).

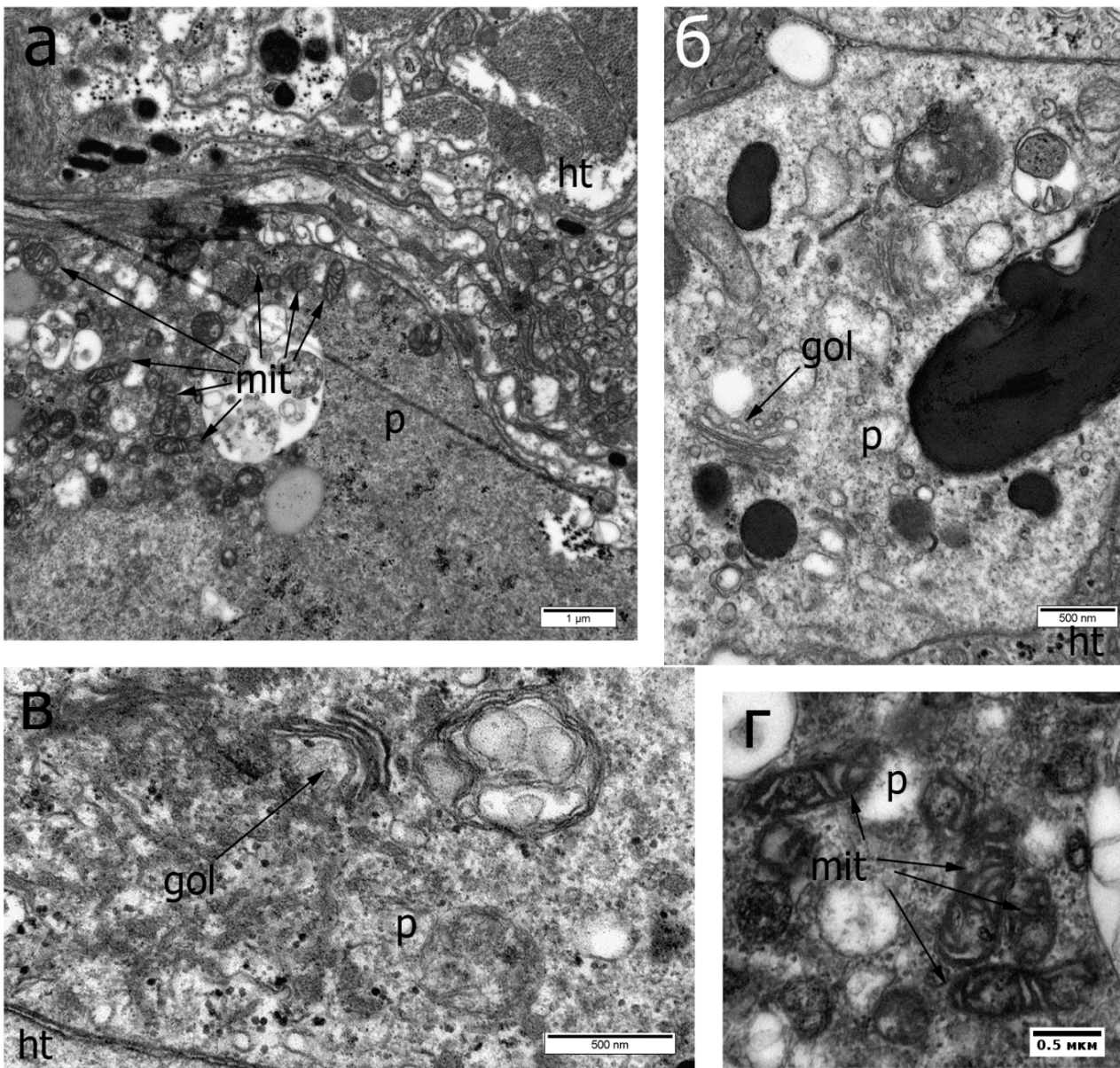


Рис. 9. ТЭМ. а, г. Митохондрии в цитоплазме плазмодия – б, в. Диктиосомы аппарата Гольджи в цитоплазме плазмодия. *p* плазмодий; *mit* митохондрии; *gol* диктиосомы аппарата Гольджи; *ht* ткани хозяина.

В цитоплазме плазмодия обнаруживаются свободно лежащие ядра (Рис. 10). Ядра плазмодия округлые или эллипсоидные, диаметр ядер 1-2 мкм. В ядрах выявляются плотные округлые ядрышки. Ядра чаще всего одиночные и распределены равномерно по всей цитоплазме (Рис. 10а). Иногда встречаются группы ядер по 5-6 штук (Рис. 10б).

