

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

МАЛЫКИН Григорий Валерьевич

**СИСТЕМЫ ДЕПониРОВАНИЯ И ВЫСВОБОЖДЕНИЯ
ТЕТРОДОТОКСИНА У ЛИЧИНОК И ВЗРОСЛЫХ ОСОБЕЙ НЕМЕРТИНЫ
*CERHALOTHRIX CF. SIMULA***

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Магарламов Тимур Юсифович

ВЛАДИВОСТОК – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 13 |
| 1.1 Тетродотоксин | 13 |
| 1.1.1 Общее представление о ТТХ | 13 |
| 1.1.2 Предполагаемый источник ТТХ и его миграция в экосистемах | 13 |
| 1.2 Распространение и локализация ТТХ у животных..... | 14 |
| 1.3 Роль ТТХ у животных..... | 21 |
| 1.3.1 ТТХ в жизнедеятельности животных | 21 |
| 1.3.2 ТТХ в онтогенезе животных | 22 |
| 1.4 Общее представление об объекте исследования | 24 |
| 1.4.1 Морфология тканей немертин из рода <i>Cephalothrix</i> | 26 |
| 1.4.2 Личиночное развитие <i>Cephalothrix</i> | 32 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 35 |
| 2.1 Объект исследования | 35 |
| 2.2 Микроскопические исследования | 36 |
| 2.3 Высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией | 38 |
| 2.4 Статистический анализ..... | 41 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ..... | 43 |
| 3.1 Наличие и содержание ТТХ у личинок и взрослых немертин..... | 43 |
| <i>C. cf. simula</i> | 43 |
| 3.2 Развитие личинок <i>C. cf. simula</i> | 45 |
| 3.3 ТТХ-позитивные структуры личинок <i>C. cf. simula</i> | 46 |
| 3.4 ТТХ-позитивные структуры у взрослых немертин <i>C. cf. simula</i> | 62 |
| ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ..... | 79 |
| 4.1 ТТХ-позитивные структуры у взрослых немертин <i>C. cf. simula</i> | 79 |
| 4.2 ТТХ-позитивные структуры у личинок <i>C. cf. simula</i> | 83 |
| 4.3 Динамика содержания ТТХ у личинок <i>C. cf. simula</i> | 89 |

| | |
|------------------------|-----|
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 92 |
| ВЫВОДЫ | 94 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 96 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ I..... | 119 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией

КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

МС – масс-спектрометрия

ТТХ – тетродотоксин

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ФСБ-Т – ФСБ с Tween-20

ШЭР – шероховатый эндоплазматический ретикулум

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Тетродотоксин (ТТХ) является одним из наиболее смертоносных токсинов природного происхождения, не одно десятилетие привлекающим интересы ученых из разных областей. Он является низкомолекулярным соединением, широко распространен в морских и наземных экосистемах и встречается у большого количества видов животных из различных таксономических групп. Однако, лишь небольшое число видов обладает способностью накапливать ТТХ в крайне высоких концентрациях («экстремально токсичные» животные, согласно классификации токсичности, установленной Министерством здравоохранения, труда и социального обеспечения Японии) (Malykin et al., 2021). К таковым можно отнести рыб фугу, синекольчатых осьминогов, некоторые виды немертин. Большой интерес для исследователей представляет локализация ТТХ у высокотоксичных животных в органах, тканях и клетках, морфология этих структур, их формирование в процессе индивидуального развития, а также роль ТТХ в онтогенезе животных, поскольку такие данные необходимы для понимания путей и механизмов поступления ТТХ в организм, миграции и аккумуляции ТТХ в тканях животного, более полного понимания функционального назначения токсина. Несмотря на то, что с момента открытия ТТХ минуло уже больше столетия (Suehiro, 1994), только с 1990-х годов начались исследования тканевой и реже – клеточной локализации ТТХ у животных. При этом, для исследований в подавляющем большинстве случаев применяется световая микроскопия, не позволяющая получить данные о детальном строении клеток и внутриклеточных структур. Подобные работы, выполненные, как правило, на взрослых особях, в основном, проводятся на тритонах и рыбах фугу (Tanu et al., 2002; Hassoun et al., 2022; Hanifin et al., 2002; Jang, Yotsu-Yamashita, 2006; Tao et al., 2010; Mebs et al., 2010; Mailho-Fontana et al., 2019; Sato et al., 2021). Немногочисленные работы о развитии ТТХ-содержащих клеток и тканей были проведены только на ювенильных особях тритонов (Spicer et al., 2018; Sato et al.,

2021). Высокая межвидовая и внутривидовая вариабельность в содержании ТТХ в совокупности с разнящимися подходами при проведении экспериментальных работ, значительно осложняют поиск общих закономерностей в накоплении токсина клетками и тканями, а также особенностей реализации токсического потенциала этих структур животными. Для всестороннего понимания этих процессов, использование в исследованиях как можно большего числа модельных организмов, принадлежащих к разным таксономическим группам, в сочетании с комбинациями современных методов клеточной биологии, позволяющими получить подробные данные о строении ТТХ-содержащих структур, является актуальной научной задачей. К высокотоксичным животным относятся и некоторые немертины (тип Nemertea) из рода *Cephalothrix*, в экстрактах отдельных представителей которого концентрация ТТХ настолько высока, что ставит их в один ряд с рыбами фугу и синекольчатыми осьминогами (Ali et al., 1990; Asakawa et al., 2000, 2003, 2013; Turner et al, 2019; Malykin et al., 2021). Благодаря простоте строения, неприхотливости для содержания в неволе и высокой концентрации ТТХ, эти немертины являются удобными модельными организмами для исследований развития в процессе онтогенеза ТТХ-содержащих структур и их морфологии. Несмотря на это, на сегодняшний день существуют лишь несколько работ, в которых животные этого типа являются модельным объектом для подобных исследований. При этом, авторами в большинстве случаев используются только физико-химические методики, показывающие наличие и концентрации ТТХ в отдельных тканях или органах, не дающие представления об их строении и о клеточной локализации токсина в этих структурах, а работ, касающихся роли ТТХ в процессе индивидуального развития немертин и становления у них (как и у других животных) ТТХ-содержащих структур и вовсе не проводилось.

Степень разработанности темы. Наиболее изученными животными в отношении локализации ТТХ в органах, тканях и клетках являются различные виды тритонов и рыб фугу. С использованием различных методов было показано, что у этих животных наибольшая доля токсина локализуется в таких органах, как

кожные покровы, яичники и печень (Hassoun et al., 2022; Hanifin et al., 2002; Jang, Yotsu-Yamashita, 2006; Tao et al., 2010; Mebs et al., 2010; Mailho-Fontana et al., 2019; Sato et al., 2021).

Исследования локализации ТТХ на клеточном уровне у ювенильных и взрослых особей различных видов тритонов при помощи иммуногистохимических методов с использованием антител против ТТХ показали, что ТТХ-позитивная метка ассоциирована с гранулами различных типов железистых клеток кожных покровов и плазмой крови в капиллярах кожи (Tsuruda et al., 2002; Mebs et al., 2010; Mailho-Fontana et al., 2019; Sato et al., 2021).

У рыб фугу аналогичными методами клеточная и внутриклеточная локализация ТТХ была изучена на высокотоксичных органах (кожа, яичники и печень). Показано, что ТТХ в коже, как правило, локализован в гранулах железистых клеток различных типов (Tanu et al., 2002; Tatsuno et al., 2013; Sato et al., 2021), лизосомах базальных клеток (Mahmud et al., 2003a). Исследования локализации ТТХ в клеточных и субклеточных фракциях печени рыб показали, что большая часть токсина ассоциирована с цитоплазмой клеток печени (Okita et al., 2013; Gao et al., 2020; Sato et al., 2021). В яйцеклетках рыб токсин был выявлен в цитоплазме и желточных гранулах, а в овулированных яйцеклетках ТТХ концентрируется в вителлиновой оболочке (Matsumura, 1995).

Благодаря полученным данным о тканевой и клеточной локализации токсина у тритонов и рыб фугу, можно сделать выводы, что ТТХ в кожных покровах и гонадах у этих животных может нести защитную функцию, а его присутствие в печени может говорить об ее участии в депонировании ТТХ (Zimmer et al., 2006; Gall et al., 2011; Okita et al., 2013; Reveter et al., 2018).

Среди немертин ТТХ был обнаружен у 18 видов (Göransson et al., 2019), и только на небольшом количестве из них: *Cephalothrix* sp. (= *Cephalothrix simula*) (Tanu et al., 2004), *Dushia atra* и *Micrura verrilli* (Campbell, Schwartz 2009), а также на *Lineus alborostratus* (= *Kulikovia alborostrata*) (Magarlamov et al. 2016),

распределение ТТХ было показано с помощью иммуногистохимических методов. Было установлено, что ТТХ у немертин может локализоваться в гранулах железистых клеток интегумента, клетках хобота, кровеносных сосудов, а также в экстрацеллюлярном матриксе (ЭЦМ) и клетках кишечного эпителия. Предполагается, что железистые клетки интегумента могут секретировать ТТХ в ответ на внешние раздражители. ТТХ-позитивные клетки хобота могут участвовать в охоте. Накопление ТТХ в эпителиальных клетках кишечника может быть связано с употреблением ТТХ-содержащих объектов питания. Локализация ТТХ в ЭЦМ может говорить о его транспорте из кишечника в другие органы и ткани. ТТХ в яйцеклетках немертин может играть роль в защите потомства. Однако, приведенные исследования охватывают не все регионы тела немертин, при этом в большинстве работ используются низкотоксичные виды животных (Campbell, Schwartz 2009; Magarlamov et al. 2016). Под вопросом остается и внутриклеточная локализация токсина, данных о которой в имеющейся литературе встречается крайне мало. Что касается работ о роли ТТХ в процессе индивидуального развития немертин, то их личинки никогда не исследовали на наличие токсина, а роль и судьба ТТХ в онтогенезе немертин неизвестна.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является изучение тканевой и клеточной локализации ТТХ у личинок и взрослых особей немертин *C. cf. simula* и исследование морфологии структур, содержащих, аккумулирующих и экскретирующих ТТХ.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Определение содержания ТТХ методом ВЭЖХ-МС/МС у взрослых особей *C. cf. simula* и отслеживание динамики содержания ТТХ у личинок в процессе развития.
2. Исследование тканевой и клеточной локализации ТТХ у личинок и взрослых особей *C. cf. simula* методами иммуногистохимии.

3. Описание клеточного состава тканей, содержащих ТТХ-позитивные клетки у личинок и взрослых особей *C. cf. simula*.

4. Сравнительная характеристика ТТХ-содержащих структур у личинок и взрослых особей *C. cf. simula*.

Научная новизна. В настоящей работе впервые описано тканевое и клеточное распределение ТТХ у взрослых немертин *C. cf. simula*, а также у их личинок от выхода из яйцевых оболочек до поздней стадии личинки (41 сут). Впервые описан клеточный состав ТТХ-содержащих тканей у взрослых высокотоксичных немертин *C. cf. simula* в различных отделах тела (предротовой отдел, регион передней кишки, регионы в среднем и заднем отделах). Впервые для личинок животных описан клеточный состав ТТХ-содержащих тканей и получены данные о строении ТТХ-содержащих структур. Для личинок немертин впервые описаны клеточный состав желез эктодермального происхождения и новая для личинок структура – апикальный цилиндр. Впервые получены данные об изменении клеточной локализации ТТХ у животных в процессе личиночного развития, а также проведен сравнительный морфологический анализ ТТХ-содержащих структур у личинок и взрослых особей немертин.

