

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ТРОФОЗОИТОВ *PLASMODIUM FALCIPARUM* И ИНФИЦИРОВАННЫХ ИМИ ТКАНЕЙ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМЕ ТРОПИЧЕСКОЙ МАЛЯРИИ

А. И. Соловьев¹, В. А. Капацина², М. О. Соколова¹, А. Р. Ариуков^{1✉}, А. Н. Коваленко¹, А. Н. Усков³, В. А. Романенко¹

¹ Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

² Клиническая инфекционная больница имени С. П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия

³ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Представлены результаты комплексного электронно-микроскопического исследования образцов венозной крови и тканей внутренних органов, полученных при изучении летального случая завозной тропической малярии. Целью работы было изучить ультраструктуру эритроцитарных стадий развития *Plasmodium falciparum* и изменений пораженных ими тканей при тяжелой форме тропической малярии. Образцы венозной крови, тканей коры головного мозга и миокарда исследовали с помощью световой, а также электронной (сканирующей и трансмиссионной) микроскопии. В крови были выявлены многочисленные трофозоиты *Plasmodium falciparum*. В цитоплазме инфицированных эритроцитов обнаружены множественные расщелины Маурера. Между инфицированными и непораженными эритроцитами выявлены патологические межклеточные контакты, что приводит к их слипанию и формированию розеток (эритроцитарный розеттинг). При исследовании тканей коры головного мозга и миокарда в просвете капилляров отмечена фиксация пораженных эритроцитов на эндотелии (эритроцитарная адгезия). Розеттинг и адгезия эритроцитов приводят к тромбированию капилляров, нарушению микроциркуляции и возникновению секвестров в тканях жизненно важных органов (паразитарная секвестрация). Выявленные морфологические особенности возбудителей тропической малярии и пораженных ими тканей определяют способность паразитов менять свойства клеточных мембран инфицированных эритроцитов, что приводит к формированию патологических межклеточных контактов и служит одним из основных механизмов вирулентности *Plasmodium falciparum*.

Ключевые слова: тропическая малярия, *Plasmodium falciparum*, вирулентность, эритроцитарный розеттинг, эритроцитарная адгезия, паразитарная секвестрация, PfEMP1, электронная микроскопия

Вклад авторов: А. И. Соловьев — концепция, научное обоснование, организация всех видов исследований, анализ результатов, написание статьи; В. А. Капацина — сбор материала, практическое консультирование; М. О. Соколова, А. Р. Ариуков — пробоподготовка, проведение световой микроскопии, анализ результатов, написание текста статьи; А. Н. Коваленко — практическое обоснование, организация сбора материала, редактирование рукописи; А. Н. Усков — концепция, научное консультирование; В. А. Романенко — пробоподготовка, проведение световой микроскопии, анализ результатов.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Военно-медицинской академии имени С. М. Кирова (протокол № 285 от 21 ноября 2023 г.), проведено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих изменений.

✉ **Для корреспонденции:** Артем Русланович Ариуков
ул. Академика Лебедева, д. 6, г. Санкт-Петербург, 194044, Россия; arukov.artem@yandex.ru

Статья получена: 31.05.2024 **Статья принята к печати:** 26.06.2024 **Опубликована онлайн:** 29.06.2024

DOI: 10.47183/mes.2024.034

ELECTRON MICROSCOPY OF THE *PLASMODIUM FALCIPARUM* TROPHOZOITES AND THE TISSUES THESE HAVE INFECTED IN SEVERE TROPICAL MALARIA

Solovov AI¹, Kapacina VA², Sokolova MO¹, Ariukov AR^{1✉}, Kovalenko AN¹, Uskov AN³, Romanenko VA¹

¹ Kirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg, Russia

² Botkin Clinical Infectious Diseases Hospital, Saint-Petersburg, Russia

³ Children's Research and Clinical Center for Infectious Diseases of the Federal Medical Biological Agency, Saint-Petersburg, Russia

The paper provides the results of the comprehensive electron microscopic examination of the venous blood and internal organ tissue samples obtained when studying the imported case of tropical malaria. The study was aimed to assess the fine structure of the erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* and alterations of the affected tissues in severe tropical malaria. The venous blood, cerebral cortical tissue and myocardial samples were examined by light microscopy and electron (scanning and transmission) microscopy. Numerous *Plasmodium falciparum* trophozoites were found in blood. Multiple Maurer's clefts were found in the cytoplasm of the infected erythrocytes. Abnormal intercellular contacts between the infected and unaffected erythrocytes were revealed, which resulted in their adhesion and rosette formation (erythrocyte rosetting/e-rosetting). When studying cortical tissue and myocardial samples, fixation of the affected erythrocytes on the endothelium (erythrocyte adhesion) was noted in the capillary lumen. Rosetting and erythrocyte adhesion lead to capillary thrombosis, disruption of microcirculation and sequestration of tissues in vital organs (parasite sequestration). The identified morphological features of the pathogens causing tropical malaria and the affected tissues determine the parasites' capability of changing properties of the infected erythrocytes' cell membranes, which leads to formation of abnormal intercellular contacts and constitutes one of the main mechanisms underlying the *Plasmodium falciparum* virulence.

Keywords: tropical malaria, *Plasmodium falciparum*, virulence, E-rosetting, erythrocyte adhesion, parasite sequestration, PfEMP1, electron microscopy

Author contribution: Solovov AI — concept, scientific justification, organization of all types of tests, analysis of the results, manuscript writing; Kapacina VA — data acquisition, practical advising; Sokolova MO, Ariukov AR — sample preparation, light microscopy, analysis of the results, manuscript writing; Kovalenko AN — practical justification, organization of data acquisition, manuscript editing; Uskov AN — concept, scientific advising; Romanenko VA — sample preparation, light microscopy, analysis of the results.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Kirov Military Medical Academy (protocol No. 285 dated 21 November 2023) and conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (1964) and its subsequent updates.