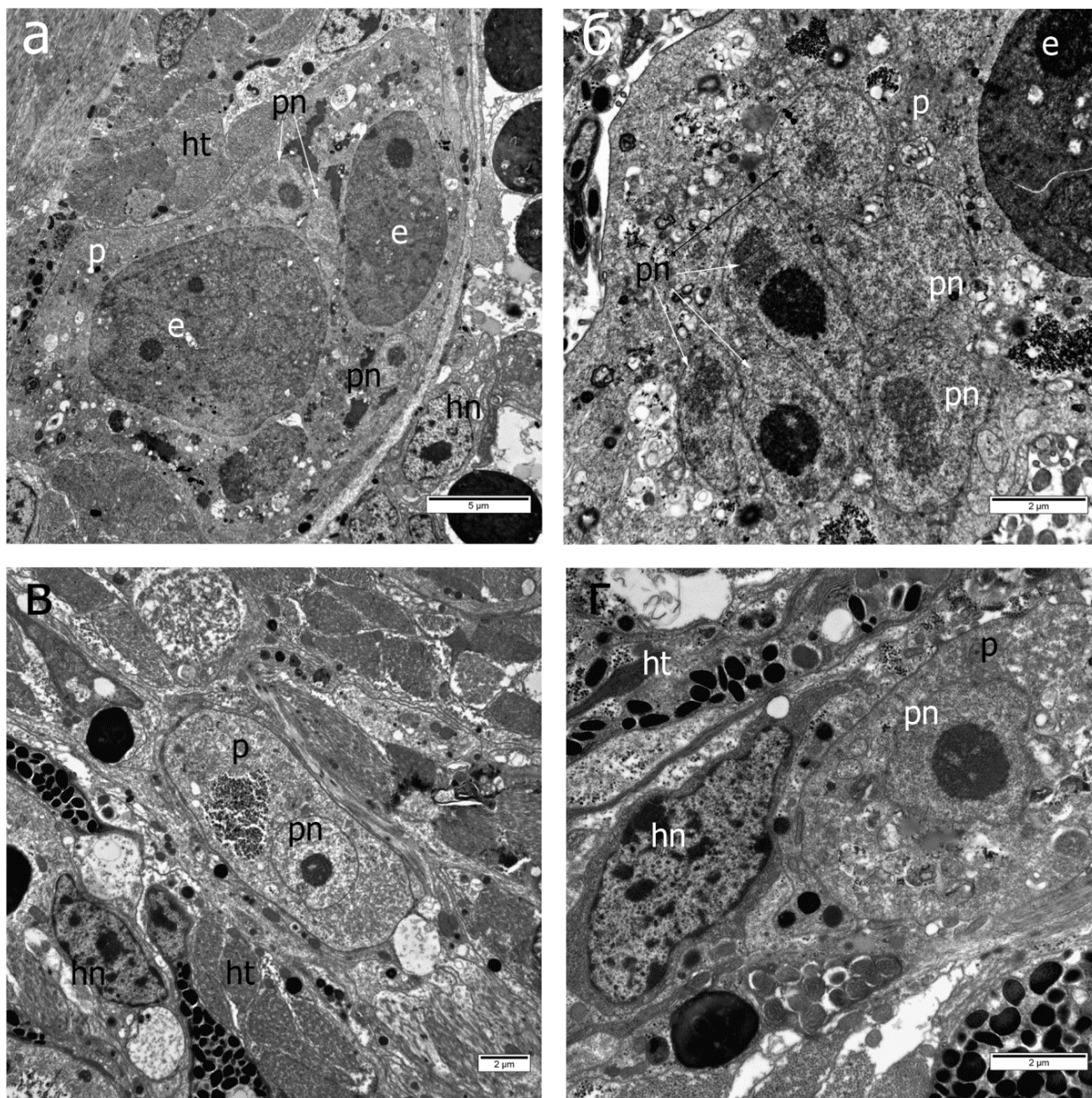


Рис. 10. ТЭМ. а. Свободно лежащие в цитоплазме плазмодия ядра плазмодия – б. Группа ядер плазмодия – в, г. Ядра хозяина отличаются от ядер плазмодия. *p* плазмодий; *pn* ядро плазмодия; *e* эмбрион; *ht* ткани хозяина; *hn* ядро клетки хозяина

При этом ядра хозяина обладают неправильной формой, в диаметре составляют 2-8 мкм и отличаются по распределению хроматина (Рис. 10в, г).

При окрашивании DAPI свечение ядер хозяина интенсивнее, чем свечение ядер плазмодия, что указывает на вероятные различия в содержании ДНК (Рис. 11а, б).

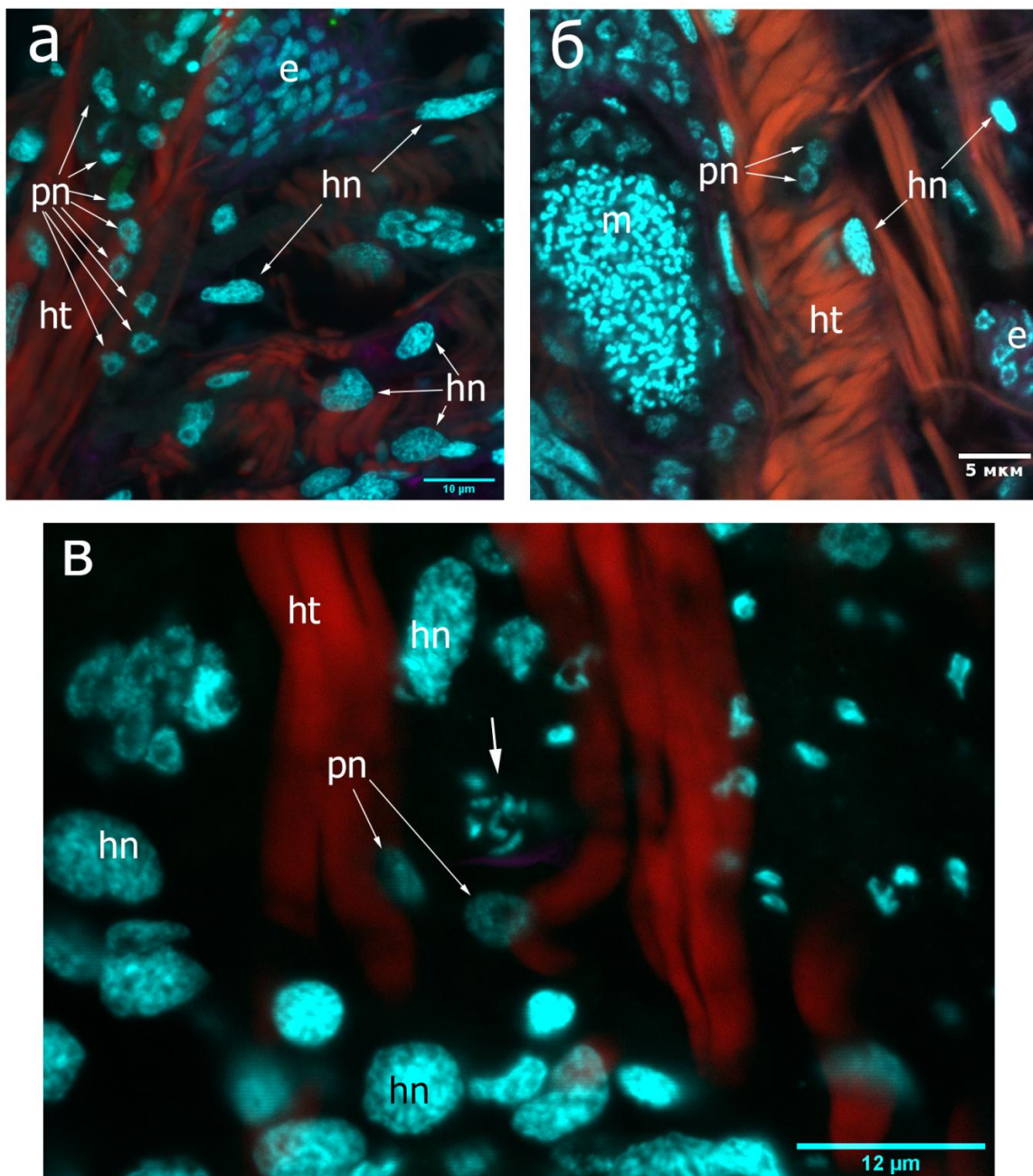


Рис. 11. Иммуногистохимическое окрашивание; конфокальная микроскопия. а, б. Ядра плазмодия хорошо отличимы от ядер хозяина – в. Метафазная пластинка ядра плазмодия. *p* плазмодий; *pn* ядро плазмодия; *e* эмбрион; *ht* ткани хозяина; *hn* ядро клетки хозяина. Стрелка указывает на метафазную пластинку ядра плазмодия.

Методы иммуногистохимии позволяют наблюдать окрашенную метафазную пластинку ядер плазмодия (Рис. 11в). Различимы приблизительно 6 хромосом. Подобные картины могут свидетельствовать о процессах деления ядер плазмодия.

Кроме органелл в цитоплазме плазмодия лежат отдельные клетки, покрытые дополнительной унитарной мембраной (Рис. 12).