Теоретическая и практическая значимость. В работе получены новые данные о тканевом и клеточном распределении ТТХ у личинок и взрослых особей немертин *C. cf. simula*. Работа представляет собой первое исследование клеточного состава ТТХ-содержащих тканей и органов взрослых немертин *C. cf. simula* и их личинок, расширяющее представление о становлении, строении и функциях структур, содержащих, аккумулирующих и экскретирующих ТТХ у животных. Полученные в работе данные вносят вклад в понимание путей, особенностей аккумуляции и использования ТТХ животными. Используемые в работе методологические подходы и полученные данные могут быть использованы при исследованиях путей и особенностей аккумуляции ТТХ в клетках и тканях животных, относящихся к различным таксономическим группам. Результаты

работы представляют интерес для составления образовательных курсов по соответствующим биомедицинским направлениям высшего профессионального образования.

Методология и методы диссертационного исследования. При проведении экспериментальных работ были использованы современные методы клеточной биологии, гистологии, биохимии. Содержание ТТХ в экстрактах взрослых немертин и личинок измеряли при помощи ВЭЖХ-МС/МС. Морфологические исследования, исследования ультраструктуры тканей немертин, а также работу по выявлению локализации ТТХ проводили при помощи световой микроскопии, трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), иммуногистохимических методов.

Личный вклад автора. Все экспериментальные данные, представленные в работе, за исключением необработанных данных ВЭЖХ-МС/МС, получены лично автором. Автор также принимал непосредственное участие в сборе образцов и написании публикаций.

Положения, выносимые на защиту:

1. Личинки *C. cf. simula* сохраняют ТТХ, полученный с желтком от яйцеклеток. В процессе развития личинок ТТХ преимущественно аккумулируется в мезодермальных клетках, железистых клетках эпидермиса, ротовых железах и апикальном цилиндре личинок. У взрослых немертин ТТХ аккумулируется преимущественно в энтероцитах кишечника, железистых клетках интегумента, головной железы и хобота.

2. Немертины *C. cf. simula* способны удерживать и накапливать ТТХ уже на ранних этапах развития.

3. От ранних личиночных стадий до взрослого состояния *C. cf. simula* содержит ТТХ в структурах, используемых животным для охоты и защиты.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обоснована использованием широкого диапазона современных методов: цитологических (иммуоцитохимия, световая микроскопия, КЛСМ, ТЭМ), эмбриологических (развитие немертины *C. cf. simula* в культуре) и физико-химических (ВЭЖХ-МС/МС). В работе была использована достаточная выборка образцов, результаты были проанализированы с использованием релевантных статистических методов и опубликованы в рецензируемых журналах из списка ВАК РФ, представлены на международных и всероссийских конференциях, семинарах.

Апробация работы и публикации. Результаты исследований по теме диссертационной работы были представлены на Международной конференции «Морская биология в 21 веке: достижения и перспективы развития (к 100-летию со дня рождения академика Алексея Викторовича Жирмунского)» (Владивосток, 2021), на Всероссийской конференции «Морская биология в 21 веке: биология развития, молекулярная и клеточная биология, биотехнология морских организмов» (Владивосток, 2023), на IV Форуме молодых ученых «Будущее биомедицины 2023» («Future of Biomedicine: Young (FOBY 2023)») (Владивосток, 2023) и на региональной конференции «Региональная научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых учёных по естественным наукам» (Владивосток, 2023). По теме диссертации опубликовано 6 работ: 2 статьи в международных журналах, индексируемых РИНЦ, Scopus, Web of Science и рекомендованных ВАК, и 4 тезисов в материалах всероссийских и международных конференций.

Структура работы. Диссертация изложена на 119 страницах, включает список сокращений, введение, обзор литературы, материал и методы, результаты, обсуждение, выводы, заключение, список литературы и одно приложение. Работа содержит 25 рисунков и 3 таблицы. Список литературы включает 175 наименований, 173 из которых на иностранном языке.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю – Магарламову Т.Ю. за чуткое и грамотное руководство, предоставление возможностей для комфортной и интересной работы. Автор благодарен коллективу Лаборатории фармакологии НИЦМБ ДВО РАН и членам рабочей группы Т.Ю. Магарламова: Власенко А.Е., Мельниковой Д.И., Кузнецову В.Г. и Переверзевой А.О. за помощь и поддержку в работе, отзывчивость и надежность. Автор благодарит наставников и коллег – Кумейко В.В., Шведа Н.А., Гринченко А.В. за их переданные ценные знания и навыки, за эффективное обучение рабочим методикам, многие из которых были использованы при работе над диссертацией. Значимая помощь в работе была оказана А.В. Чернышевым, которому автор также признателен за возможность работы в экспедициях и получение ценнейшего опыта. Отдельную благодарность автор выражает Веланскому П.В., Фомину Д.В. и Шеферу К.А. за помощь при работе с научным оборудованием, а также водолазной службе НИЦМБ ДВО РАН за помощь в сборе материала. Написание диссертации не было бы возможным без сбора материала и проведения экспериментов на Морской биологической станции «Восток» НИЦМБ ДВО РАН, администрацию и рабочий коллектив которой автор также благодарит за содействие в организации работ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Тетродотоксин

1.1.1 Общее представление о ТТХ

Тетродотоксин (ТТХ) характеризуется слабоосновными свойствами, обладает термостабильностью, не имеет цвета, запаха и вкуса. ТТХ оказывает нейропаралитический эффект за счет избирательного блокирования потенциал-зависимых натриевых каналов в мышечных и нервных клетках (Katikou et al., 2022). При пероральном введении полулетальная доза ТТХ (EC50) равна 232 мкг/кг массы тела (Abal, 2017). При внутрибрюшинном и подкожном введении – 10,7 и 12,5 мкг/кг массы тела соответственно (Lago, 2015). Отравления ТТХ довольно широко распространены в странах Азиатско-Тихоокеанского региона. Причиной отравлений является употребление ТТХ-содержащих морепродуктов и каждый год в мире фиксируется около 3000 случаев, из которых около 340 (11,2%) являются смертельными (Guardone et al, 2019). К симптомам отравления ТТХ относятся общее недомогание, головная боль, слабость, дисфагия, тошнота, рвота, боль в животе, онемение конечностей, отсутствие координации, гипотензия, нарушения ритма сердца, паралич мышц. Поскольку токсин широко распространен в природе, вопросы его экологической и биологической значимости остаются актуальными и на сегодняшний день.

1.1.2 Предполагаемый источник ТТХ и его миграция в экосистемах

В качестве возможного источника ТТХ у животных рассматриваются свободноживущие и симбиотические штаммы ТТХ-продуцирующих бактерий. Они были выделены из различных источников, например: рыб отряда Tetraodontiformes (Magarlamov et al., 2017), красных водорослей (Yasumoto et al., 1986), ксантидных крабов (Sugita, et al., 1987), синекольчатых осьминогов (Hwang et al., 1989), гастропод (Vane et al., 2014), морских звезд (Narita et al., 1987), из донных осадков (Do et al., 1990). Данные о продукции ТТХ упомянутыми выше

штаммами подтверждают разнообразные методы химического анализа на наличие ТТХ сред, засеянных выделенными микроорганизмами (Magarlamov et al., 2017). Группа ТТХ-продуцирующих бактерий включает виды из следующих родов: *Actinomyces*, *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Vibrio*. Хотя разнообразие штаммов подобных бактерий достаточно велико, количества ТТХ, вырабатываемые ими, являются крайне небольшими, и объяснить выработку экстремально высоких уровней токсина у многих видов животных бактериальной продукцией вряд ли возможно. Это привело к возникновению предположения, что ТТХ накапливается у животных по пищевым цепям. Такой механизм приводит к накоплению ТТХ в больших концентрациях у видов, стоящих на верхних трофических уровнях. Предположение о том, что ТТХ у животных имеет пищевое происхождение, подтверждается рядом исследований. Например, рыба фугу, стоящая на верхней ступени пищевой цепи, получает ТТХ благодаря питанию токсин-содержащими организмами, которые находятся на более низких трофических уровнях (Noguchi, 2006). Поступление ТТХ с пищей характерно для некоторых токсичных крабов, которые питаются брюхоногими токсин-содержащими моллюсками (Yu et al., 2011). Однако, при получении некоего количества ТТХ из объектов питания, нельзя исключать и возможность накопления животными ТТХ, продуцируемого симбиотической бактериальной микрофлорой, которая также вносит свой вклад в токсификацию животного (Wood et al., 2012).

1.2 Распространение и локализация ТТХ у животных

ТТХ у тритонов. Тритоны (Salamandridae) являются наиболее известными представителями наземных животных, содержащих ТТХ. Впервые у тритонов ТТХ был выделен в 1963 году из яиц *Triturus torosus* (Brown, Mosher, 1963). На сегодняшний день ТТХ обнаружен среди 12 видов нескольких различных родов тритонов (Hanifin, 2010). Для многих видов характерны отличия в уровнях содержания ТТХ между особями различных популяций и внутри популяций

(Hanifin et al., 1999; Mochida et al., 2013). Для этих животных проводились исследования токсичности отдельных органов и тканей. Большая часть токсина локализуется в коже, яичниках и печени. В остальных органах токсин, как правило, обнаруживают в следовых концентрациях или не обнаруживают вовсе (Hanifin et al., 2002; Mebs et al., 2010; Sato et al., 2021). Первое исследование тканевого распределения ТТХ с помощью иммуногистохимии провели Цуруда и соавторы (Tsuruda et al., 2002). Исследование было проведено на кожных покровах *Cynops pyrrhogaster*. У ювенильных особей *C. pyrrhogaster* ТТХ был локализован в железистых клетках дермальных желез, у взрослых тритонов – в гранулярных железистых клетках (Tsuruda et al., 2002). В другом исследовании у данного вида тритонов ТТХ-положительные клетки были обнаружены в кожных железах, печени, кишечнике (Sato et al., 2021). У вида *Notophthalmus viridescens* наиболее интенсивную флуоресцентную метку содержали кожные железы; в печени и почках, кишечном эпителии, яичниках, семенниках, соединительной ткани ТТХ-позитивная метка имела более низкую интенсивность (Mebs et al., 2010). У *Taricha granulosa* в кожных покровах ТТХ был выявлен в железах, также он был обнаружен в плазме крови и стенке капилляров (Mailho-Fontana et al., 2019).