✉ **Correspondence should be addressed:** Artem R. Ariukov
Akademika Lebedeva, 6, Saint-Petersburg, 194044, Russia; arukov.artem@yandex.ru

Received: 31.05.2024 **Accepted:** 26.06.2024 **Published online:** 29.06.2024

DOI: 10.47183/mes.2024.034

Тропическая малярия (ТМ) представляет серьезную проблему для тропического и субтропического регионов, несмотря на усилия мирового сообщества, направленные на снижение заболеваемости и прекращение передачи возбудителей этой инфекции *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897) их переносчиками комарами рода *Anopheles* (Meigen, 1818). Коварство заболевания зачастую связано с постепенным началом, а затем стремительным злокачественным развитием, моментально переходящим в фазу непоправимых фатальных осложнений даже на фоне приема противомаларийных препаратов. Маларийная кома, алгид, острая почечная недостаточность, инфекционно-токсический шок (ИТШ) и гемоглинурийная лихорадка могут приводить к гибели неиммунных лиц, заразившихся ТМ при посещении эндемичных регионов [1].

В основе патогенеза тяжелых форм ТМ лежат процессы розеттинга (формирование конгломератов инфицированных эритроцитов с непораженными) и адгезии инфицированных эритроцитов к эндотелию капилляров [2]. Это приводит к тромбозу мелких сосудов и секвестрации тканей жизненно важных органов, особенно головного мозга. Молекулярно-генетические механизмы патогенеза ТМ связаны с выделением возбудителями многочисленных белков (MAHRP1,2, REX3, HSP40, KAHRP и др.). Наиболее важным экспортируемым семейством белков является PfEMP1 (эритроцитарный мембранный белок — главный фактор вирулентности *P. falciparum*), который обнаруживается на поверхности инфицированной клетки [3, 4]. Транспортировка паразитарных белков обеспечивается расщелинами Маурера, которые определяют как выпячивания мембраны паразитофорной вакуоли и представляют собой высокомолекулярные структуры [5, 6]. На начальных этапах развития паразитов они быстро перемещаются, участвуя в транспортировке PfEMP1 на поверхность эритроцитов. Главный фактор вирулентности плазмодиев обладает повышенным сродством к основным клеточным рецепторам, таким как ICAM-1 (от англ. intercellular adhesion molecule-1), CD36, CR и др. [7, 8]. Специфичное связывание PfEMP1 с клеточными рецепторами приводит к формированию патологических контактов инфицированных эритроцитов со здоровыми клетками, что приводит к явлениям розеттинга, адгезии и секвестрации [9].

Световая микроскопия остается основным методом изучения паразитов в крови и других тканях восприимчивого организма. Однако этот метод не обеспечивает возможность исследования ультраструктуры микроорганизмов и клеточных механизмов, лежащих в основе патогенеза злокачественного течения малярии. Высокая разрешающая способность электронного микроскопа значительно расширяет возможности для исследования взаимодействия маларийных паразитов с клетками крови и других тканей организма. Сложность пробоподготовки, трудоемкость, значительные временные затраты, а также высокие требования к качеству исследуемых образцов существенно ограничивают применение электронной микроскопии для исследования клинического материала [10]. Этому способствует также короткая продолжительность развития эритроцитарных форм *P. falciparum*, аккумуляция пораженных эритроцитов в капиллярном русле, низкий уровень паразитемии, а также быстрая утрата морфологических признаков паразитов и инфицированных ими эритроцитов [11]. В связи с этим для электронно-микроскопических исследований преимущественно используют образцы, полученные при искусственном культивировании стандартных

лабораторных штаммов плазмодиев, зачастую низко вирулентных или вовсе непатогенных для человека [12]. Данные об ультраструктурных патоморфологических изменениях в организме больных малярией встречаются редко. В связи с этим представляем результаты комплексного исследования с помощью электронной микроскопии материала, полученного от пациента, погибшего от осложненной тропической малярии.

Цель исследования — изучить ультраструктуру эритроцитарных стадий развития *P. falciparum*, а также оценить ультраморфологические изменения пораженных тканей при исследовании клинического материала, полученного от больного тропической малярией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили прижизненные пробы венозной крови, взятой в диагностических целях, а также материал, полученный в ходе последующего патологоанатомического исследования головного мозга, сердца, почек пациента, погибшего от осложненной тропической малярии.

Световая микроскопия

Препараты крови готовили в соответствии с общепринятой методикой и окрашивали по Романовскому-Гимзе [13].

Материал, полученный при аутопсии, фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном формалине. Затем пробы обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, заливали в парафин (ООО «Биовитрум»; Россия). Срезы тканей толщиной 5 мкм, сделанные с парафиновых блоков, окрашивали гематоксилином и эозином (ООО «Биовитрум»; Россия). Для исследования использовали световой микроскоп Axiolmager A2 (Carl Zeiss; Германия).

Сканирующая электронная микроскопия

Пробы венозной крови фиксировали в 2,5%-м глutarовом альдегиде на фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH 7,2–7,4, в течение суток. В дальнейшем форменные элементы отмывали от фиксатора путем трехкратного добавления ФСБ с последующим центрифугированием и удалением надосадочной жидкости. Объем взвеси форменных элементов доводили до 5% от объема пробы, полученный материал ресуспендировали, наносили на предметные стекла. После высыхания препараты пропитывали 2%-м тетроксидом осмия (оксид осмия (VIII)) в течение 30 мин, затем последовательно обезвоживали в этиловых спиртах восходящей концентрации (30°, 50°, 70°, 80°, 96°) и высушивали на воздухе. Для обеспечения сканирующего эффекта материал обрабатывали сплавом золота с палладием (Au/Pd (60 : 40)). Напыление слоя толщиной 5 нм проводили при помощи установки Q150T ES (Quorum; Германия). Готовые препараты исследовали в сканирующем режиме с использованием электронного микроскопа Merlin (Carl Zeiss; Германия), оснащенного детектором вторичных электронов SE2.