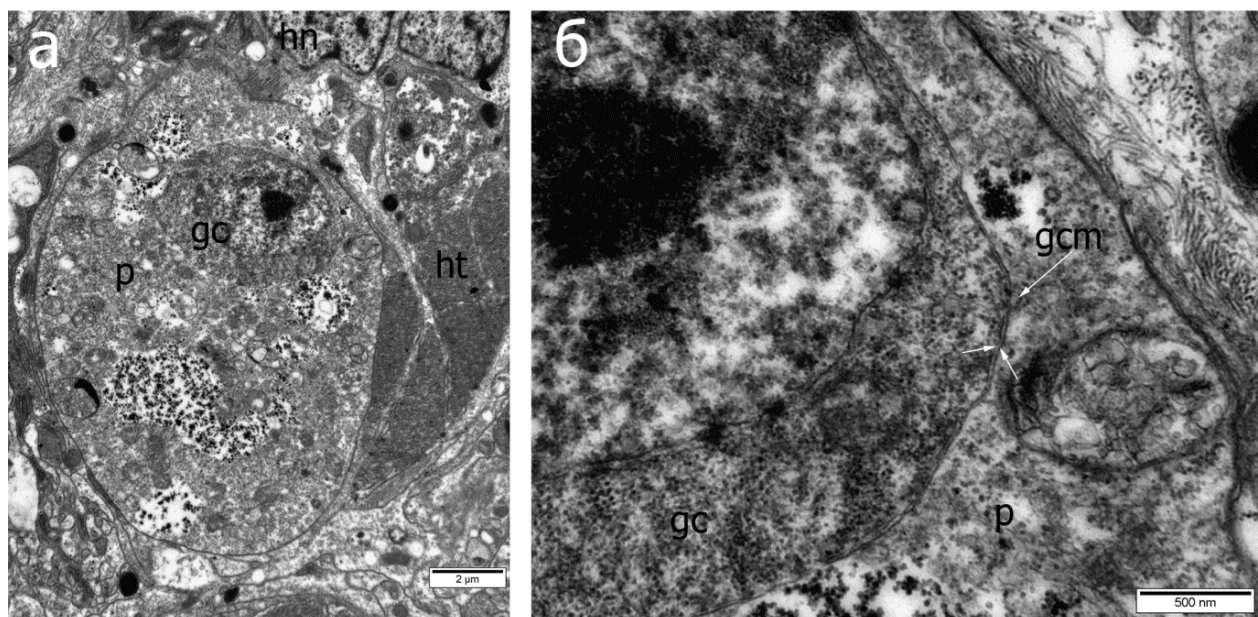


Рис. 12. ТЭМ. а. Генеративная клетка в отростке плазмодия – б. Двойная мембрана генеративной клетки. р плазмодий; gc генеративная клетка; gcm мембраны генеративной клетки; ht ткани хозяина; hn ядро клетки хозяина. Стрелки указывают на два липидных бислоя, разделяющих цитоплазму плазмодия и цитоплазму генеративной клетки.

Клетки внутри плазмодия либо одиночные (Рис. 13а), либо организованы в дуэты (Рис. 13б), либо лежат группой 5-7 клеток (Рис. 13в). Клетки имеют форму сферы и содержат ядра, не отличимые от ядер плазмодия. Диаметр клеток приблизительно 5-8 мкм.

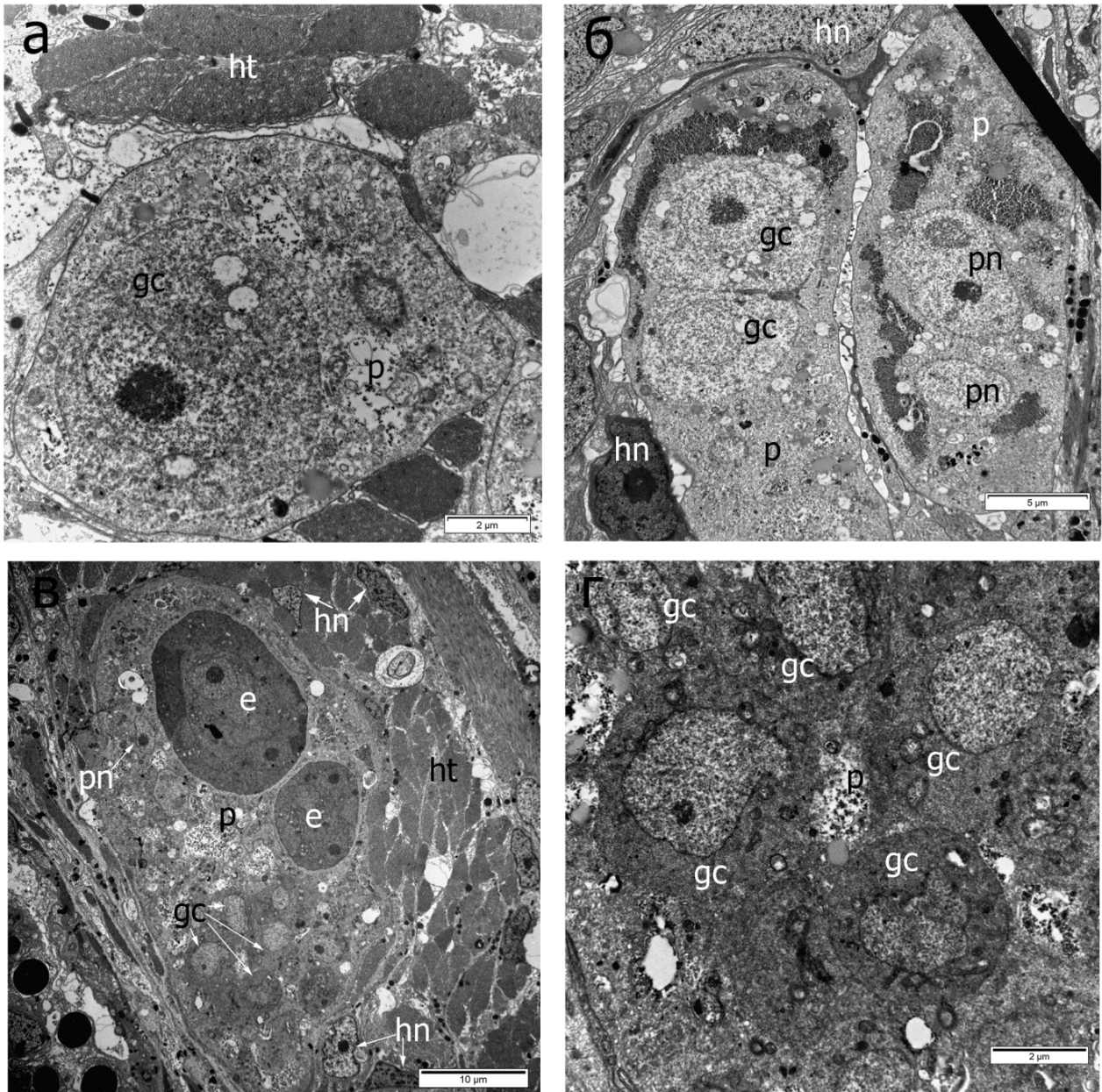


Рис. 13. ТЭМ. а. Одиночная генеративная клетка в цитоплазме плазмодия – б. Дуэт генеративных клеток – в, г. Группа генеративных клеток. *p* плазмодий; *pn* ядро плазмодия; *gc* генеративная клетка; *e* эмбрион; *ht* ткани хозяина; *hn* ядро клетки хозяина

В плазмодии можно наблюдать эмбрионов ортонектид, а также сформированных самок и самцов (*Рис. 14а*).