ТТХ у рыб фугу. Наиболее известными морскими животными, содержащими ТТХ являются рыбы отряда Tetraodontiformes, известные также как рыбы фугу. В первых работах авторы сообщали либо об общей токсичности животного (Herre, 1927), либо о токсичности его яичников (Takahashi, Inoko, 1889). После выделения ТТХ и определения его химической структуры, японскими исследователями были проведены первые масштабные исследования токсичности рыб фугу (Tsuda, Kawamura, 1950; Endo, 1984). Высокой токсичностью отличались виды рода *Takifugu*. В последующие годы токсичные виды рыбы фугу были выявлены среди большинства родов отряда Tetraodontiformes и обнаружены в территориальных водах различных стран. В дальнейшем кроме общей токсичности экстрактов стали исследовать токсичность отдельных органов и тканей: для многих токсичных видов рыбы фугу характерны высокие концентрации ТТХ в яичниках, за ними

следует печень и/или кожа, а остальные органы, как правило содержат небольшие количества токсина или не содержат вовсе (Jang, Yotsu-Yamashita, 2006; Tao et al., 2010; Hassoun et al., 2022). Ряд исследований показал, что различные участки кожи могут иметь различную токсичность (Saito et al., 1985; Honda et al., 2007). Также присутствие ТТХ характерно для кожной слизи рыбы (Nuñez-Vázquez et al., 2000). В одной из работ было показано, что у рыб *T. rubripes*, выращенных в неволе, в кишечнике могут присутствовать следовые количества токсина (Sato et al., 1990). Однако, у выращенных в искусственных условиях рыб, количества ТТХ были значительно ниже по сравнению с дикими представителями вида (Sasaki et al., 2008), но уровень токсичности может возрастать, когда рыбы снова оказываются в открытой воде или получают токсичную пищу (Yu et al., 2011). Количество и распределение ТТХ, накопленного различными видами рыбы, варьирует в различных органах в зависимости от времени года и места обитания рыбы, а также от нерестового периода (Nagashima et al., 2011; Itoi et al., 2018, 2020; Okabe et al., 2019; Akbora et al., 2020). У вида *T. pardalis* ТТХ был обнаружен в секрете кожных желез, что позволило авторам исследования предположить, что ТТХ содержится в секреторных клетках, входящих в их состав (Kodama et al., 1986). Позднее локализация ТТХ в секреторных клетках кожи рыбы фугу была подтверждена рядом исследований с помощью иммуногистохимии (Tanu et al., 2002; Mahmud et al., 2003а, б; Sato et al., 2021). ТТХ был обнаружен в базальных (не дифференцированных) клетках кожи рыб (Tanu et al., 2002; Mahmud et al., 2003а; Itoi et al., 2012; Tatsuno et al., 2013). Исследования методом электронной микроскопии показали, что в базальных клетках кожи *T. nigroviridis* ТТХ ассоциирован с гранулами, ограниченной мембраной (предположительно лизосомами) (Mahmud et al. 2003а). У исследованных видов экскретирующие ТТХ клетки также располагаются в погруженных кожных железах или же в одиночных сукциформных клетках, равномерно распределенных по всей коже. Интересно, что данный клеточный тип у самцов *T. alboplumbeus* содержал более интенсивную метку, чем у самок (Itoi et al., 2012). В коже *T. alboplumbeus* небольшие количества

ТТХ были обнаружены и в мукоидных клетках, а также в кожной слизи (Itoi et al., 2012). На нескольких видах *Takifugu* и *Chelonodontops patoca* с помощью иммуноцитохимии было показано, что ТТХ локализован в цитоплазме паренхимальных гепатоцитов (Mahmud et al., 2003б; Itoi et al., 2012; Okita et al., 2013; Gao et al., 2020; Sato et al., 2021). В *in vitro* эксперименте с инкубированием кусочков печени *T. rubripes* с раствором ТТХ токсин поступал в паренхимальные гепатоциты из клеток поджелудочной железы (Gao et al., 2020). В работе, посвященной микрораспределению ТТХ в яичниках, проведенной на *T. alboplumbeus*, токсин был выявлен в цитоплазме и желточных гранулах яйцеклеток (Matsumura, 1995). В исследовании на *T. vermicularis* ТТХ был обнаружен в желточных гранулах и пузырьках, а также ядрах зрелых яйцеклеток; незрелые яйцеклетки токсин не содержали (Mahmud et al. 2003б). У *C. patoca* ТТХ был локализован в ядрах яйцеклеток и соединительной ткани яичников (Mahmud et al., 2003б). Itoi с соавторами обнаружили ТТХ в ядрах яйцеклеток *T. alboplumbeus* (Itoi et al., 2012). Результаты некоторых иммуногистохимических исследований говорят о наличии слабой ТТХ-позитивной метки в нервной системе: в зрительной коре, мозжечке и продолговатом мозге, зрительном нерве и обонятельном эпителии ювенилов *T. rubripes* (Okita et al., 2013), а также в тканях пищеварительной системы рыбы *T. flavipterus* (Sato et al., 2021).

ТТХ у моллюсков. Первые работы о присутствии ТТХ у этих животных были проведены на представителях головоногих моллюсков – осьминогах *Napalochlaena maculosa*. ТТХ у них содержался в слюнной железе, щупальцах, головогрудь и брюшке (Sheumack et al., 1978; Hwang et al., 1989; Yotsu-Yamashita et al., 2007). Далее последовали работы, показавшие присутствие ТТХ в большом количестве органов и тканей, секрете желез различных видов осьминогов: передних и задних слюнных железах, щупальцах, мантии, пищеварительной железе, гонадах, жаберном сердце, нефридиях, жабрах, чернилах и т.д. (Williams et al. 2012; Asakawa et al., 2019). Наибольшие концентрации токсина, как правило, содержатся в слюнных железах. При изучении микрораспределения ТТХ в тканях *H. fasciata* и

H. lunulata с помощью иммуногистохимии было выявлено, что токсин у обоих видов концентрируется в клетках, выстилающих секреторные каналы внутри железы (Williams et al. 2012), в мантии и щупальцах *H. lunulata* ТТХ был обнаружен под покровным эпителием, а также концентрировался в каналах циркуляторной системы. Далее ТТХ был обнаружен у многих видов брюхоногих двустворчатых и моллюсков, в том числе и промысловых (Taniyama et al., 2013; Vacchicchi et al., 2021; Monika Dhanji-Rapkova et al., 2023; Antonelli et al., 2023). Уровень ТТХ у таких видов может различаться в зависимости от факторов окружающей среды, таких как сезонность, состав бактериальных и фитопланктонных сообществ в местах обитания моллюсков (Monika Dhanji-Rapkova et al., 2023; Antonelli et al., 2023). В большинстве исследований показано, что ТТХ сконцентрирован в пищеварительных железах. Однако, ряд исследований продемонстрировал наличие ТТХ в мышцах, мантии и яйцеклетках животных (Hwang et al., 1990; Wood et al., 2012; Salvitti et al., 2015). ТТХ был обнаружен и в кладках яиц *Pomacea maculata* (Wood et al., 2012; Salvitti et al., 2015). В двустворчатых моллюсках, например у *Raphies australis* наибольшее содержание ТТХ было выявлено в сифоне (Biessy et al., 2019), а иммуногистохимические исследования показали, что токсин локализован в цитоплазме некоторых эпителиальных клеток губных щупиков и жабр, эпителиальных клетках средней и задней кишки, в клетках внутреннего и внешнего эпителия сифона (Biessy et al., 2018).

ТТХ у иглокожих. ТТХ был обнаружен в нескольких видах морских звезд (Kadota et al., 2008, Silva et al., 2019). Например, для *A. scoparius* было показано, что наибольшей токсичностью обладают внутренние органы, менее токсичны гонады и стенка тела (Lin et al., 1998; Lin, Hwang, 2001). Локализация ТТХ в клетках иглокожих не изучена.

ТТХ у плоских червей. ТТХ встречается среди плоских червей видов *Planocera multitentaculata* (Miyazawa et al., 1986; Miyazawa et al., 1987), *Planocera reticulata* (Jeon et al., 1987; Kashitani et al., 2020), *Planocericid* sp. (Ritson-Williams et al. 2006) и

Stylochoplana sp. (Salvitti et al., 2015). Впервые ТТХ был обнаружен в экстрактах *Planocera multitentaculata* (Miyazawa et al., 1986; Miyazawa et al., 1987). Исследования экстрактов отдельных органов *P. multitentaculata* показали, что наиболее токсичными являются яйцеводы, органы пищеварения и размножения; слабый нейротоксический эффект был выявлен в слизи, окутывающей червя (Miyazawa et al., 1987; Yamada et al., 2017). В более детальных исследованиях методами иммуноцитохимии с антителами против ТТХ токсин был выявлен в яйцеклетках *P. reticulata* (Tanu et al., 2004), а также в цитоплазме яйцеклеток и в эпителиальных клетках фаринкса *Stylochoplana* sp. (Salvitti et al., 2015b).

ТТХ у членистоногих. Среди членистоногих наиболее известными ТТХ-содержащими животными являются крабы. ТТХ был обнаружен в экстрактах нескольких видов ксантидных крабов (Xanthidae) (Tsai et al., 1995; Asakawa et al., 2010). Практически все органы и ткани крабов этого вида содержат ТТХ, однако большая его концентрация отмечалась в яйцеклетках, мышцах различных конечностей, желудке и пищеварительных железах (Ngy et al., 2007; Zheng et al., 2019). Иммуногистохимические исследования с антителами против ТТХ на членистоногих проводили Ито с соавторами. Ими ТТХ впервые был обнаружен в паразитических копеподах *Pseudocaligus fugu* и *Taeniocanthus* sp., обитающих на рыбе фугу *T. alboplumbeus* (Itoi et al., 2006). Авторы показали, что ТТХ в *P. fugu* содержится во всех тканях организма, кроме эпикутикулы и репродуктивной системы (Ikeda et al., 2006). Сходные данные были получены и для *Caligus fugu* – эктопаразита *T. alboplumbeus* и *T. flavipterus* (Kodama et al., 2021).

ТТХ у немертин. ТТХ у немертин впервые был обнаружен в 1988 году (Miyazawa et al., 1988). Позже ТТХ был выявлен у немертин из 14 родов (Göransson et al., 2019), являющихся представителями всех трех существующих классов. На сегодняшний день встречается лишь несколько работ, в которых показано содержание ТТХ у немертин. В части из них использовались физико-химические методики или же методы биотестирования, а в других – иммуногистохимические

методики. Комбинированных работ, сочетающих в себе физико-химические методы анализа и иммуногистохимические подходы, на сегодняшний день не встречается. При этом, только в двух работах для анализа содержания ТТХ в теле немертин применялась ВЭЖХ-МС/МС, являющаяся на сегодняшний день одним из самых достоверных и точных методов анализа веществ (Turner et al., 2018; Vlasenko, Magarlamov, 2020). Относительно детальные исследования локализации ТТХ у этого типа животных, где ТТХ выявляли в отдельных тканях и органах немертин, на данный момент представлены только в пяти работах. По данным работы Власенко и Магарламова (Vlasenko, Magarlamov, 2020), в которой авторы измеряли концентрацию ТТХ в различных органах и тканях немертины *C. cf. simula* методом ВЭЖХ-МС/МС, наибольшее количество ТТХ было обнаружено в кишечнике, хоботе и кожных покровах, при этом концентрация ТТХ убывала в ряду: передняя кишка, средняя часть кишечника и задняя часть кишечника. Власенко и соавторы (Vlasenko et al., 2021) показали, что эпидермальная слизь *K. alborostrata* содержит ТТХ, а при стрессе немертины способны увеличивать продукцию токсичной слизи в ответ на внешние раздражители. Работ по анализу клеточного распределения ТТХ у немертин методами иммуноцитохимии встречается всего три. Впервые распределение токсина на клеточном уровне в организме немертин было исследовано для *C. simula* в работе Тану с соавторами (Tanu et al., 2004). Авторы проводили исследования с использованием моноклональных антител против ТТХ, которыми они маркировали парафиновые срезы тела района передней кишки. Аналогичную методику применяли в своей работе Кэмпбелл и Шварц (Campbell, Schwartz 2009), изучавшие распределение ТТХ в 4 видах немертин: *D. atra*, *M. verrill*, *Tubulanus sexlineatus* и *T. polymorphous*. ТТХ у немертин в приведенных выше работах был обнаружен в эпидермисе, хоботе (орган охоты), кишечнике и яйцеклетках. Магарламов с соавторами (Magarlamov et al, 2016) провели работу по изучению распределения ТТХ на клеточном и субклеточном уровнях на слаботоксичной немертине *K. alborostrata*. Методами иммуногистохимии авторы исследовали только кожные покровы и железистый

эпителий хобота. В кожных покровах ТТХ был выявлен в одном типе кутисных желез, в хоботе ТТХ локализовался в мукоидных и псевдокнид-содержащих железистых клетках. Внутри клеток ТТХ был локализован в гранулах железистых клеток или же в околядерном пространстве, предположительно в ЭПР.