Срезы тканей внутренних органов толщиной 5 мкм переносили на предметные стекла, депарафинировали посредством трехкратной обработки ксилолом (АО «Экос-1»; Россия) в течение 3 суток, затем пропитывали 2%-м тетроксидом осмия (Serva; Германия). Напыление сканирующего слоя и исследование готовых препаратов проводили вышеописанным способом.

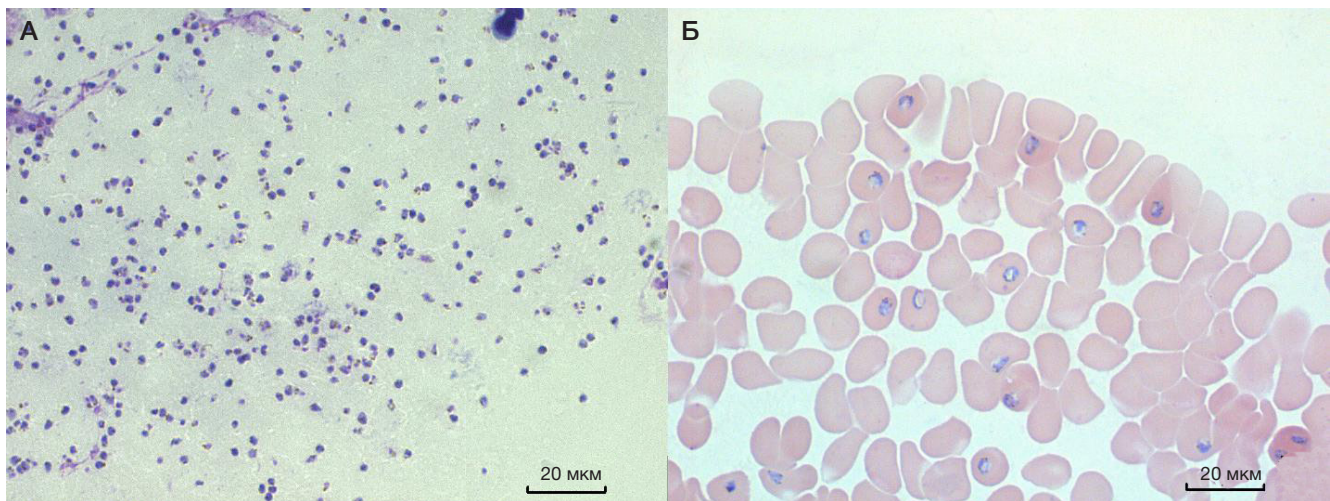


Рис. 1. Юные (кольцевидные) трофозоиты *P. falciparum* в препаратах крови «толстая капля» (А); «тонкий мазок» (Б). Окраска по Романовскому–Гимзе, световая микроскопия (×1000)

Трансмиссионная электронная микроскопия

Подготовку проб венозной крови и тканей внутренних органов проводили по стандартным методикам. Подготовленные образцы заливали в блоки, в качестве встраиваемой среды использовали пластифицированную смолу Аралдит (EMS; США). Срезы блоков толщиной 100 нм подвергали двойному контрастированию цитратом свинца и 1%-м водным раствором уранил ацетата (Serva; Германия). Готовые препараты исследовали в трансмиссионном режиме с помощью электронного микроскопа Merlin (Carl Zeiss; Германия) с использованием детектора STEM. Снимки, полученные с препаратов, анализировали в программе для анализа и обработки фотографий ImageJ (NIH; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациентка И., 44 лет, жительница Санкт-Петербурга, была инфицирована возбудителями тропической малярии при кратковременном посещении высокоэндемичного тропического региона. Химиопрофилактику от малярии не получала. Через неделю после возвращения из поездки почувствовала недомогание, повысилась температура тела. Состояние прогрессивно ухудшалось. Госпитализирована в инфекционный стационар на пятые сутки заболевания. На основании клинических проявлений и эпидемиологического анамнеза в приемном отделении проведено паразитологическое исследование препаратов крови, выявлены *P. falciparum*. Безотлагательно начато противомаларийное лечение, несмотря на это через 13 ч внезапно наступила смерть пациентки. Непосредственной причиной смерти послужили инфекционно-токсический шок и отек — набухание головного мозга, т. е. известные осложнения злокачественного течения тропической малярии.

В ходе исследования препаратов крови «толстая капля» и «тонкий мазок» в каждом поле зрения выявлялось множество юных кольцевидных трофозоитов *P. falciparum*. Уровень паразитемии превышал 50 000 клеток в 1 мкл крови (рис. 1).

На фотографиях, полученных при проведении электронной сканирующей микроскопии препаратов периферической крови, отмечено большое количество деформированных эритроцитов, утративших характерную двояковогнутую форму. Пораженные эритроциты

имеют бугристую поверхность, повторяющую очертания развивающихся в них паразитов. Оболочка инфицированных эритроцитов теряет эластичность, становится неровной за счет встраивания в нее паразитарных белков. Между пораженными эритроцитами формируются межклеточные контакты. Это связано со специфическим взаимодействием встроенных в оболочку пораженных эритроцитов белков главного фактора вирулентности *P. falciparum* с клеточными рецепторами соседних клеток. Этот же механизм лежит в основе явления «розеттинга», сопровождающегося формированием конгломератов, состоящих из инфицированных и здоровых клеток крови. Предполагается, что, окружая себя неповрежденными клетками, паразиты избегают тем самым воздействия факторов клеточного иммунитета (рис. 2).