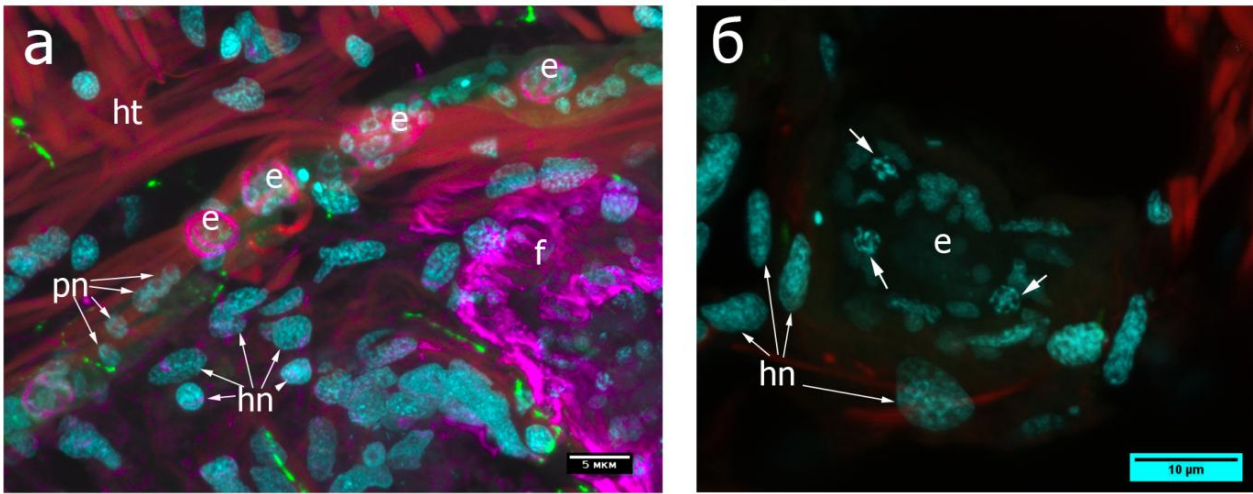


Рис. 14. Иммуногистохимическое окрашивание; конфокальная микроскопия. а. Плазмодий, содержащий эмбрионы и половую особь, растет в мышцах хозяина – б. Метафазные пластинки ядер эмбрионов ортонектид. pn ядро плазмодия; e эмбрион; f самка; ht ткани хозяина; hn ядро клетки хозяина. Стрелки указывают на метафазные пластинки ядер эмбриона.

Метафазная пластинка ядер эмбрионов схожа с метафазной пластинкой ядер плазмодия (*Рис. 14б*). Заметны приблизительно 6 хромосом.

В одном участке цитоплазмы плазмодия могут лежать эмбрионы, находящиеся на разных стадиях развития (Рис. 15а). Периодически встречаются дуэты эмбрионов, то есть лежащие рядом эмбрионы одного возраста (Рис. 15б). Эмбрионы покрыты дополнительной унитарной мембраной, которая отделяет их от цитоплазмы плазмодия (Рис. 15в, г).

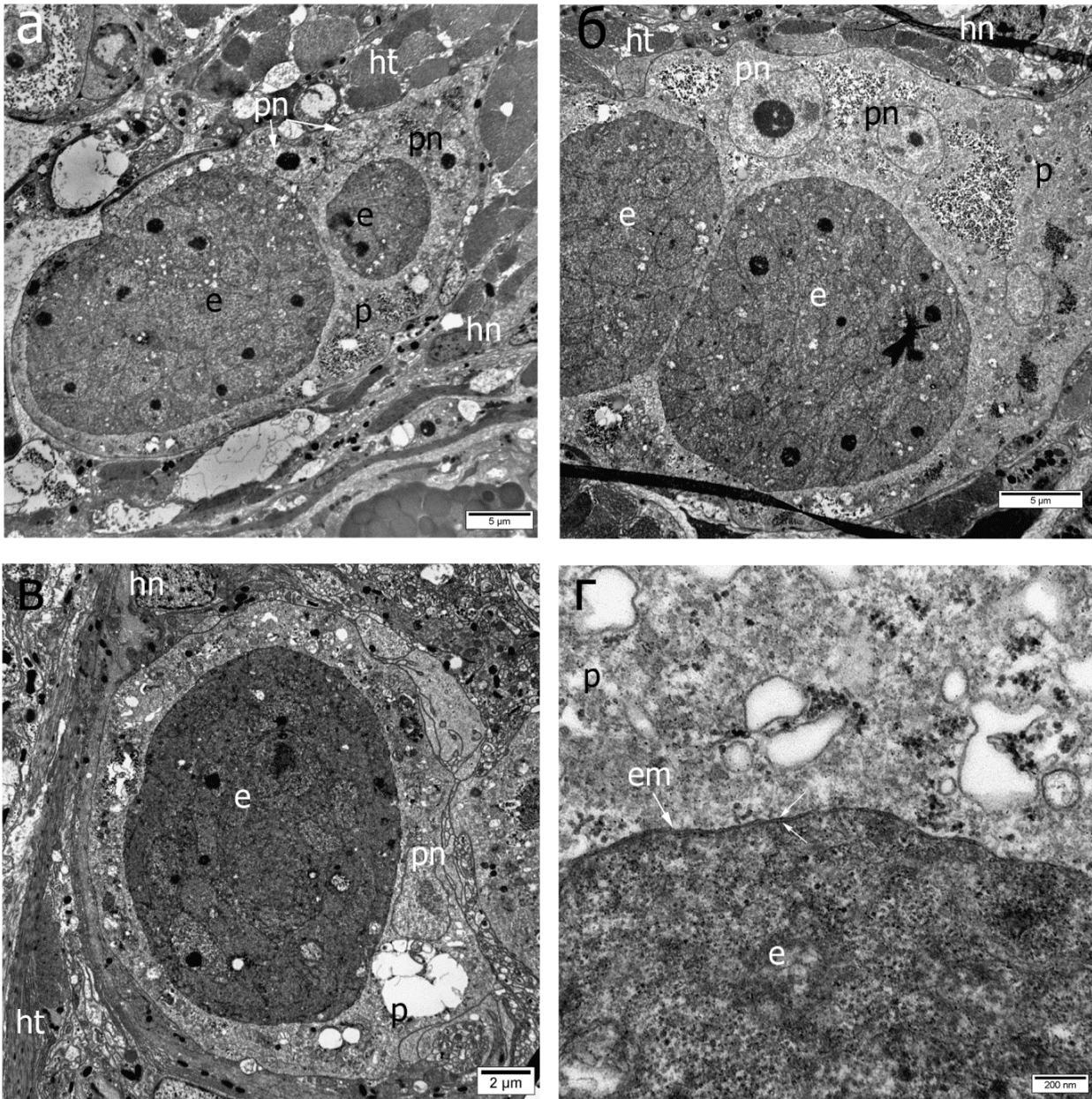


Рис. 15. ТЭМ. а. Эмбрионы разных возрастов в плазмодии – б. Дуэт эмбрионов – в, г. Двойная мембрана эмбриона ортонектид. *p* плазмодий; *pn* ядро плазмодия; *pn* ядро плазмодия; *e* эмбрион; *em* мембраны эмбриона; *ht* ткани хозяина; *hn* ядро клетки хозяина. Стрелки указывают на две унитарных мембраны, разграничивающие цитоплазму плазмодия и цитоплазму клетки эмбриона.