1.3 Роль ТТХ у животных

1.3.1 ТТХ в жизнедеятельности животных

ТТХ может встречаться в различных органах и тканях, однако, теории относительно специализированных функций ТТХ в живых организмах, в основном, касаются лишь кожных покровов, специальных ядовитых желез, репродуктивной системы и органов охоты. Слизь, содержащая ТТХ, выделяемая поверхностью кожи животных, например, тритонов (Zimmer et al., 2006; Gall et al., 2011), различных видов рыб (Reveter et al., 2018) в ответ на различные стимулы защищает их от хищников, а в некоторых случаях, как предполагается, экскретируемый в окружающую среду токсин выполняет коммуникативные функции между особями (Nagashima, Arakawa, 2014). Факт присутствия ТТХ в слюнных железах и органах охоты объясняют его ролью в иммобилизации добычи. Наличие ТТХ в пищеварительной системе не дает сделать однозначного вывода о его функции в ней. Данные о распределении токсина у животных, содержащих ТТХ, имеющиеся на сегодняшний день, свидетельствуют о том, что токсин мигрирует из пищеварительной системы к другим органам благодаря транспортным системам организма, таким как кровеносная и лимфатическая системы (Noguchi, Arakawa, 2008; Salvitti et al., 2015b; Williams et al., 2011), а затем выделяется через специализированные органы или аккумулируется в органах-мишенях. Роль кровеносной системы в миграции ТТХ к органам и тканям была наглядно продемонстрирована для рыб фугу. Так, концентрация ТТХ, введенного нетоксичной рыбе фугу *T. rubripes* внутривенно, постепенно уменьшалась в крови, а сам токсин накапливался преимущественно в коже и печени в течение 12 ч после

введения (Matsumoto et al., 2008). Также в экспериментах по кормлению *T. rubripes* показано, что ТТХ способен проникать в кровь из кишечника, откуда уже транспортируется по всему организму, оседая в печени (Matsumoto et al., 2008; Tatsuno et al., 2013).

Для немертин подтверждено присутствие ТТХ в эпидермальной слизи, вырабатываемой ими в качестве лубриканта для облегчения передвижения в местах обитания (Ali, 1990, Vlasenko et al., 2021). Способность продуцировать большие количества слизи, обволакивающей тело немертин, является одной из характерных особенностей червей этого типа, выполняющей помимо смазывающей еще и защитную функцию. За продукцию слизи ответственны разнообразные железистые клетки кожных покровов: в ответ на раздражители они способны выбрасывать секрет, содержащий ТТХ, предположительно, для отпугивания хищников (Gibson 1984, Norenburg, 1985, Vlasenko et al, 2021). Слизь используется немертинами и для строительства «домиков», служащих для них укрытием. ТТХ у немертин присутствует также в хоботе, кишечнике и кожных покровах. Предполагается, что ТТХ в эпидермисе выполняет защитную функцию, а экскреция ТТХ клетками хобота, органа охоты, играет роль в иммобилизации жертвы (Vlasenko, Magarlamov, 2020).

1.3.2 ТТХ в онтогенезе животных

Поскольку ТТХ был обнаружен в яичниках и яйцеклетках некоторых ТТХ-содержащих животных, была выдвинута гипотеза о роли токсина в защите потомства (Hanifin, 2010; Williams, 2010). Несколько экспериментов выявили положительную корреляцию между выживаемостью и высоким уровнем содержания ТТХ в оплодотворенных яйцеклетках и молоди некоторых видов (Ferrer, Zimmer, 2007; Gall et al., 2011; Itoi et al., 2014, 2018). Наиболее изученными животными в отношении появления ТТХ в ходе эмбрионального развития являются тритоны. При изучении развития глаз тритонов *Taricha torosa* было показано, что экстракты эмбрионов, ранних личинок и яйцеклеток обладают паралитическим эффектом. Он снижается по мере элиминирования желтка и

полностью исчезает при формировании ювенильных особей, способных к самостоятельному питанию (Twitty, Elliott, 1934). ТТХ был обнаружен в яичниках, кладках яиц, семенниках, яйцеклетках и эмбрионах *T. torosa* (Brodie Jr et al., 1974; Bucciarelli et al., 2014); в яйцеклетках, кладках яиц и ювенильных особях *T. granulosa* (Brodie Jr et al., 1974; Gall et al., 2011; Gall et al., 2014), яйцеклетках *T. rivularis* (Brodie Jr et al., 1974). В период эмбрионального развития *T. granulosa* вплоть до вылупления из яйца, концентрация токсина у животного не меняется, а его основное количество находится в эмбрионе, а не в оболочке яйца (Gall et al., 2014). Несколькими исследовательскими группами установлено содержание ТТХ в ювенильных особях *C. pyrrhogaster* (Tsuruda et al., 2002; Kudo et al., 2017; Sato et al., 2021) и *N. viridescens* (Yotsu-Yamashita, Mebs, 2003; Yotsu-Yamashita et al., 2012; Spicer et al., 2018). У *N. viridescens* токсин был также найден в яйцеклетках (Brodie Jr et al., 1974). ТТХ был обнаружен в яичниках *Cynops ensicauda* (Yotsu et al., 1990), яйцах *Cynops orientalis* (Mebs, Yotsu-Yamashita, 2021) и яйцеклетках *Paramesotriton hongkongensi* (Brodie Jr et al., 1974). При сравнении содержания ТТХ у диких и выращенных из яиц в неволе ювенильных особей *C. pyrrhogaster* выяснилось, что токсин в искусственно выращенных ювенильных особях удается выявить только до 22 недели с момента вылупления, более взрослые особи (с 36 по 70 неделю) токсин не содержат (Kudo et al., 2015). С помощью иммуногистохимического маркирования поликлональными антителами против ТТХ у ювенильных особей *C. pyrrhogaster* токсин был выявлен в мукоидных клетках кожи, яичниках и эпителиальных клетках кишечника, в дерме (Spicer et al., 2018; Sato et al., 2021).

У морских животных ТТХ был обнаружен в яйцеклетках нескольких видов рыб фугу, яйцеклетках и личинках синекольчатых осьминогов, плоских червей и брюхоногих моллюсков *Pleurobranchaea maculata* (Melnikova, Magarlamov, 2022). Яйцеклетки мечехвоста *Carcinoscorpius rotundicauda* (Kungsuwan et al., 1987; Tanu, Noguchi, 1999; Ngy et al., 2007; Dao et al., 2009; Huang et al., 2016; Zheng et al., 2019) и ксантидного краба *Atergatis floridus* (Saito et al., 2006) также содержат ТТХ. Детальный мониторинг динамики материнского ТТХ во время созревания

яйцеклеток был проведен на рыбе фугу (Tatsuno et al., 2013; Gao et al., 2018). Исследования показали, что большая часть ТТХ в организме содержалась в яичниках во время созревания яйцеклеток, а после нереста уровень токсина в яичниках резко снижался. ТТХ локализовался в ядрах яйцеклеток, в перинуклеарном пространстве и перераспределялся в желточные пузырьки и глобулы во время созревания (Mahmud et al., 2003б; Itoi et al., 2012; Gao et al., 2018). Динамика содержания ТТХ в процессе развития была прослежена у рыб из рода *Takifugu* (Matsumura et al., 1998; Nagashima et al., 2010) и осьминога *Hapalochlaena lunulata* (Williams et al., 2011). У рыбы фугу содержание ТТХ в процессе развития постепенно увеличивалось как у развивающихся эмбрионов, так и у вылупившихся мальков (Matsumura et al., 1998; Nagashima et al., 2010). У осьминога концентрация ТТХ повышалась от последних стадий эмбрионального развития до вылупления паралички (Williams et al., 2011). Кодама и соавторы обнаружили появление ТТХ при развитии личинок эктопаразитического копепода *Caligus fugu* (Kodama et al., 2021). Авторы показали, что его личинки не содержали ТТХ на планктонной стадии, однако приобретали токсин в процессе питания слизью, продуцируемой кожными покровами рыбы-хозяина. Несмотря на тот факт, что некоторое количество исследований о роли ТТХ в онтогенезе морских животных все же проводилось, на сегодняшний день не встречается работ о развитии у них структур, содержащих ТТХ. ТТХ был обнаружен и в яйцеклетках немертин – у высокотоксичных животных из рода *Cephalothrix* (Tanu et al., 2004), однако у личинок никогда не исследовали наличие токсина.

1.4 Общее представление об объекте исследования

Род *Cephalothrix* относится к классу палеонемертин (Palaeonemertea). Род включает более 30 описанных видов, из которых несколько являются криптическими (Nam, Rhee, 2020). Немертины *C. simula* являются одними из таковых: сравнительно недавние таксономические исследования *C. simula*

показали, что под этим названием скрываются три внешне неразличимых криптических вида (Kajihara et al., 2013; Sagorny et al. 2018 Kajihara, 2019). Известно, что представители *C. simula* обладают экстремальными уровнями содержания ТТХ. Токсичность некоторых особей *C. simula* может достигать значения выше 1000 МЕ/г (178 мкг/г), что можно обозначить, как «чрезвычайную токсичность» согласно классификации, установленной Министерством здравоохранения, труда и социального обеспечения Японии. *C. simula* – это свободноживущие немертины, обитающие в песке, гальке или ризоидах водорослей в прибрежной полосе (Kajihara et al. 2013). Объектами питания для этих немертин могут служить полихеты, мелкие ракообразные, немертины других видов (Chernyshev, 2014). Внешне эти немертины характеризуются тонким телом, могут достигать в длину до 40 см, и иметь ширину до 1 мм (Kajihara et al. 2013). Цвет тела варьирует от бледно-желтого до светло-оранжевого, задняя половина тела может иметь зеленоватый оттенок. Кончик головы заострен, и часто имеет ярко-оранжевый цвет. *C. simula* довольно широко распространен вдоль побережья Японии. Однако в последние годы его все чаще стали обнаруживать и у побережья Испании, Италии (Kajihara et al. 2013) и Великобритании (Turner et al., 2018). Тернер и соавторы (Turner et al., 2018) охарактеризовали данный вид немертин, как инвазивный. Согласно исследованию Асакавы с соавторами (Asakawa et al., 2013), около 80% особей данного вида немертин, собранных в заливе Хиросима с 1998 по 2005 г., обладало экстремальными уровнями содержания ТТХ. Для немертин, собранных у побережья Великобритании также характерны сверхвысокие концентрации ТТХ, сопоставимые с таковыми даже у рыб фугу (Turner et al., 2018). В настоящей работе объектом исследования стал локальный, характерный для Приморского края вид *Cephalothrix cf. simula* (рис. 1), также обладающий высокими концентрациями ТТХ (Vlasenko, Magarlamov, 2020). Данный факт вызывает большой интерес к виду, как к модельному объекту для исследований, направленных на расширение представления об использовании ТТХ немертинами

при помощи изучения локализации ТТХ в их теле, отслеживания процесса становления ТТХ-содержащих структур.