По данным литературы, форма инфицированных эритроцитов становится ригидной, а белки, ответственные за ригидность, напрямую связаны с вирулентностью, что дополнительно свидетельствует о влиянии секретома на тяжесть течения инфекции [14]. Деформация эритроцитов происходит в результате формирования крупных выступов над трофозоитами. Именно здесь локализованы области цитоплазматической мембраны, несущие белки адгезии паразита *PfEMP1* [15].

С помощью трансмиссионной электронной микроскопии в препаратах крови исследовали ультраструктуру паразитарных клеток и пораженных ими эритроцитов (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обзорные произвольные срезы препаратов венозной крови показали наличие внутри эритроцитов трофозоитов *P. falciparum*, окруженных мембраной паразитофорной вакуоли. Ядра паразитов имеют аморфную структуру, хроматин не конденсирован, ядерная оболочка имеет нечеткие контуры, что служит признаками начинающейся шизогонии, сопровождающейся асинхронными последовательными циклами репликации [16]. Конкретные механизмы множественного деления у *P. falciparum* до конца не известны. Установлено, что процессы в клетках плазмодиев существенно отличаются от размножения других эукариот [17]. Пищеварительные вакуоли заполнены электронно-плотным веществом, схожим с гемоглобином. Известно, что в пищеварительных вакуолях (модифицированные лизосомы) паразитов накапливается

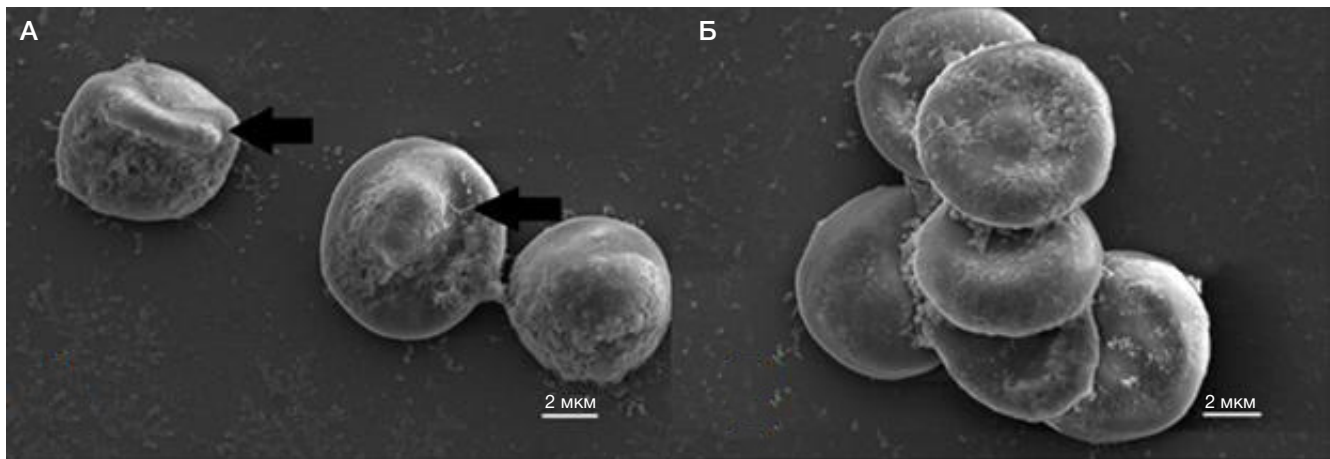


Рис. 2. Электронная сканирующая микроскопия препаратов крови. **А.** Деформация цитоплазматической мембраны эритроцита над трофозоитом (стрелка). **Б.** «Розеттинг» — формирование конгломерата инфицированных и непораженных эритроцитов

гемозоин, продукт метаболизма гемоглобина, поглощаемого *P. falciparum* [18]. В цитоплазме трофозоитов выявляется множество свободных рибосом, указывающих на активный синтез паразитами специфических белков, необходимых для обеспечения его мембранных и экзо- и эндо-мембранных систем. Цитоплазма инфицированных

эритроцитов имеет рыхлую мелкозернистую структуру, мембрана утрачивает четкие контуры. Внутри эритроцитов отчетливо определялись тубуловезикулярные структуры с электронно-плотными стенками и электронно-прозрачным содержимым — расщелины Маурера. Расщелины Маурера появляются уже на ранних стадиях развития паразитов и