Готовые к скорому выходу во внешнюю среду половые особи ортонекид, находящиеся в цитоплазме плазмодия, отличаются наличием ресничек, покрывающих всю поверхность организмов (*Рис. 16*). Самки и самцы ортонекид отграничены от цитоплазмы плазмодия дополнительной унитарной мембраной (*Рис. 16б*).

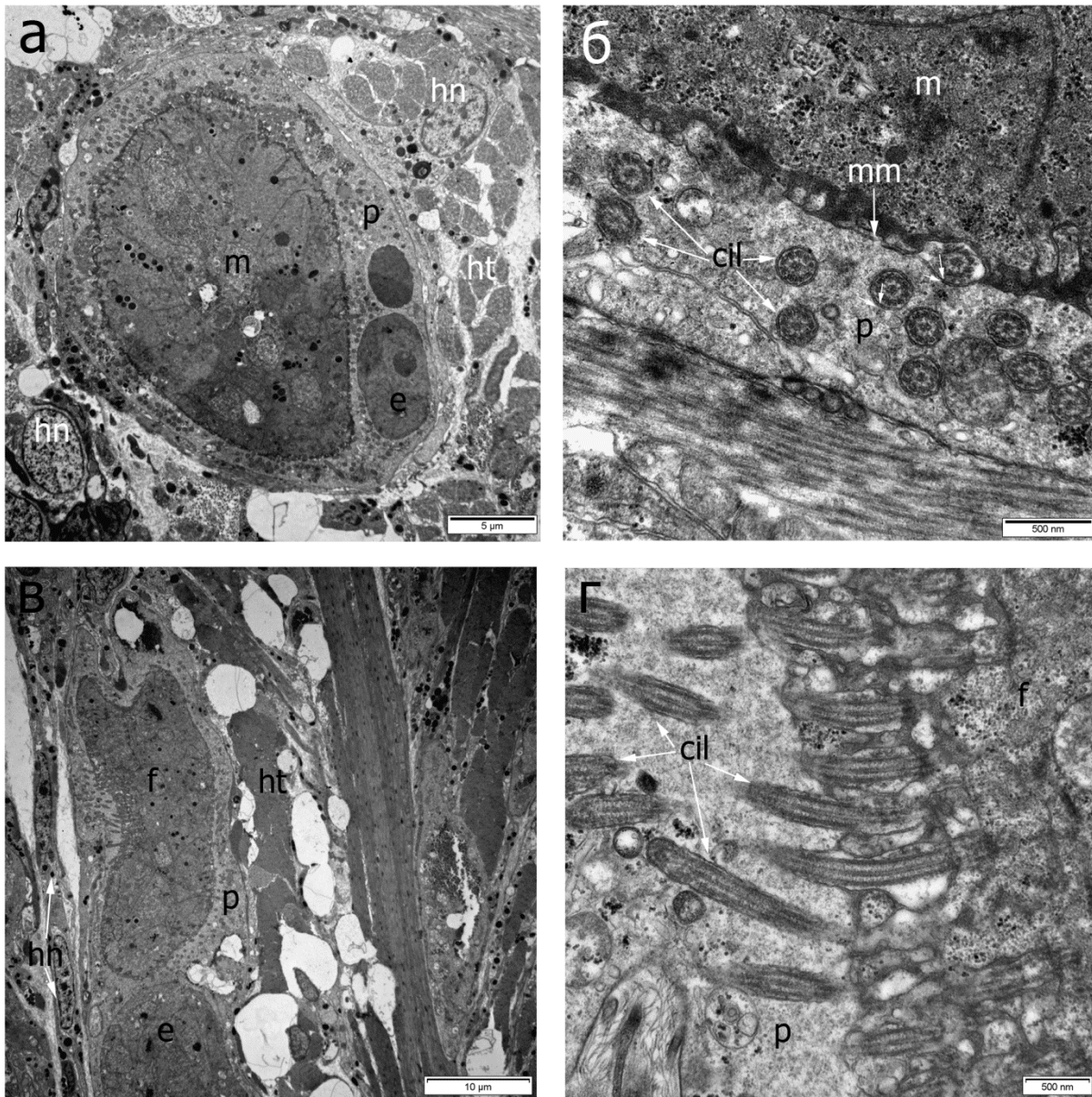


Рис. 16. ТЭМ. а. Мужская половая особь – б. Двойная мембрана и реснички половых особей – в. Женская половая особь – г. Реснички половых особей. р плазмодий; е эмбрион; т самец; mm мембраны самца; f самка; cil реснички; ht ткани хозяина; hn ядро клетки хозяина. Стрелки указывают на две унитарных мембраны, разделяющие цитоплазму плазмодия и цитоплазму клетки половой особи.

Обсуждение

Для объяснения природы плазмодия ортонектид важно понять, каким путем происходит образование паразитической стадии в хозяине. Для этого необходимо поставить жизненный цикл ортонектид в лабораторных условиях. Однако в случае с *Orthonectida* эксперименты по постановке жизненного цикла практически никогда не получались.

За всю историю изучения этой группы исследователями было совершено несколько безуспешных попыток, некоторые из которых были задокументированы (Haloti, Vernet, 1995). Существует единственная статья, авторы которой, работая с ортонектидами вида *Rhopalura ophicomae* и с офиурами *Amphiura squamata* (сейчас *Amphipholis squamata*), в лабораторных условиях не только наблюдали формирование и выход зрелых личинок из тела самки, но и отмечали присутствие видоизмененных личинок на срезах эпителия бурсальных щелей хозяина (Caullery, Lavallee, 1912). Коллери и Лаваль провели эксперимент, делая срезы предположительно зараженных офиур через различные промежутки времени, и достаточно детально реконструировали жизнь паразитической стадии от момента заражения хозяина личинкой до момента формирования в плазмодии зрелых самок и самцов. Однако сами авторы в упомянутой работе отмечают несовершенство своих интерпретаций; кроме того, использованные ими методы просвечивающей микроскопии обладали низкой разрешающей способностью, а результаты эксперимента так и не были подтверждены.

Именно поэтому исследователи, ставящие перед собой задачу воссоздания процесса развития плазмодия, вынуждены оперировать разрозненной информацией, полученной со срезов уже зараженных в природе хозяев. В том числе из-за таких особенностей материала в научном сообществе до сих пор не сформировалось единого мнения относительно природы плазмодия ортонектид.