1.4.1 Морфология тканей немертин из рода Cephalothrix

Стенка тела и мышцы. Стенка тела *C. cf. simula* состоит из эпидермиса, слоя ЭЦМ, нейронного слоя и нескольких мышечных слоев: наружной диагональной мускулатуры, наружной кольцевой мускулатуры, внутренней кольцевой мускулатуры и продольной мускулатуры (Kajihara et al. 2013; Chernyshev and Kajihara, 2019). На поперечных срезах толщина эпидермиса варьирует от 50 до 85 мкм. Эпидермальные неклеточные включения отсутствуют. Слой ЭЦМ имеет толщину от 10 до 40 мкм, образуя отчетливую зону между эпидермисом и наружным кольцевым мышечным слоем стенки тела, не имеет сетчатой структуры. Данные о клеточном составе интегумента немертин в целом имеют фрагментарный, разрозненный характер, а о клеточном составе интегумента немертин из рода *Cephalothrix*, в частности, известно мало. Имеющиеся об интегументе немертин данные сделал попытку объединить Норенбург (Norenburg, 1985). Согласно классификации, предложенной Норенбургом, интегумент немертин, в том числе и палеонемертин, содержит один тип ресничных клеток и три типа железистых клеток: слизистые (мукоидные), серозные и бациллярные, отличающиеся друг от друга размером, формой и характером секрета. Ресничные клетки имеют крупное ядро, находящееся в базальной части или в средней трети клетки (Oaks, 1978; Norenburg, 1985). Базальная часть сужается и образует узкую ножку, прикрепляющуюся к пластинке ЭЦМ. На апикальной поверхности ресничных клеток расположено большое количество микроворсинок и ресничек. Сама апикальная поверхность обычно расширена для максимального увеличения площади поверхности. Слизистые (мукоидные) клетки как правило имеют неправильную форму. Ядро может располагаться как на периферии клетки, так и в центральной ее части. Секрет этих клеток представляет собой гранулы, содержащие «фибриллярный», согласно Норенбургу, материал. Клетки

формируют шейки, которые проходят через эпидермис и выводят секрет на его поверхность.

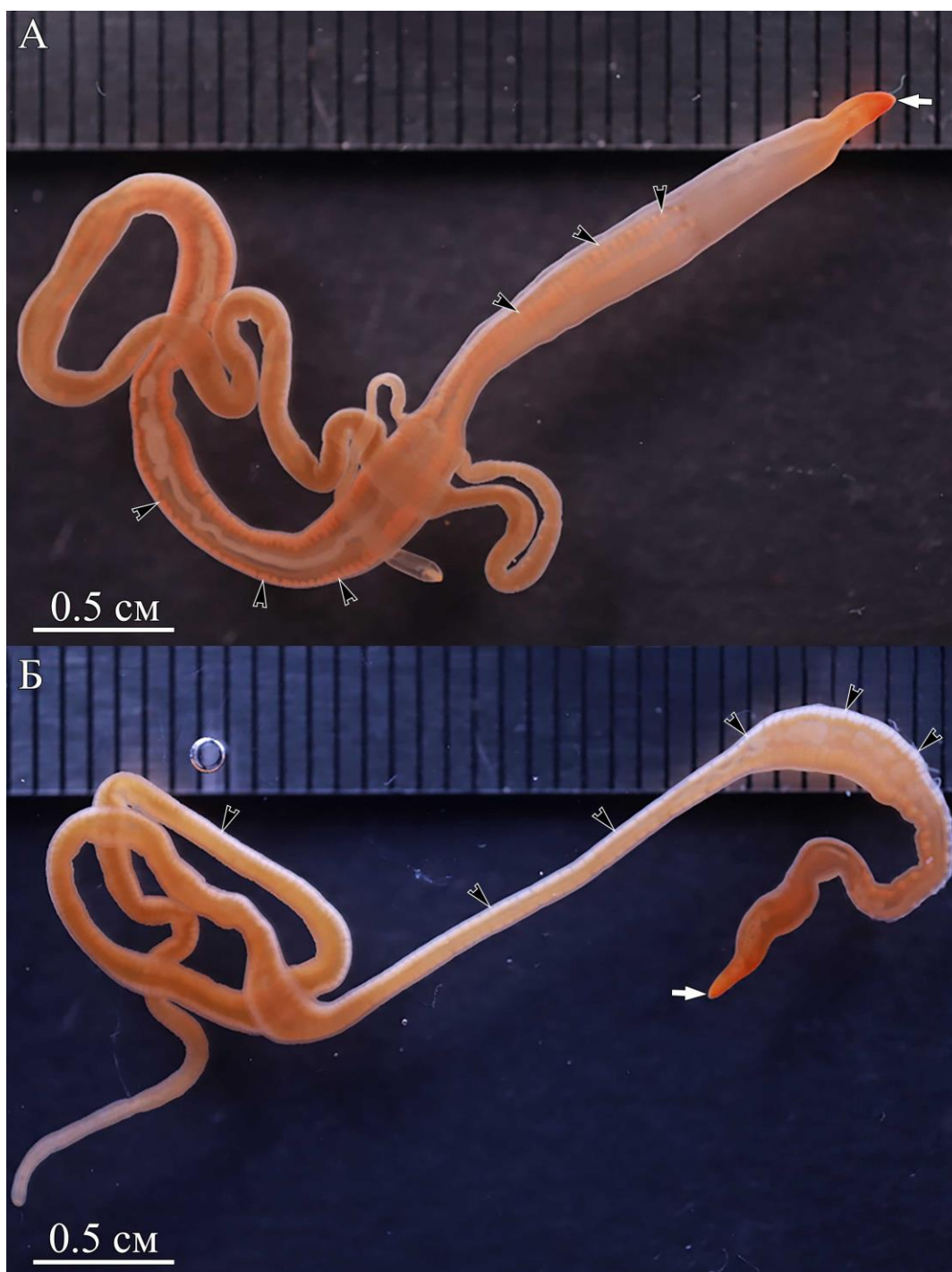


Рисунок 1 – Особи *Cephalothrix* cf. *simula*, собранные в б. Спокойная Японского моря. Хорошо различим кончик головы ярко-оранжевого цвета (белые стрелки) и зрелые гонады (черные стрелки). **А** – самка, **Б** – самец.

Серозные клетки могут иметь различную форму: от округлой до суженной овальной или бокаловидной. Ядро крупное, имеет вытянутую форму, расположено

обычно в базальной части (Norenburg, 1985; Schwartz, Norenburg, 2005). Основной объем клетки занимает, как правило, одна крупная ограниченная мембраной секреторная гранула с гомогенным материалом. Бациллярные клетки не имеют определенной формы. Ядро находится или на периферии, или в центре клетки. Секрет представляет собой гранулы, равномерно распределенные в цитоплазме. Гранулы могут иметь различную форму: от овальной вытянутой до угловатой прямоугольной формы. В апикальной части клетки имеют длинные выводные протоки, через которые происходит высвобождение секрета на поверхность эпидермиса. Гранулы высвобождаются поодиночке и быстро гидратируются (Oaks, 1978).

Хобот. Хобот представляет собой орган охоты немертин, лежащий в специализированной полости – ринхоцеле. Ринхоцель простирается примерно на 1/3 длины тела. Эпителий ринхоцеля является ресничным, не содержит желез. Сам хобот состоит из железистого эпителия, наружного кругового мышечного слоя, внутреннего продольного мышечного слоя и тонкого эндотелия. Хобот при охоте способен выворачиваться из ринхоцеля, в результате чего, на поверхности вывернутого хобота оказывается железистый эпителий. Данных о клеточном составе железистого эпителия хобота для *Cephalothrix* и палеонемертин в целом на сегодняшний день имеется довольно мало, хотя он подробно описан для немертин из других классов (Montalvo et al., 1998; Junoy et al., 2000; Chernyshev et al., 2013). Железистый эпителий хобота у немертин содержит сенсорные клетки, поддерживающие (интерстициальные) клетки и железистые клетки (Chernyshev et al., 2013). Сенсорные клетки встречаются у различных видов палео- и гетеронемертин (Ling, 1971; Turbeville, 1991, 2006; Montalvo et al., 1996), и имеют сходную морфологию. Это биполярные клетки, содержащие единственную ресничку, окруженную кольцом из шести–восьми выступающих микроворсинок (Chernyshev et al., 2013). Интерстициальные клетки также могут встречаться у разных видов. Эти клетки содержат на своей поверхности множество микроворсинок и располагаются между железистыми клетками (Montalvo et

al.,1996). В железистом эпителии хобота различных видов немертин может встречаться различное количество типов железистых клеток. Например, у *Hubrechtella juliae* и *Paranemertes peregrina* встречается 4 различных клеточных типа (Magarlamov et al., 2021). Наибольшее количество типов железистых клеток (10 типов) описано для эпителия хобота гетеронемертины *Riseriellus occultus* (Montalvo et al., 1998; Junoy et al., 2000). Монтальво и соавторы (Montalvo et al., 1998) выделили 4 типа (G1–G4). Также авторы описали две железистые системы – система типа А и система типа Б (с англ. «type A and type B glandular systems»), каждая из которых состоит из 2 типов железистых клеток. Данные железистые системы у немертин, предположительно, связаны с функцией охоты. Наиболее примечательной представляется система типа Б. Одним из типов клеток, входящих в нее, являются псевдокнид-содержащие клетки (G3 type, согласно авторам). Дистальная часть цитоплазмы этих клеток содержит псевдокниды – структуры, способные наподобие нематоцист Cnidaria выстреливать нить. Псевдокниды – одни из немногих структур, описанных и для хобота *C. cf. simula*: согласно Магарламову и соавторам (Magarlamov et al., 2021), зрелые псевдокниды способны высвобождаться из клеток на апикальную поверхность эпителия хобота, где они собираются в пучки по несколько штук. Псевдокниды, предположительно, способны прикрепляться к телу жертвы немертин при охоте, надежно фиксируя хобот на нем. Вторым типом клеток (G4), входящим в железистую систему типа Б, продуцирует секрет, который, вероятно, способен усиливать адгезивный эффект псевдокнид. В последующем, в работе Джуной (Junoy et al., 2000) для *R. occultus* было описано еще 6 типов железистых клеток (G5–G10). Авторы работы условно выделили 3 категории клеток, различающихся по форме и секреторной организации: бациллярные, гранулярные и мукоидные. Каждая категория железистых клеток включает по 2 типа, различающихся формой, размером и содержимым секреторных гранул. Бациллярные клетки (G5–G6) имеют веретенообразную форму. В дистальной области тела клетки содержат крупное овальное ядро. Каждая клетка имеет широкую в дистальной области шейку,

которая сужается в проксимальной части и достигает поверхности эпителия. Шейки часто переплетаются друг с другом, вклиниваясь между телами интерстициальных клеток. В проксимальной области шейки заполнены гранулами бациллярной формы. Гранулярные клетки (G7–G8) характеризуются грушевидной формой, их тела лежат в основании эпителия. Эти клетки имеют крупное хорошо развитое ядро. Форма и расположение клеточных шеек в гранулярных клетках аналогичны описанным выше для бациллярных. Форма гранул клеток данного типа варьирует от сферической до яйцевидной, изредка встречаются гранулы иной формы. Слизистые (мукоидные) клетки (G9–G10) обычно имеют бокаловидную форму. Ядро и синтетические органеллы расположены под массой секреторных гранул. Сами гранулы занимают дистальные две трети тела клетки. Гранулы плотно упакованы, и их содержимое представляет однородный электронно-плотный или паракристаллический материал.

Головная железа. Головная железа у *C. cf. simula* занимает основное пространство предротового отдела тела и представлена 4-мя долями (две дорзальные и две вентральные доли). Многочисленные протоки железистых клеток головной железы открываются на поверхность эпидермиса предротового отдела (Kajihara et al., 2013). О клеточном составе головной железы у *C. cf. simula* в литературе данных нет, однако, согласно Феррарис (Ferraris, 1979), у немертины *Procephalothrix spiralis* (= *Cephalothrix spiralis*) в головной железе присутствуют 3 типа клеток, различающихся при гистохимическом окрашивании. Клетки I типа (MA1) являются основным клеточным типом головной железы. Размер ядер клеток варьирует от 5 до 6 мкм. Ядра имеют большое ядрышко неправильной формы. Содержимое клеток окрашивается в желтый или желто-коричневый цвет альциановым синим и альциановым желтым. Клетки II типа (MA2) содержат ядра диаметром 5–6 мкм с маленьким ядрышком. Содержимое клеток окрашивается в глубокий, желто-коричневый или синий цвет альциановым синим и альциановым желтым. Ядра клеток III типа (S) имеют диаметр около 5 или 6 мкм и содержат крупное ядрышко, состоящее из крупнозернистого хроматина. Поскольку эти

клетки не поддавались окрашиванию альциановым синим или альциановым желтым, их окрашивали ядерным быстрым красным. При таком варианте окрашивания гомогенный материал цитоплазмы может приобретать различный цвет: от розового до серого.