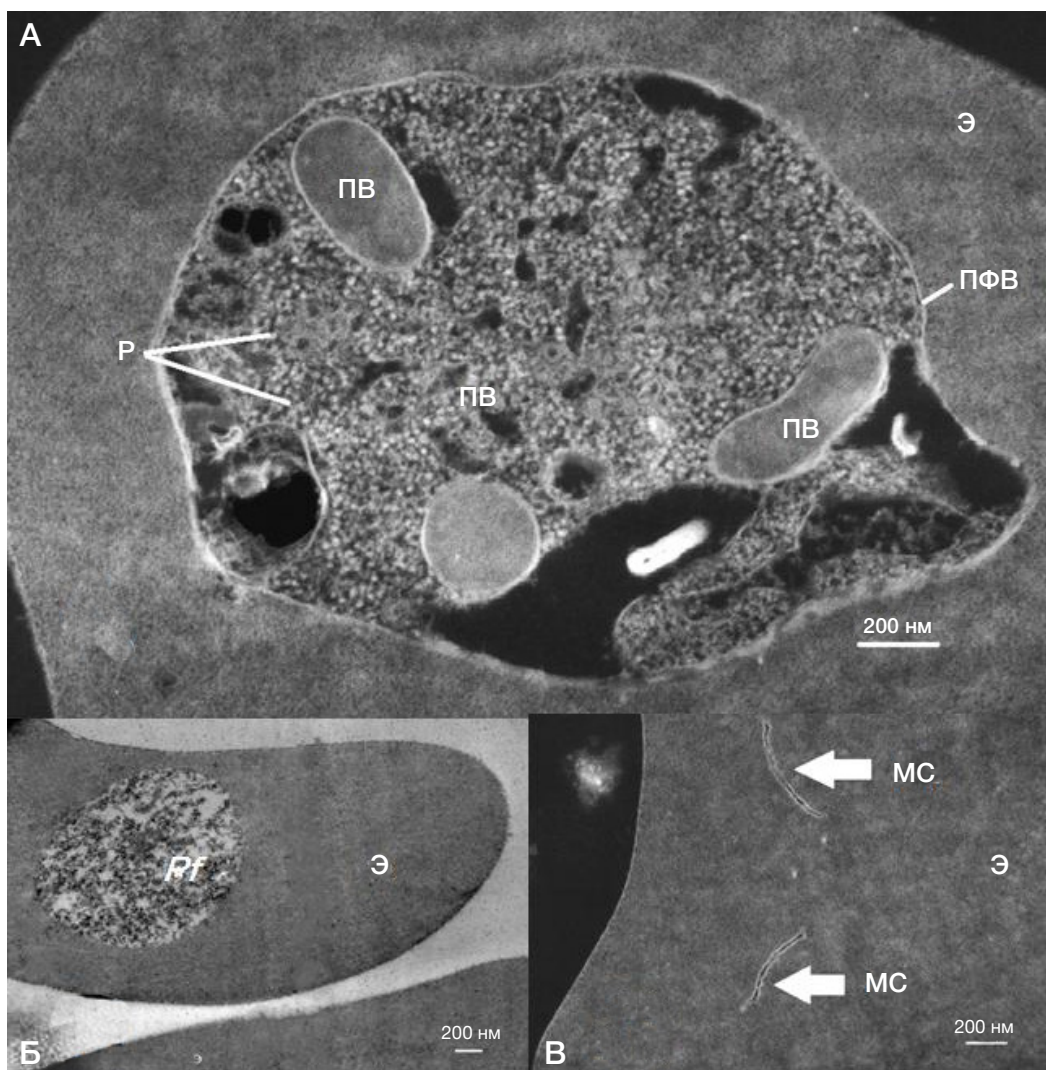


Рис. 3. Трансмиссионная электронная микроскопия: инверсионная (**А**, **В**), прямая (**Б**). Произвольные срезы трофозоитов *P. falciparum*, расположенных внутри эритроцитов. Э — эритроцит; Pf — *P. falciparum*; ПВ — пищеварительная вакуоль; ПФВ — паразитофорная вакуоль; Р — рибосомы; МС — расщелины Маурера в цитоплазме инфицированного эритроцита

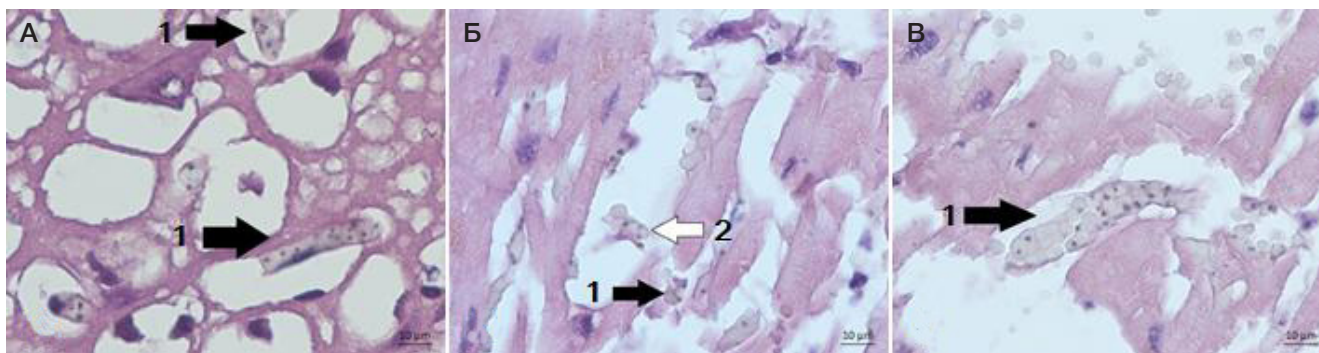


Рис. 4. Световая микроскопия аутопсийного материала (окрашивание гематоксилином и эозином, увеличение $\times 1000$): кора головного мозга (А); миокард (Б, В). 1 — «розеттинг» в просвете мелких капилляров; 2 — адгезия розеток эритроцитов, инфицированных *P. falciparum* к стенке капилляра

состоят из отростков и завитков, отходящих от мембраны паразитофорной вакуоли, созревая с образованием функционально независимых структур, прикрепленных к цитоплазматической мембране эритроцитов [19].

При исследовании тканей миокарда и коры головного мозга выявляются признаки облитерации просветов капилляров розетками инфицированных эритроцитов, адгезированных на эндотелии. Эритроциты в розетках сохраняют вид отдельных клеток, стенки их отчетливо различимы (рис. 4).

При изучении срезов тканей головного мозга и миокарда с помощью сканирующей электронной микроскопии выявляется множественная адгезия эритроцитов на поверхности эндотелия кровеносных капилляров. Инфицированные и непораженные эритроциты деформированы, образуют розетки, среди них присутствуют клетки сферической формы. Это, вероятно, связано с изменением структуры цитоплазматической мембраны эритроцитов вследствие встраивания в нее паразитарных белков. Известно, что сфероцит можно рассматривать как предгемолитическую стадию эритроцита [20]. Вероятно, в процессе изменения структуры эритроцитарной мембраны нарушается ее проницаемость, однако в какой стадии жизненного цикла *P. falciparum* это происходит, остается невыясненным (рис. 5).