Наиболее часто в литературе встречаются две точки зрения. Некоторые ученые считают, что плазмодий ортонектид - это организм, паразитирующий в тканях хозяина, и по происхождению представляющий собой производное инфекционных клеток личинки ортонектид (Caullery & Lavallee, 1912; Slyusarev & Miller, 1998). Другие полагают, что плазмодий - это гипертрофированная клетка хозяина, разросшаяся из-за внедрения вышедших из личинки инфекционных паразитических клеток. Последней точки зрения придерживается американский биолог Козлов (Kozloff, 1994; 1997).

Козлов делает предположения относительно природы паразитической стадии ортонектид, опираясь, прежде всего, на данные электронной микроскопии зараженных хозяев. По данным Козлова о виде *Rhopalura ophiocomaе*, паразитирующем на офиурах *Amphipholis squamata*, в цитоплазме плазмодия отсутствуют свободно лежащие ядра (Kozloff, 1994). Именно отсутствие собственных ядер плазмодия является главным аргументом в пользу предположения о том, что плазмодий - это гипертрофированная клетка хозяина. В более поздней работе о плазмодии вида *Ciliocincta sabellariae*, паразитирующем на полихетах *Sabellaria cementarium*, Козлов подтверждает выдвинутую им гипотезу и дополняет ее соображением о том, что увиденные им в цитоплазме плазмодия ядра - это ядра, которые выселились из разрушившихся генеративных клеток или эмбрионов (Kozloff, 1997) (*Схема 1*). Допущения о выселяющихся ядрах нарушают общебиологическую логику и дают основания поставить под сомнение такую модель.

На виде *Intoshia linei* различными методами нами показано несколько ключевых особенностей строения плазмодия ортонектид:

- 1) В цитоплазме плазмодия в большом количестве присутствуют свободно лежащие ядра, сходные с ядрами генеративных клеток, эмбрионов, самок и самцов ортонектид и отличающиеся от ядер хозяина *Lineus ruber*
- 2) Метафазная пластинка ядра плазмодия сходна с метафазной пластинкой ядра эмбриона
- 3) В цитоплазме плазмодия не наблюдается ядер, которые можно было бы трактовать как ядра клетки хозяина
- 4) Плазмодий на всем своем протяжении отделен от клеток хозяина двумя унитарными мембранами, каждая из которых представляет собой липидный бислой

Таким образом, полученные нами результаты позволяют утверждать, что плазмодий ортонектид – не преобразованная клетка хозяина, а самостоятельный организм.

Мы предлагаем возможный сценарий образования паразитической стадии ортонектид, объясняющий ключевые особенности строения плазмодия (см. *Схему 3*, стр. 37).

После внедрения личинки в хозяина клетки, находящиеся внутри нее, оказываются в тканях (1). Клетки делятся (2), образуя дуэты (3), каждый из которых даст плазмодий. Одна из клеток дуэта обрастает другую (4). Цитоплазма внешней клетки — это будущее цитоплазматическое тело плазмодия, в котором будут делиться ядра. Внутренняя клетка — это будущая генеративная клетка. Обрастание одной клетки другой объясняет наличие вокруг генеративных клеток дополнительной мембраны (5- 6). В процессе роста паразитического организма генеративные клетки внутри плазмодия делятся (7- 8), и, претерпевая дробление, дают начало эмбрионам (9-11); делятся и ядра плазмодия (7-11). Плазмодий секретирует дополнительную унитарную мембрану, позволяющую изолировать паразитический организм от агрессивной внутренней среды хозяина (7). Многочисленные ядра плазмодия обеспечивают его жизнедеятельность, а интенсивная работа ЭПР в кортикальной зоне плазмодия делает возможным рост и питание паразитического организма. О трофической активности плазмодия, направленной на поддержание развития эмбрионов, свидетельствуют также многочисленные включения и везикулы в его цитоплазме. Эмбрионы развиваются в половых особей ортонектид, которые покинут хозяина и выйдут для размножения во внешнюю среду.