Пищеварительная система. Данные о пищеварительной системе немертин ограничены, в основном, общим описанием строения органов пищеварения, а также данными, полученными при гистохимическом окрашивании срезов различных отделов пищеварительной системы, позволяющими судить об особенностях физиологии пищеварения (Jennings, Gibson, 1969; Gibson, 1972a). Так, пищеварительная система палеонемертин включает два региона, разделяемые как физиологически, так и гистологически: передняя кишка и кишечник. Передняя кишка выстлана ресничным эпителием, в котором выделяют ресничные клетки и два основных типа железистых клеток, один из которых продуцирует кислые мукополисахариды, а другой содержит карбоангидразу, обеспечивающую образование кислоты. Кишечник немертины – самая длинная часть пищеварительного тракта и простирается от места его соединения с передней кишкой до ануса на заднем конце тела. Стенка кишечника состоит из эпителиальных клеток (энтероцитов) и железистых клеток, расположенных в один слой на тонкой базальной мембране (Gibson, 1972a). Железистые клетки равномерно распределены по кишечному эпителию. Они в изобилии присутствуют в передней части кишечника, однако их количество постепенно уменьшается от передней части к задней. Железистые клетки содержат большое количество ферментов (эндопептидаз), которые расщепляют пищу на мелкие фрагменты, для последующего поглощения энтероцитами (Jennings, 1969).

Кровеносная и выделительная системы. Кровеносная система немертин относится к замкнутому типу. У видов, относящихся к семейству Cephalothricidae, она состоит из пары боковых кровеносных сосудов, проходящих рядом с кишечником (Kajihara et al., 2013). Для *C. simula* характерным является наличие

ринхоцельного сосуда (Kajihara et al., 2013). У *Cephalothricidae* выделительная система состоит из большого количества отдельных нефридий, тесно связанных с боковыми кровеносными сосудами (Bartolomaeus, Döhren, 2010). Каждый нефридий содержит на конце луковицу грибовидной формы, выступающую в просвет кровеносного сосуда и ведущую наружу через выводной проток.

Нервная система. У *C. cf. simula* нервная система представлена головным мозгом, который имеет кольцевое строение и окружает ринхоцель, а также боковыми нервными стволами, расположенными в продольном мышечном слое стенки тела (Чернышев, 2011). Головной мозг и нервные стволы не имеют миофибриллярных волокон. Нейропиль отделен от ганглиозной области внутренней неврилеммой. Наружная неврилемма характеризуется небольшой толщиной (Kajihara et al., 2013).

1.4.2 Личиночное развитие *Cephalothrix*

На сегодняшний день существует ряд работ о развитии различных видов палеонемертин, включая относящихся к *Cephalothrix* (Smith, 1935; Iwata, 1960; Maslakova et al., 2004; Maslakova, Hiebert, 2014; Bartolomaeus et al., 2014). Палеонемертины обладают пелагической планулоподобной личинкой, которая долгое время плавает в толще воды (Smith, 1935; Iwata, 1960) и питается относительно крупной добычей (Maslakova, Hiebert, 2014). Известно, что метаморфоз планулоподобных личинок происходит постепенно и приводит к формированию ювенильных особей, имеющих взрослые органы или их зачатки (Smith, 1935; Maslakova et al., 2004; Bartolomaeus et al., 2014). И хотя развитие личинок *Cephalothrix* до поздних стадий описано относительно подробно, работ, в которых личинки удавалось культивировать достаточное время для формирования ювенильных особей, на сегодняшний день не встречается.

В 1960 году Ивата (Iwata, 1960) описал личиночное развитие немертины *Procephalothrix simulus* (= *Cephalothrix simula*). Личинки удалось культивировать в течение 41 сут. Первое полярное тельце формируется примерно через 40 мин после

оплодотворения яйцеклетки. Далее спиральное дробление приводит к образованию уплощенной бластулы. Примерно через 25 ч после оплодотворения личинки выходят из яйцевых оболочек. На сроке 31 ч личинки имеют хорошо различимые среднюю кишку и стомодеум. Бластопор расположен на границе между ними. Личинки имеют сферическую форму, на апикальном конце личинки располагается длинный султанчик. Личинка плавает по прямой линии султанчиком вперед. На сроке 43 ч заканчивается формирование личиночного эпидермиса. Эпидермис состоит из ресничных клеток, содержащих крупные ядра. Граница между эпидермисом и слоем мезодермы становится нечеткой. Тело личинки несколько удлиняется, а стомодеум постепенно смещается ближе к переднему концу тела. На сроке 46 ч личинка удлиняется еще сильнее и достигает примерно 220 мкм в длину и 160 мкм в ширину, приобретает тускло-желтый цвет. Султанчик на данном сроке достигает в длину около 150 мкм. На сроке 50 ч на заднем конце тела становится различим каудальный циррус. Через 61 ч у личинки формируется мозговая пластинка, задние дорсальные и вентральные ганглии, а через 67 ч формируется один латеральный нерв, отходящий от вентрального ганглия. Через 85 ч формируются глаза темно-коричневого цвета, латеральные циррии. На данном сроке эпидермис разрастается, содержит множество клеток с мелкими ядрами. В эпидермисе появляется небольшое количество крупных железистых клеток. Дифференцируются дорсальная и вентральная спайки головного мозга, формируются латеральные нервы, проходя вдоль боковых сторон стомодеума и кишки. Через 95 ч длина личинки увеличивается до 330 мкм. На последующих исследованных сроках развития автор работы не наблюдал существенных изменений в строении личинок. Несмотря на относительно подробное описание процесса развития, Ивата (Iwata, 1960) не дает описание многих его аспектов, таких как формирование дефинитивного эпидермиса, которым может замещаться провизорный в процессе развития личинки (Чернышев, 2011); в работе также отсутствует описание процесса формирования личиночных нефридиев. Строение провизорного эпителия и замещение его на дефинитивный было изучено у личинок

некоторых гоплонемертин (Магарламов, Чернышев, 2009; Maslakova, von Döhren, 2009; Niebert et al., 2010). Дефинитивный эпидермис был выявлен у личинок *Callinera* sp., и предполагается его наличие и у других палеонемертин (Чернышев, 2011). О строении личиночных нефридиев палеонемертин стало известно относительно недавно (Bartolomaeus et al., 2009; Bartolomaeus, von Döhren, 2010; Bartolomaeus et al., 2014). У личинок *Carinoma mutabilis*, *Cephalothrix filiformis* и *Cephalothrix oestrymnicus* были обнаружены «головные почки» – пара протонефридиев простого строения. У *Cephalothrix* они располагаются на уровне стомодеума и каждый протонефридий состоит из трех терминальных клеток, трех протоковых клеток и одной нефропорной клетки. Все терминальные клетки участвуют в формировании сложной фильтрационной структуры. Поскольку нефропорные клетки проникают в эпидермис, была выдвинута гипотеза об субэпидермальном развитии протонефридиев. Авторы предполагают, что у *Cephalothrix* протонефридии не исчезают в ходе метаморфоза и трансформируются в преоральные нефридии взрослых немертин.

Резюмируя данные обзора литературы, важно отметить, что несмотря на достаточно большой массив данных о феномене аккумуляции и использовании ТТХ животными, данные о тканевой и клеточной локализации токсина, морфологии ТТХ-содержащих структур встречаются нечасто, и получены, в основном, на рыбах фугу и тритонах с использованием световой микроскопии. Относительная сложность анатомической организации этих животных затрудняет их использование в качестве объекта для исследований подобного плана. Альтернативным модельным объектом могут являться высокотоксичные немертины *Cephalothrix* cf. *simula*, с одной стороны, имеющие более простое строение, нежели позвоночные, а с другой - располагающие всеми основными системами органов (нервная, кровеносная, выделительная, пищеварительная и т.д.). Эти животные примечательны еще и тем, что их довольно долгое время (год и более) удается содержать в неволе, что позволяет упростить экспериментальный процесс.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

Сбор немертин. Особи *C. cf. simula* и *K. alborostrata* были собраны в ризоидах бурых водорослей *Saccharina* sp. в бухте Спокойная (Японское море) (42.7090N, 133.1809E) в июле и августе 2021–2023 гг на глубине до 3 м. Температура воды в местах сбора составляла 16–21,7°C. Все собранные образцы были любезно определены д.б.н. А.В. Чернышевым (НИЦМБ ДВО РАН), экспертом в области зоологии немертин. Червей содержали в аэрируемых аквариумах с проточной морской водой в течение двух недель ($t=17^{\circ}\text{C}$).

Культивирование личинок. Выброс гамет у немертин стимулировали резким повышением температуры. Для этого каждую особь помещали в отдельные чашки Петри с фильтрованной через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (Merck Millipore, США) морской водой температурой 26°C. Гаметы собирали в пробирки с фильтрованной морской водой. Яйцеклетки и сперму *C. cf. simula* использовали для постановки развития. Яйцеклетки *K. alborostrata* использовали для дальнейшего кормления личинок *C. cf. simula*. Все дальнейшие работы с гаметами и личинками проводили в личиночном боксе при температуре 18–19°C. Оплодотворение яйцеклеток *C. cf. simula* осуществляли в чашках Петри с фильтрованной через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (Millipore, США) морской водой, ход дробления и дальнейшего развития наблюдали при помощи микроскопа Olympus IX83 (Olympus, Япония) и бинокля Zeiss Stemi 305 (Carl Zeiss, Германия). Через 8 ч личинки пересаживали в стеклянные чашки объемом 400 мл и содержали там до выхода личинок из яйцевых оболочек. После выхода из яйцевых оболочек личинки рассаживали в отдельные чашки Петри по 30 особей. Для кормления личинок использовали яйцеклетки *K. alborostrata*. Для этого в каждую чашку Петри с личинками *C. cf. simula* добавляли по 30–40 яйцеклеток. Для выявления момента начала питания наблюдали за пищевым поведением личинок, каждые 24 ч подсчитывали количество добавленных

яйцеклеток. После этого убирали старые яйцеклетки дозатором и добавляли новые. После начала питания личинок продолжали кормление аналогичным образом, ведя подсчет съеденных ими яйцеклеток. Также каждые 24 ч подсчитывали количество личинок в каждой чашке для поправки на возможное поедание личинками сородичей.

2.2 Микроскопические исследования

Световая и трансмиссионная электронная микроскопия. Образцы фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида на фосфатно-солевом буфере (ФСБ, рН 7,4) в течение 15 мин для личинок и 1 ч для тканей взрослых особей с последующими тремя промывками в ФСБ. Постфиксацию проводили 1% водным раствором OsO₄ (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин. Затем материал обезвоживали в этиловом спирте и ацетоне и заливали в смесь эпона (Sigma-Aldrich, США) и аралдита (Sigma-Aldrich, США). Полутонкие (толщиной 700 нм) и ультратонкие (65 нм) срезы изготавливали с использованием ультрамикротомы Ultracut E (Reichert, Германия). Полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим (Sigma, США) и анализировали с помощью микроскопа Zeiss Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). Ультратонкие срезы контрастировали растворами уранилацетата (Sigma-Aldrich, США) и цитрата свинца (Sigma-Aldrich, США). Ультраструктуру препаратов исследовали с помощью электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). Полученные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения Adobe Photoshop 2019 (Adobe, Inc., США).