Среди эритроцитов, организованных в розетки на поверхности эндотелиальных клеток, обращает на себя внимание отсутствие волокон фибрина, в норме являющегося ключевым участником в формировании тромба. Отсутствие фибриновых масс, наблюдаемое в зонах

слипания эритроцитов, указывает на различия механизмов тромбообразования при ТМ и в процессе свертывания крови. Доказано, что конгломерация эритроцитов в розетки и их адгезия на эндотелии капилляров обусловлена патологическим взаимодействием паразитарных белков с клеточными рецепторами эритроцитов и эндотелиоцитов [21]. Подтверждением ведущей роли патологического межклеточного взаимодействия в патогенезе злокачественной тропической малярии служит выявление тесных межклеточных контактов между мембранами эритроцитов, формирующих розетки в капиллярах головного мозга. Особую значимость при этом имеют извитые каналы расщелин Мауэра, расположенные в зоне прилегания паразита к мембране пораженного эритроцита (рис. 6).

ВЫВОДЫ

В работе представлены результаты морфологического исследования эритроцитов венозной крови, тканей миокарда и головного мозга при тяжелой форме тропической малярии. Анализ результатов изучения ультраструктурных изменений *P. falciparum* и эритроцитов в процессе эритроцитарной шизогонии плазмодиев подтверждает наличие сложных молекулярно-генетических и клеточных механизмов патологического влияния паразитов на клетки хозяина. Результатом такого взаимодействия служат изменения поверхностной архитектуры цитоплазматической мембраны инфицированных эритроцитов, формирование конгломератов эритроцитов, их адгезии на эндотелии

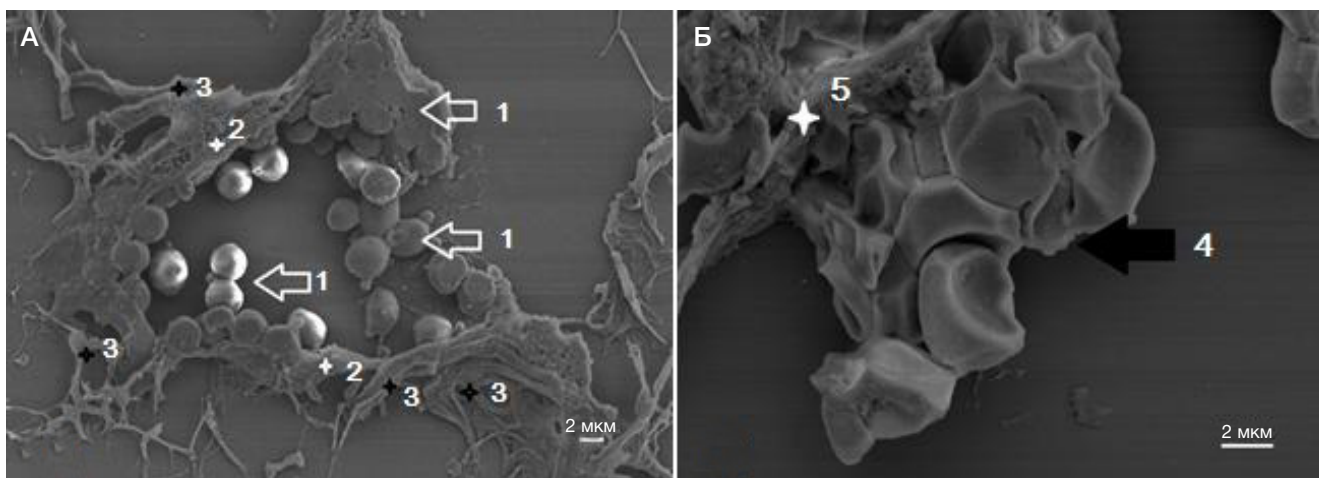


Рис. 5. Сканирующая электронная микроскопия срезов миокарда (А) и коры головного мозга (Б). 1 — адгезия сферических эритроцитов к мембране эндотелиальных клеток; 2 — эндотелиальные клетки; 3 — волокна рыхлой волокнистой соединительной ткани по периферии капилляра; 4 — «розеттинг» в просвете капилляра; 5 — эндотелий капилляра