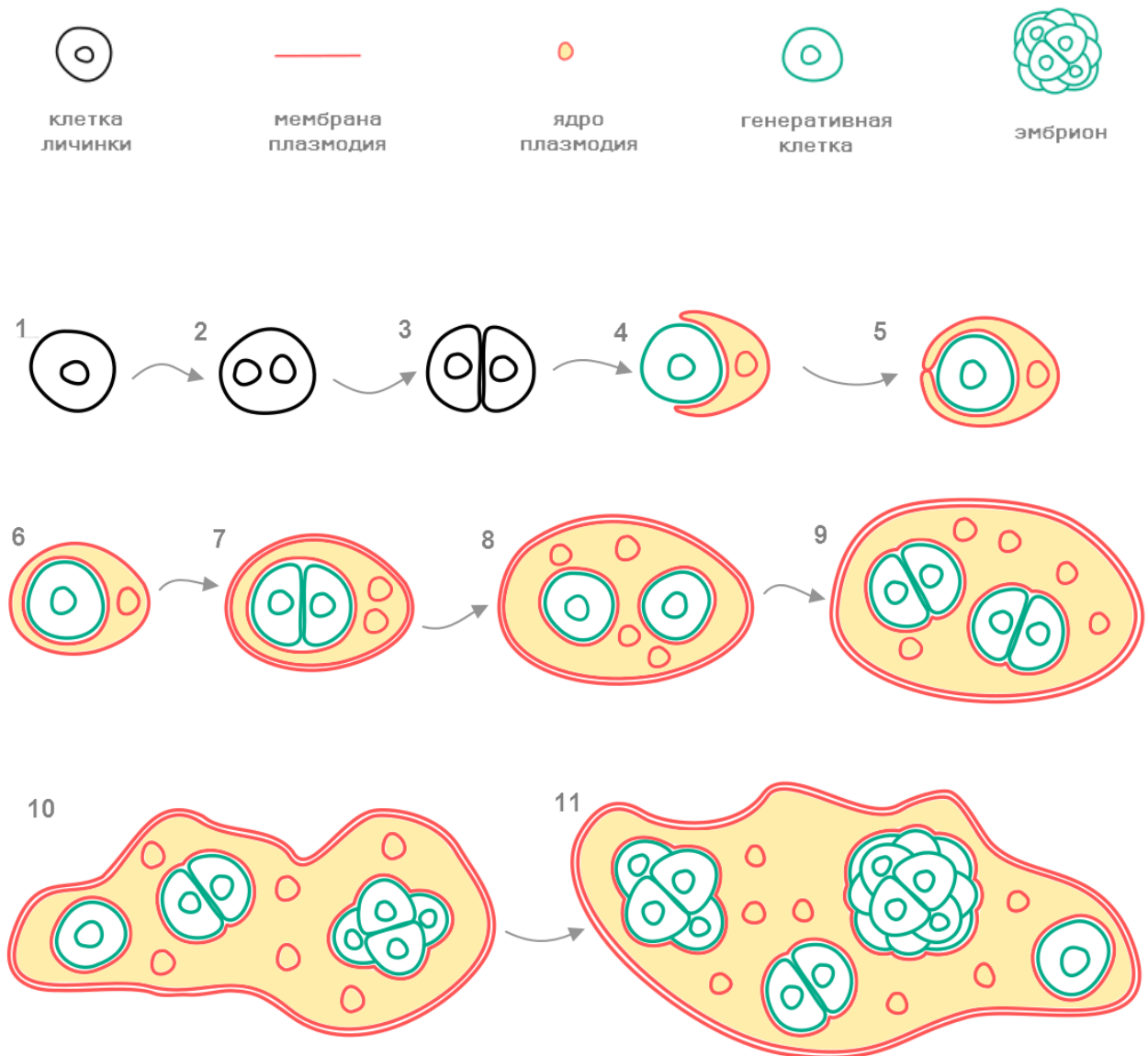


Схема 3. Предложенный сценарий образования плазмодия ортонектид. 1. Клетка личинки в тканях хозяина. 2-3. Деление клетки личинки. 4-6. Обрастание одной клетки личинки другой. 7. Деление ядер внешней клетки с образованием плазмодия. 8-11. Рост плазмодия, деление ядер плазмодия и генеративных клеток, дробление эмбрионов ортонектид в плазмодии. Детали: см. текст. Условные обозначения находятся в верхней части схемы.

Понимание природы и жизнедеятельности паразитической стадии ортонектид дает возможность провести сравнение между плазмодием ортонектид и плазмодиями других организмов, а также уточнить терминологию, которую используют в отношении ортонектид.

Сравнение плазмодия ортонектид с плазмодиями других организмов, одноклеточных и многоклеточных, как свободноживущих, так и паразитических, демонстрирует, что многоядерной паразитической стадии ортонектид присущи особенные черты, которые не характерны ни для одной группы животных, растений или грибов. В цитоплазме плазмодия ортонектид развивается половое поколение, то есть организмы, способные к размножению, ресничному движению и мышечному сокращению, имеющие нервную систему.

Однако можно выделить несколько свойств, сближающих плазмодий ортонектид с иными плазмодиями. Появление отдельных клеток в пределах плазмодия наблюдается у таких групп, как *Harposporida* и *Muxozoa* (Алимов, 2011; Morris, 2012). В жизненном цикле микроспоридий есть этап, на котором многоядерный паразитический плазмодий, называемый споронтом, секретирует на своей поверхности дополнительную мембрану (Overstreet & Weidner, 1974). Наконец, процесс, при котором одна клетка обрастает другую и формирует плазмодий, наблюдается в группе *Muxozoa* (Morris, 2012).

Резюмируя, можно с уверенностью утверждать, что термином “плазмодий” в разных группах организмов обозначаются различные многоядерные тела, для каждого из которых характерно особое строение и развитие. Тем не менее, традиционно с 1875 года “плазмодием” называют многоядерное цитоплазматическое тело, образованное за счет деления ядер и нерасхождения клеток (Merriam-Webster's collegiate dictionary, 2019). Плазмодий ортонектид образуется иначе, а кроме ядер содержит еще и клетки, дробление которых приводит к формированию внутри плазмодия взрослых ортонектид. Поэтому применение термина “плазмодий” по отношению к паразитической стадии ортонектид некорректно.

По этой причине Козлов именовал паразитическую стадию ортонектид матриксом, однако этот термин преокупирован (Kozloff, 1997). На данном этапе исследований мы предлагаем использовать термин “плазмодий ортонектид”.

Выводы

- 1) Плазмодий ортонектид - это стадия жизненного цикла ортонектид, организм, паразитирующий в тканях зараженного хозяина
- 2) Предложена возможная схема образования плазмодия ортонектид, объясняющая ключевые особенности его строения
- 3) Многоядерный паразитический организм, исторически называющийся “плазмодий” ортонектид, по своему строению и способу формирования отличается от аналогичных многоядерных образований других организмов
- 4) Термин “плазмодий” не четко определен и под ним в различных группах живых организмов подразумеваются различные образования, которых объединяет лишь наличие нескольких ядер
- 5) Применение термина “плазмодий” по отношению к паразитической стадии ортонектид некорректно
- 6) На данном этапе исследований мы предлагаем использовать термин “плазмодий ортонектид”

Дальнейшие направления исследований

Предложенная в данной работе модель формирования и жизни паразитической стадии не способна объяснить все тонкости строения плазмодия ортонектид. Для окончательного понимания природы плазмодия ортонектид требуется постановка жизненного цикла в лабораторных условиях. Чтобы расширить представления о том, каким образом обладающие мышечной и нервной системой аннелиды могут на определенной стадии жизненного цикла превращаться в крайне упрощенный паразитический плазмодий, необходимо провести транскриптомный анализ как плазмодия ортонектид, так и половых особей.

Благодарности

Автор выражает благодарность научному руководителю, а также студентам и сотрудникам кафедры зоологии беспозвоночных СПбГУ за всестороннюю поддержку, помощь в сборе и в обработке материала и за ценные советы, благодаря которым работа приняла свой окончательный вид. Автор благодарит сотрудников РЦ СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и РЦ СПбГУ «Микроскопии и микроанализа». Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 16-04-00782 и 19-04-00218.

Список литературы

Merriam-Webster's collegiate dictionary [Electronic resource] // "plasmodium" 2019. URL: <https://www.merriam-webster.com>.

Алимов А.Ф. et al. Protista: Руководство по зоологии. Том 1. СПб: Рос. акад. наук, Зоол. ин-т., 2000.

Алимов А.Ф. et al. Protista: Руководство по зоологии. Том 2. СПб: Рос. акад. наук, Зоол. ин-т., 2007.

Алимов А.Ф. et al. Protista: Руководство по зоологии. Том 3. СПб: Рос. акад. наук, Зоол. ин-т., 2011.

Слюсарев Г.С. Формирование мускулатуры у особей полового поколения *Intoshia variabilis* (Orthonectida). 2003. P. 216–220.

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.

Штейн Г.А. Ортонектиды рода *Rhopalura* Giard некоторых моллюсков Баренцева моря // Уч. зап. Карело-Финского ун-та. 1953. Vol. 5, № 3. P. 171–206.

Adl S.M. et al. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes // J. Eukaryot. Microbiol. 2018. Vol. 66, № 1. P. 12691.

Atkins D. *Rhopalura granosa*, sp. nov., an orthonectid parasite of a lamellibranch, *Heteranomia squamula* L., with a note on its swimming behaviour. // J. Mar. Biol. Assoc. UK. East Carolina University, 1933. Vol. 19, № 1880. P. 233–252.

Beneden V. Recherches sur les Dicyemides, survivants actuels d'un embranchement des Mesozories. // Bull. l'Academie R. Belgique. 1876. Vol. 42. P. 3–111.

Bondarenko N. et al. Comparative analysis of the mitochondrial genomes of Orthonectida: insights into the evolution of an invertebrate parasite species // Mol. Genet. Genomics. Springer Berlin Heidelberg, 2019. Vol. 0, № 0. P. 0.