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Образцы личинок и тканей взрослых червей фиксировали в 4% параформальдегиде на ФСБ в течение 1 ч, промывали трижды ФСБ в течение 15 мин при комнатной температуре. Личинки для маркирования антителами использовали целиком. Для изучения локализации ТТХ у взрослых червей делали криосрезы различных отделов тела. Образцы помещали в криосреду Leica OCT cryocompound tissue freezing medium (Leica, Германия) и изготавливали криосрезы толщиной 10 мкм с помощью микротомы

Thermo NM 560 (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные криосрезы и образцы личинок промывали в ФСБ с Полисорбатом 20 (с англ. Tween-20) (ФСБ-Т), инкубировали в 1% растворе Тритона-х100 на ФСБ в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем препараты промывали в ФСБ и помещали в блокирующий раствор 5% бычьего сывороточного альбумина (БСА) на ФСБ на 1 сут при температуре 4°C. Для выявления ТТХ использовали раствор первичных антител к ТТХ (поликлональные антитела кролика) (Genetex, США) в разведении с ФСБ 1:25. Для детекции структур цитоскелета использовали антитела к α -тубулину (поликлональные антитела мыши) (Genetex, США) в разведении с ФСБ 1:1000. Препараты инкубировали со смесью первичных антител в течение 2 сут при 4°C, затем проводили отмывку в ФСБ-Т и добавляли смесь вторичных антител Alexa 488 goat anti-mouse (антитела вторичные козы к мышинному иммуноглобулину G (IgG) (Invitrogen, США) в разведении с ФСБ 1:500 и Alexa 647 goat anti-rabbit (антитела вторичные козы к кроличьему иммуноглобулину G (IgG) (Invitrogen, США) в разведении с ФСБ 1:500, инкубировали в течение 1 сут при 4°C. Далее образцы отмывали раствором ФСБ-Т и докрашивали ядерным красителем 4', 6-диамидино-2-фенилиндолом, дигидрохлорид (с англ. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)) (ДАПИ) (Thermo Fisher Scientific, США). Препараты заключали в поливиниловый спирт (Mowiol 4-88) (Sigma-Aldrich, США). В качестве отрицательного контроля использовались образцы, не маркированные первичными антителами. Полученные препараты личинок маркировали антителами по аналогичной методике. Препараты анализировали на конфокальном микроскопе Zeiss LSM-780 (Carl Zeiss, Германия). Полученные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения Adobe Photoshop 2019 (Adobe, Inc., США). Поскольку взрослые особи *C. cf. simula* содержали большое количество ТТХ и все их ткани содержали ТТХ-позитивную метку, в работе для них было проведено ранжирование интенсивности метки в различных клетках и тканях. Интенсивность флуоресцентной метки оценивали с помощью Adobe Photoshop 2019 (Adobe, Inc., США). Интенсивность оценивали путем расчета средней яркости пикселей для

выбранной области. При этом за низкую интенсивность принимали яркость метки в мышцах, а за высокую — яркость метки в фагосомах кишечных энтероцитов. Интенсивность флуоресценции условно делили на 3 уровня: интенсивная метка, метка средней интенсивности, слабая метка.

Классификация выявленных клеточных типов. Поскольку в имеющихся на сегодняшний день работах, посвященных описанию клеточных типов в различных органах и тканях немуртин, отсутствует единая классификация железистых клеток, а сами данные весьма разрознены, для унифицирования классификации и удобства восприятия в настоящей работе использовали терминологию, введенную Норенбургом (Norenburg, 1985) с изменениями Переверзевой и соавторов (Pereverzeva et al., 2022). Согласно данной терминологии, было выделено 3 типа железистых клеток:

1. Гранулярные клетки содержат гранулы различной формы (сферические, овальные, палочковидные) с гомогенным или дискретным, часто паракристаллическим содержимым.
2. Мукоидные клетки содержат округлые или овальные гранулы с различной степенью упакованным фибриллярным материалом.
3. Серозные клетки содержат одну крупную гранулу, секрет которой представляет собой гомогенный материал.

2.3 Высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией

Приготовление экстрактов для выявления ТТХ методом ВЭЖХ-МС/МС. Для анализа содержания ТТХ в образцах были получены тотальные экстракты 4 взрослых червей (двух особей неустановленного пола и отнерестившихся самца, и самки *C. cf. simula*). Немуртин предварительно анестезировали, помещая на чашку Петри с фильтрованной морской водой и добавляя к ним 7% водный раствор хлорида магния. Для приготовления экстрактов тела *C. cf. simula* к каждому червю добавляли 0,1% раствор уксусной кислоты на 70% водном растворе метанола в

объемном соотношении 1:10. Полученные образцы гомогенизировали ручным гомогенизатором в течение 5 мин, затем подвергали ультразвуковой обработке с помощью ультразвукового гомогенизатора HD 2070 (Bandelin Sonopuls, Германия) в течение 15 мин (частота – 20 кГц, амплитуда – 228 мкм, рабочий цикл – 0,8 с, интервал работы – 0,2 с). Получившийся гомогенат центрифугировали ($14000 \times g$, 10 мин, 4°C), супернатант отбирали, выпаривали досуха в роторном испарителе (Labconco, США) в течение 4 ч при 60°C . Получившейся осадок растворяли в 0,1% водном растворе уксусной кислоты, фильтровали при помощи концентраторов Vivaspin turbo 4 (отсечение по молекулярной массе 3 кДа (Sartorius, Германия)). Получившиеся образцы замораживали при -20°C для дальнейших исследований. Для измерения содержания ТТХ в яйцеклетках *C. cf. simula* брали 3 яйцеклетки из одного вымета. Для данной процедуры с личинками брали по 5 личинок интересующих стадий развития из разных чашек Петри. Яйцеклетки и личинки помещали по одной в пробирку типа Эппендорф объемом 15 мл, добавляя 100 мкл раствора 0,1% уксусной кислоты на 70% водном растворе метанола. Таким образом, каждый анализируемый в последующем образец представлял собой экстракт одной личинки или яйцеклетки. Для измерения содержания ТТХ в яйцеклетках *K. alborostrata* подсчитывали количество гамет в 1 мл морской воды в камере Горяева и приливали к ним 1 мл 1% уксусной кислоты на 70% водном растворе метанола. Образцы гомогенизировали при помощи ультразвукового гомогенизатора HD 2070 (Bandelin Sonopuls, Германия) 1 мин при минимальной мощности (частота – 20 кГц, амплитуда – 228 мкм, рабочий цикл – 0,8 с, интервал работы – 0,2 с). Получившийся гомогенат центрифугировали ($8500 \times g$, 20 мин, 4°C). Супернатант выпаривали на роторном испарителе (Labconco, США) в течение 2 ч при 60°C . Растворяли экстракты в 0,1% водном растворе уксусной кислоты.

ВЭЖХ-МС/МС анализ. Определение содержания ТТХ в исследуемых экстрактах при помощи ВЭЖХ-МС/МС (Malykin et al., 2021, 2023). Необработанные данные были получены П. В. Веланским, обработка данных была произведена автором настоящего исследования с использованием программного

обеспечения Microsoft Office Excel 2019 (Microsoft, США). ВЭЖХ система включала две пары насосов LC-30, автосэмплер SIL-30AC, термостат СТО-20А и системный контроллер SCL-20А, масс детектор – тройной квадрупольный масс-спектрометр LCMS-8060 (Shimadzu Europa, Германия) с ионизацией распылением в электростатическом поле (ESI). Разделение проводили с использованием колонки SeQuant ZIC HILIC (150×2,1 мм, 5 мкм) (Merck, Германия) при 40°С со скоростью потока 0,2 мл/мин. Применялись следующие мобильные фазы для бинарного градиентного элюирования: 5мМ аммония и 8мМ муравьиной кислоты в растворе ацетонитрил: вода (9:1) (А) и 10 мМ аммония и 20 мМ муравьиной кислоты в воде (Б). Элюирование проводили следующим образом: 0–4,3 мин 15% Б; 16,0 мин 25% Б; 16.0–20 мин 50% Б. Объем образца составлял 1 мкл. Перед аналитической колонкой через 2-позиционный 6-портовый кран устанавливали предколонку SeQuant ZIC-HILIC (20×2,1 мм, 5 мкм) (Merck, Германия). Через 4,4 мин кран переключали и промывали предколонку обратным током изопропанола (4,4–7 мин) и воды (7–14 мин) со скоростью потока 0,2 мл/мин. Через 17 мин кран переключали обратно. Масс-спектрометр работал в режиме сканирования (m/z 200–1000) и мониторинга множественных реакций (с англ. Multiple reaction monitoring (MRM)). Параметры источника ионов: температура интерфейса – 280°С, температура линии десольватации – 250° С, потока распыляющего газа (N₂) – 3 л/мин, поток осушающего газа (N₂) – 3 л/мин, нагревающий газ (сухой воздух) – 17 л/мин. Количество ТТХ рассчитывали с использованием калибровочной кривой по внешнему стандарту, полученной при анализе стандартных образцов ТТХ (Alomone Labs Ltd., Израиль). Критерием обнаружения токсина являлось соотношение $S/N > 3$ пика по основному MRM-переходу, относительная интенсивность пика вспомогательного иона $> 4\%$, время выхода аналита приведено в Таблице 1 (табл. 1). Для обнаружения ТТХ в исследуемых образцах немертин использовали значения параметров (массы молекулярных ионов, MRM-переходы и энергии столкновения) описанных в работах Кудо с соавторами (Kudo et al., 2012), Бэйн с соавторами (Vane et al., 2014), Пуилинги с соавторами (Puilingi et al.,

2015) и Тёрнера с соавторами (Turner et al., 2017). Массы молекулярных ионов, MRM-переходы и энергии столкновения приведены в таблице 1.

Таблица 1 – MRM-переходы (мониторинг множественных реакций), энергия столкновения и время удерживания тетродотоксина (ТТХ), обнаруженного в экстрактах немертин *Cephalothrix cf. simula*.

| Анализируемое вещество | Время удерживания*, мин | MRM-переходы* | Энергия столкновения, эВ |
|------------------------|-------------------------|---------------|--------------------------|
| Тетродотоксин (ТТХ) | 14,56 – 15,79 | 320,1>302,1 | 25, 38 |
| | | 320,1>162,1 | 36,949–55,423 |

* согласно Vane et al., 2014

В оптимизированных условиях ВЭЖХ-МС/МС была проведена проверка линейности метода, расчет степени извлечения, предела количественного определения, предела детекции. Валидация метода проводилась с использованием стандартных растворов ТТХ в режиме MRM. Линейность метода сохранялась в диапазоне от 0,6 нг/мл до 100 нг/мл, среднее значение степени извлечения в диапазоне от 1 нг/мл до 100 нг/мл составляло 98,4%, предел количественного определения (LoQ) был равен 0,6 нг/мл, предел детекции (LoD) был равен 0,2 нг/мл, относительное стандартное отклонение составляло 4,5–14,6%.

2.4 Статистический анализ

Анализ исследованных в работе выборок содержания ТТХ в яйцеклетках и личинках проводили критерием Краскела–Уоллиса (ранговый аналог однофакторного дисперсионного анализа – ANOVA) и парным критерием Манна–Уитни (ранговый аналог t-теста для независимых выборок). Несмотря на использование непараметрических критериев, значения измеренных показателей в

работе выражены в виде средних со стандартным отклонением для удобства восприятия результатов. Все представленные коэффициенты корреляции получены при уровне значимости $p \leq 0,05$. Данные проанализированы с помощью пакетов программ Microsoft Office Excel 2019 (Microsoft, США) и STATISTICA 7.0 (Dell, Inc., США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Наличие и содержание ТТХ у личинок и взрослых немуртин

C. cf. simula

Анализ наличия и содержания ТТХ был проведен у 4 взрослых особей: у двух особей неидентифицированного пола, у самца и самки после нереста, использованных для получения гамет. Анализ также проводили для яйцеклеток и личинок на различных стадиях развития (рис. 2).