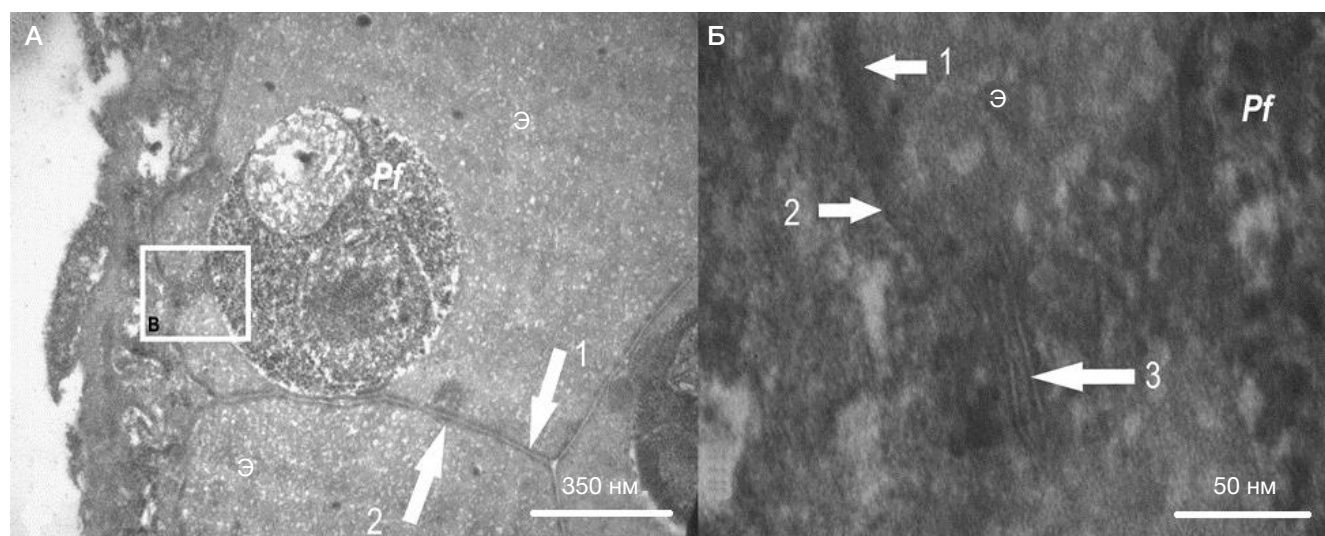


Рис. 6. Трансмиссионная электронная микроскопия тканей головного мозга. **А.** Срез зрелого трофозоида *P. falciparum* (Pf) внутри эритроцита (Э), фиксированного на поверхности эндотелия капилляров. **Б.** Система патологических внутренних мембран инфицированного эритроцита. 1 — оболочка инфицированного эритроцита; 2 — оболочка соседнего эритроцита; 3 — каналы расщелины Мауэра, расположенные между мембраной паразитофорной вакуоли и оболочкой пораженного эритроцита

капилляров миокарда и коры головного мозга. Наблюдаемые изменения приводят к нарушению микроциркуляции в тканях жизненно важных органов. Выявленные ультраструктурные изменения подтверждают способность паразитов менять свойства клеточных

мембран инфицированных эритроцитов, что приводит к формированию патологических межклеточных контактов и служит одним из основных механизмов вирулентности *P. falciparum*, определяющих злокачественное течение тропической малярии.

Литература

1. Venkatesan P. The 2023 WHO World malaria report. The Lancet Microbe. 2024.
2. Lee WC, Russell B, Rénia L. Evolving perspectives on rosetting in malaria. Trends in Parasitology. 2022; 38 (10): 882–9.
3. Abdi A, Yu L, Goulding D, Rono MK, Bejon P, Choudhary J, et al. Proteomic analysis of extracellular vesicles from a *Plasmodium falciparum* Kenyan clinical isolate defines a core parasite secretome. Wellcome open research. 2017; 2.
4. Heiber A, Kruse F, Pick C, Grüning C, Flemming S, Oberli A, et al. Identification of new PNEPs indicates a substantial non-PEXEL exportome and underpins common features in *Plasmodium falciparum* protein export. PLoS pathogens. 2013; 9 (8): e1003546.
5. McHugh E, Carmo OM, Blanch A, Looker O, Liu B, Tiash S, et al. Role of *Plasmodium falciparum* protein GEXP07 in Maurer's cleft morphology, knob architecture, and *P. falciparum* EMP1 trafficking. MBio. 2020; 11 (2): 10–1128.
6. Yadavalli R, Peterson JW, Drazba JA, Sam-Yellowe TY. Trafficking and Association of *Plasmodium falciparum* MC-2TM with the Maurer's Clefts. Pathogens. 2021; 10 (4): 431.
7. Ortolan LS, Avril M, Xue J, Seydel KB, Zheng Y, Smith JD. *Plasmodium falciparum* parasite lines expressing DC8 and Group A PfEMP1 bind to brain, intestinal, and kidney endothelial cells. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2022; 12: 813011.
8. Jensen AR, Adams Y, Hviid L. Cerebral *Plasmodium falciparum* malaria: The role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it. Immunological reviews. 2020; 293 (1): 230–52.
9. Juillerat A, Lewit-Bentley A, Guillotte M, Gangnard S, Hessel A, Baron B, et al. Structure of a *Plasmodium falciparum* PfEMP1 rosetting domain reveals a role for the N-terminal segment in heparin-mediated rosette inhibition. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011; 108 (13): 5243–8.
10. Mwenda MC, Fola AA, Ciubotariu II, Mulube C, Mambwe B, Kasaro R, et al. Performance evaluation of RDT, light microscopy, and PET-PCR for detecting *Plasmodium falciparum* malaria infections in the 2018 Zambia National Malaria Indicator Survey. Malaria Journal. 2021; 20: 1–10.
11. Soulard V, Bosson-Vanga H, Lorthiois A, Roucher C, Franetich JF, Zanghi G, et al. *Plasmodium falciparum* full life cycle and *Plasmodium ovale* liver stages in humanized mice. Nature communications. 2015; 6 (1): 1–9.
12. Liffner B, Diaz AKC, Blauwkamp J, Anaguano D, Frolich S, Muralidharan V, et al. Atlas of *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic development using expansion microscopy. Elife. 2023; 12: RP88088.
13. Лабораторная диагностика малярии и бабезиозов: Методические указания. М.: ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора, 2015; 43 с.
14. Боровская М. К., Кузнецова Э. Э., Горохова В. Г., Корякина Л. Б., Курильская Т. Е., Пивоваров Ю. И. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза. Acta Biomedica Scientifica. 2010; 3 (73): 334–54.
15. Melcher M, Muhle RA, Henrich PP, Kraemer SM, Avril M, Vigan-Womas I, et al. Identification of a role for the PfEMP1 semiconserved head structure in protein trafficking to the surface of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. Cellular microbiology. 2010; 12 (10): 1446–62.
16. Kilian N, Zhang Y, LaMonica L, Hooker G, Toomre D, Mamoun CB, et al. Palmitoylated Proteins in *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes: Investigation with Click Chemistry and Metabolic Labeling. BioEssays. 2020; 42 (6): 1900145.
17. McDonald J, Merrick CJ. DNA replication dynamics during erythrocytic schizogony in the malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium knowlesi*. PLoS Pathogens. 2022; 18 (6): e1010595.
18. Ostera G, Tokumasu F, Oliveira F, Sa J, Furuya T, Teixeira C, Dvorak J. *Plasmodium falciparum*: food vacuole localization of nitric oxide-derived species in intraerythrocytic stages of the malaria parasite. Experimental parasitology. 2008; 120 (1): 29–38.