Caullery M. Classe des Orthonectides (Orthonectida Giard, 1877) // Trait. Zool. Paris Masson & Cie, 1961. Vol. 4, № 1. P. 695–706.

Caullery M., Mesnil F. Sur trois Orthonectides nouveaux, parasites des Annelides, et l'hermaphrodisme de l'une d'eux (*Stoecharthrum* Giardi n. sp.) // Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. 1899. Vol. 128. P. 457–460.

Caullery, M. & Lavallee A. Recherches sur le cycle évolutif des orthonectides. - Les phases initiales dans l'infection expérimentale de l'ophiure, *Amphiura squamata*, par *Rhopalura ophiocomae* Giard // Bull. Sci. la Fr. la Belgique. 1912. Vol. T. 46. P. P. 139-171.

Caullery M., Lavallée A. La Fécondation et le développement des oeufs chez un orthonectide (*Rhopalura ophiocomae*). Gauthier-Villars, 1908.

- Caullery M., Mesnil F. Recherches sur les orthonectides. // Arch. Anat. Microsc. 1901. Vol. 4. P. 381–470.
- El-Matbouli M., Hoffmann R.W. Light and electron microscopic studies on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporean stage in *Tubifex tubifex* // Int. J. Parasitol. Elsevier, 1998. Vol. 28, № 1. P. 195–217.
- EL–Matbouli M., Hoffmann R.W., Mandok C. Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into rainbow trout cartilage // J. Fish Biol. 1995. Vol. 46, № 6. P. 919–935.
- Giard A. Sur les Orthonectida, classe nouvelle d'animaux parasites des Echinodermes et des Turbellaires // CR Acad. Sci. Paris. 1877. Vol. 85. P. 812–814.
- Giard M.A. *On the organization and classification of the Orthonectida* // J. Nat. Hist. Ser. 5. 1879. Vol. 4, № 24. P. 471–473.
- Giard M.A.A. On the Orthonectida, a new class of animals parasitic on Echinodermata and Turbellaria // Ann. Mag. Nat. Hist. Taylor & Francis, 1878. Vol. 1, № 2. P. 181–183.
- Haloti S., Vernet G. The sexual reproduction of *Intoshia linei* (Orthonectida) endoparasite of *Lineus ruber* (heteronemertea) // Invertebr. Reprod. Dev. 1995. Vol. 27, № 1. P. 73–76.
- Horton T. et al. World Register of Marine Species (WoRMS) [Electronic resource]. WoRMS Editorial Board, 2019. URL: <http://www.marinespecies.org>.
- Keferstein W. Beitrage zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte einiger Seeplanarien von St-Malo // Abhandl. Konigl. Gesellsch. Wissensch. Gotttingen. 1869. Vol. 14. P. 3–38.
- Kozloff E.N. The genera of the phylum Orthonectida // Cah. Biol. Mar. 1992. Vol. 33. P. 377–406.
- Kozloff E.N. Morphology of the orthonectid *Ciliocincta sabellariae* // J. Parasitol. JSTOR, 1971. P. 585–597.
- Kozloff E.N. The Structure an (Origin of the Plasmodium of *Rhopalura ophiocomae* (Phylum Orthonectida) // Science (80-.). 1994. Vol. 75, № 3. P. 191–199.
- Kozloff E.N. Studies on the so-called plasmodium of *Ciliocincta sabellariae* (Phylum Orthonectida), with notes on an associated microsporean parasite // Cah. Biol. Mar. 1997. Vol. 38, № 3. P. 151–159.
- Kozloff E.N. Morphology of the Orthonectid *Rhopalura ophiocomae* // J. Parasitol. Allen PressThe American Society of Parasitologists, 1969. Vol. 55, № 1. P. 171.
- MacIntosh W.C. A Monograph of the British Annelids. Part I. The Nemerteans (second installment). Ray Society, 1874. pp. 97-213d p.
- Metschnikoff E. Untersuchungen über Orthonectiden // Zeitschrift für wissenschaftliche Zool. 1881. Vol. 35. P. 282–303.
- Mikhailov K. V. et al. The Genome of *Intoshia linei* Affirms Orthonectids as Highly Simplified Spiralian // Curr. Biol. Cell Press, 2016. Vol. 26, № 13. P. 1768–1774.
- 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 // *Int. J. Parasitol. Australian Society for Parasitology Inc.*, 2012. Vol. 42, № 9. P. 829–840.
- Muller O.F. *Vermium terrestrium et fluviatilium, ect. 2.* Copenhagen, 1774.
- Nakano H., Miyazawa H. A New Species of Orthonectida That Parasitizes *Xenoturbella bocki* : Implications for Studies on *Xenoturbella* // *Biol. Bull.* 2018. Vol. 236, № 1. P. 66–73.
- Okamura B. et al. *Myxozoan Evolution , Ecology and.* 2015. 440 p.
- Overstreet R.M., Weidner E. Differentiation of microsporidian spore-tails in *Inodosporus spraguei* Gen. et Sp. N. // *Zeitschrift für Parasitenkd.* 1974. Vol. 44, № 3. P. 169–186.
- Pawlowski J. et al. Origin of the mesozoa inferred from 18S rRNA gene sequences // *Mol. Biol. Evol.* 1996. Vol. 13, № 8. P. 1128–1132.
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. Vol. 17, № 1. P. 208–212.
- Schiffer P.H., Robertson H.E., Telford M.J. Orthonectids Are Highly Degenerate Annelid Worms // *Curr. Biol. Elsevier Ltd.*, 2018. Vol. 28, № 12. P. 1970-1974.e3.
- Slyusarev G.S., Miller D.M. Fine Structure of the Mature Plasmodium of *Intoshia variabilis* (Phylum Orthonectida), a Parasite of the Platyhelminth *Macrorhynchus crocea* // *Acta Zool.* 1998. Vol. 79, № 4. P. 319–327.
- Slyusarev G.S. The fine structure of the muscle system in the female of the orthonectid *Intoshia variabilis* (Orthonectida) // *Acta Zool.* 2003. Vol. 84, № 2. P. 107–111.
- Slyusarev G.S. Fine Structure of the Female *Intoshia variabilis*(Alexandrov & Slyusarev) (Mesozoa: Orthonectida) // *Acta Zool.* 1994. Vol. 75, № 4. P. 311–321.
- Slyusarev G.S. Fine structure and function of the genital pore of the female of *Intoshia variabilis* (Orthonectida) // *Folia Parasitol. (Praha).* 2004. Vol. 51, № 4. P. 287–290.
- Slyusarev G.S. Fine structure and development of the cuticle of *Intoshia variabilis* (Orthonectida) // *Acta Zool.* 2000. Vol. 81, № 1. P. 1–8.
- Slyusarev G.S., Starunov V. V. The structure of the muscular and nervous systems of the female *Intoshia linei* (Orthonectida) // *Org. Divers. Evol.* 2016. Vol. 16, № 1. P. 65–71.
- Stunkard H.W. The Life-History and Systematic Relations of the Mesozoa // *Q. Rev. Biol.* 2004. Vol. 29, № 3. P. 230–2