19. Mundwiler-Pachlatko E, Beck HP. Maurer's clefts, the enigma of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013; 110 (50): 19987–94.
20. Nigra AD, Casale CH, Santander VS. Human erythrocytes: cytoskeleton and its origin. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2020; 77: 1681–94.
21. Avril M, Bernabeu M, Benjamin M, Brazier AJ, Smith JD. Interaction between endothelial protein C receptor and intercellular adhesion molecule 1 to mediate binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to endothelial cells. *MBio*. 2016; 7 (4): 10–1128.

References

1. Venkatesan P. The 2023 WHO World malaria report. *The Lancet Microbe*. 2024.
2. Lee WC, Russell B, Rénia L. Evolving perspectives on rosetting in malaria. *Trends in Parasitology*. 2022; 38 (10): 882–9.
3. Abdi A, Yu L, Goulding D, Rono MK, Bejon P, Choudhary J, et al. Proteomic analysis of extracellular vesicles from a *Plasmodium falciparum* Kenyan clinical isolate defines a core parasite secretome. *Wellcome open research*. 2017; 2.
4. Heiber A, Kruse F, Pick C, Grüning C, Flemming S, Oberli A, et al. Identification of new PNEPs indicates a substantial non-PEXEL exportome and underpins common features in *Plasmodium falciparum* protein export. *PLoS pathogens*. 2013; 9 (8): e1003546.
5. McHugh E, Carmo OM, Blanch A, Looker O, Liu B, Tiash S, et al. Role of *Plasmodium falciparum* protein GEXP07 in Maurer's cleft morphology, knob architecture, and *P. falciparum* EMP1 trafficking. *MBio*. 2020; 11 (2): 10–1128.
6. Yadavalli R, Peterson JW, Drazba JA, Sam-Yellowe TY. Trafficking and Association of *Plasmodium falciparum* MC-2TM with the Maurer's Clefts. *Pathogens*. 2021; 10 (4): 431.
7. Ortolan LS, Avril M, Xue J, Seydel KB, Zheng Y, Smith JD. *Plasmodium falciparum* parasite lines expressing DC8 and Group A PfEMP1 bind to brain, intestinal, and kidney endothelial cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022; 12: 813011.
8. Jensen AR, Adams Y, Hviid L. Cerebral *Plasmodium falciparum* malaria: The role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it. *Immunological reviews*. 2020; 293 (1): 230–52.
9. Juillerat A, Lewit-Bentley A, Guillotte M, Gangnard S, Hessel A, Baron B, et al. Structure of a *Plasmodium falciparum* PfEMP1 rosetting domain reveals a role for the N-terminal segment in heparin-mediated rosette inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108 (13): 5243–8.
10. Mwenda MC, Fola AA, Ciubotariu II, Mulube C, Mambwe B, Kasaro R, et al. Performance evaluation of RDT, light microscopy, and PET-PCR for detecting *Plasmodium falciparum* malaria infections in the 2018 Zambia National Malaria Indicator Survey. *Malaria Journal*. 2021; 20: 1–10.
11. Soulard V, Bosson-Vanga H, Lorthiois A, Roucher C, Franetich JF, Zanghi G, et al. *Plasmodium falciparum* full life cycle and *Plasmodium ovale* liver stages in humanized mice. *Nature communications*. 2015; 6 (1): 1–9.
12. Liffner B, Diaz AKC, Blauwkamp J, Anaguano D, Frolich S, Muralidharan V, et al. Atlas of *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic development using expansion microscopy. *Elife*. 2023; 12: RP88088.
13. Laboratornaja diagnostika maljarii i babeziozov: Metodicheskie ukazaniya. M.: FBUZ «Federal'nyj centr gigieny i jepidemiologii» Rospotrebnadzora, 2015; 43 s. Russian.
14. Borovskaya MK, Kuznecova YeYe, Gorohova VG, Korjakina LB, Kuril'skaya TE, Pivovarov Yul. Strukturno-funkcional'naja harakteristika membrany jeritrocita i ee izmenenija pri patologijah raznogo geneza. *Acta Biomedica Scientifica*. 2010; 3 (73): 334–54. Russian.
15. Melcher M, Muhle RA, Henrich PP, Kraemer SM, Avril M, Vigan-Womas I, et al. Identification of a role for the PfEMP1 semiconserved head structure in protein trafficking to the surface of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. *Cellular microbiology*. 2010; 12 (10): 1446–62.
16. Kilian N, Zhang Y, LaMonica L, Hooker G, Toomre D, Mamoun CB, et al. Palmitoylated Proteins in *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes: Investigation with Click Chemistry and Metabolic Labeling. *BioEssays*. 2020; 42 (6): 1900145.
17. McDonald J, Merrick CJ. DNA replication dynamics during erythrocytic schizogony in the malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium knowlesi*. *PLoS Pathogens*. 2022; 18 (6): e1010595.
18. Ostera G, Tokumasu F, Oliveira F, Sa J, Furuya T, Teixeira C, Dvorak J. *Plasmodium falciparum*: food vacuole localization of nitric oxide-derived species in intraerythrocytic stages of the malaria parasite. *Experimental parasitology*. 2008; 120 (1): 29–38.
19. Mundwiler-Pachlatko E, Beck HP. Maurer's clefts, the enigma of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013; 110 (50): 19987–94.
20. Nigra AD, Casale CH, Santander VS. Human erythrocytes: cytoskeleton and its origin. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2020; 77: 1681–94.
21. Avril M, Bernabeu M, Benjamin M, Brazier AJ, Smith JD. Interaction between endothelial protein C receptor and intercellular adhesion molecule 1 to mediate binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to endothelial cells. *MBio*. 2016; 7 (4): 10–1128.