Методом ВЭЖХ-МС\МС в тотальных экстрактах тела двух *C. cf. simula* неидентифицированного пола был выявлен ТТХ: у особи 1 содержание ТТХ составило 3369,57 нг, а у особи 2 – 2905,5 нг. У самца (3) и самки (4), использованных для постановки развития, также был выявлен ТТХ: 35102,5 нг и 15606,3 нг соответственно.

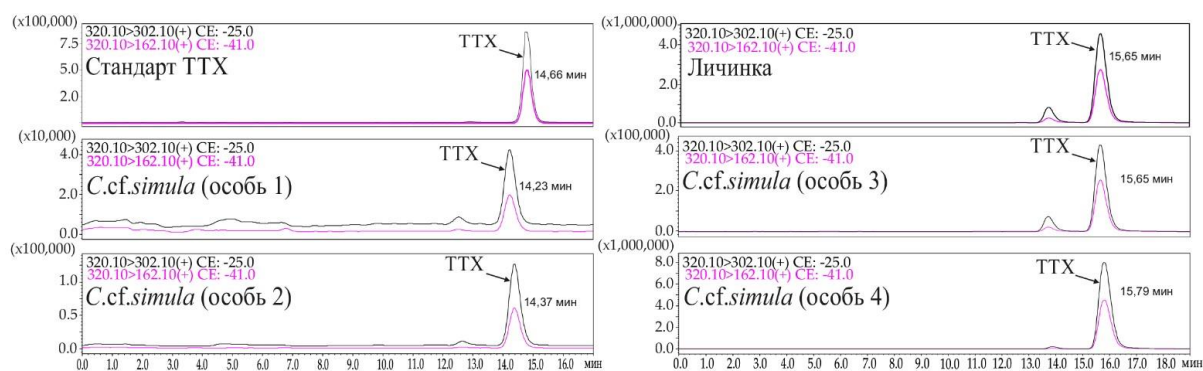


Рисунок 2 – Хроматограммы, полученные методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) стандарта тетродотоксина (ТТХ) и ТТХ пяти экстрактов, полученных из немуртин *Cephalothrix cf. simula*. Черная и розовая линии показывают два различных MRM-перехода (описанных на каждой хроматограмме). По оси X указано время выхода анализируемого вещества в минутах (мин), по оси Y указана интенсивность в процентах.

Яйцеклетки и личинки немертин содержали от 4,401 нг до 11,951 нг ТТХ. И хотя график динамики ТТХ в процессе развития, построенный по средним значениям уровня ТТХ для каждого срока с учетом стандартного отклонения, демонстрировал тенденцию к уменьшению содержания ТТХ в процессе развития личинок (приложение I, рис. 3), методами статистического анализа (критерием Краскела-Уоллиса и парным критерием Манна-Уитни) было показано, что уровень ТТХ у личинок на разных стадиях развития достоверно не различался и совпадал с таковым в яйцеклетках ($p \leq 0,05$, доверительный интервал $\pm 95\%$).

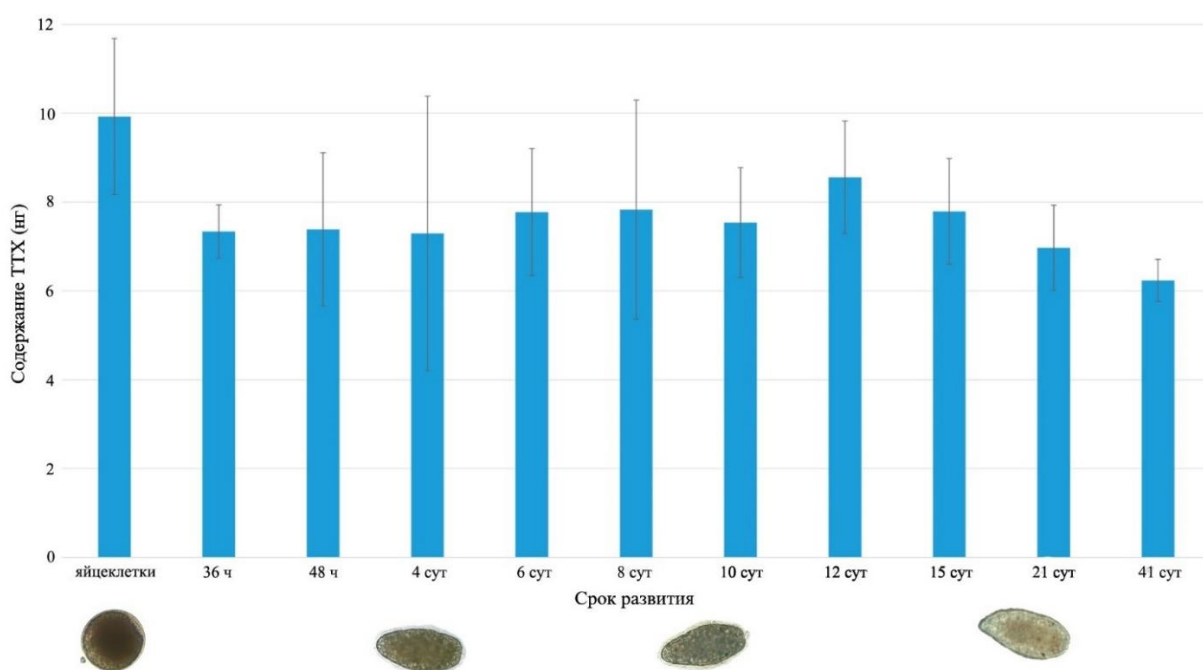


Рисунок 3 – Содержание тетродотоксина (ТТХ) в яйцеклетках и личинках *Cephalothrix cf. simula* на различных сроках развития. По оси X указан срок развития в часах и сутках, по оси Y указано содержание ТТХ в нанограммах (нг).

3.2 Развитие личинок *C. cf. simula*

Развитие личинок *C. cf. simula* исследовали на светооптическом уровне. *C. cf. simula* обладает внешним оплодотворением: во время нереста особи обоих полов выделяют гаметы в воду из гонодуктов, расположенных вдоль всего тела. В среднем, во время постановки развития, одна самка выметывала около 10000–15000 яйцеклеток. Яйцеклетки имели сферическую форму, около 50–80 мкм в диаметре. Оплодотворенные яйцеклетки увеличивались в размерах до 100 мкм. Полярное тельце формировалось на одном из полюсов оплодотворенной яйцеклетки через 0,5–1 ч. Дробление наблюдалось через 1,5–2 ч. К концу эмбрионального развития сферические эмбрионы диаметром 120 мкм активно вращались вокруг своей оси внутри яйцевых оболочек. Выход из яйцевых оболочек происходил спустя 22–24 ч. Только что вылупившиеся личинки имели сферическую или слегка овальную форму, около 130 мкм в диаметре (рис. 4А). На апикальном полюсе личинки располагался хорошо сформированный султанчик длиной около 100–120 мкм. Движение только что вылупившихся личинок не было направленным: личинки активно вращались вокруг своей оси в толще воды. Через 3–4 сут после оплодотворения личинки приобретали удлинённую овальную форму (около 130 мкм в длину и 65 мкм в ширину), имели султанчик, одну пару глаз, рот и каудальный циррус (рис. 4Б, 6А). Темные глаза округлой формы располагались в передней половине тела по бокам личинки. Рот располагался на брюшной стороне примерно в середине тела личинки (рис. 6А). Каудальный циррус длиной около 15 мкм, располагался на заднем конце личинки. Личинки плавали по прямой линии султанчиком вперед. На 3 сут личинки начали проявлять пищевую активность и питались яйцеклетками *K. alborostrata*. Одна личинка съедала примерно 4–6 яйцеклеток за 24 ч. После того, как личинка натыкалась на яйцеклетку *K. alborostrata*, она поворачивалась к ней ртом и начинала кружить вокруг. Хотя личинке часто удавалось проглотить добычу, превышающую ее собственные размеры, иногда с помощью ритмичных движений рта она была способна раздробить слишком крупную добычу на подходящие для проглатывания

фрагменты. Проглатывание добычи могло занимать от одной до нескольких минут. На 6 сут тело личинки удлинялось до 290 мкм (рис. 4В). Личинки приобретали каплевидную форму с более широким передним концом (толщиной около 100 мкм), постепенно сужаясь к заднему концу. Каудальный циррус на данном сроке не наблюдали. К концу личиночного развития (35–41 сут) тело личинок удлинялось до 340 мкм и становилось червеобразным. Длина султанчика уменьшалась до 30 мкм, а глаза перемещались на дорсальную сторону. Личинки то ползали по дну, то плавали в толще воды.

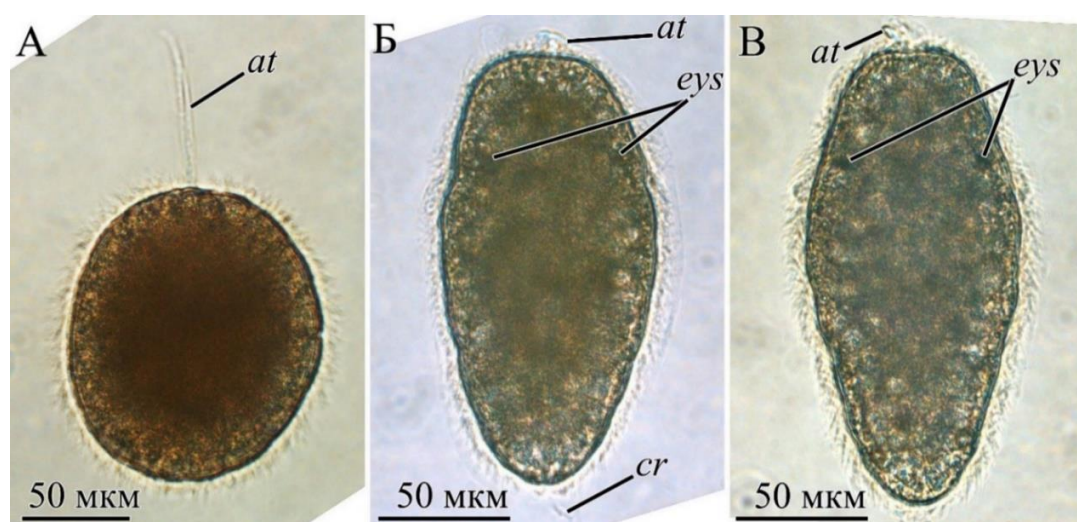


Рисунок 4 – Микрофотографии личинок *Cephalothrix cf. simula* на различных сроках развития в проходящем свете. **А** – личинка на 24 ч после оплодотворения. **Б** – личинка на 4 сут после оплодотворения **В** – личинка на 6 сут после оплодотворения. Условные обозначения: *at* – султанчик; *eys* – глаза; *cr* – каудальный циррус.

3.3 ТТХ-позитивные структуры личинок *C. cf. simula*

В яйцеклетках ТТХ был равномерно распределен по всей цитоплазме и связан с гранулярным компонентом. У эмбрионов и только что вылупившихся личинок выявляли слабую ТТХ-позитивную метку во всех клетках покровного

эпителия (рис. 5А, А1). На 4 сут, наряду со слабой меткой, наблюдаемой во всех клетках личинки, интенсивная ТТХ-позитивная метка была обнаружена в эпидермисе рядом с апикальным органом и ртом, в мускулатуре (рис. 5Б, Б1). На 6 сут и при последующем развитии личинок количество клеток с интенсивной ТТХ-позитивной меткой в эпидермисе (рис. 5В, В1) увеличивалось, в то время как количество клеток со слабой ТТХ-позитивной меткой уменьшалось. На 6 сут метка появлялась в мезодермальных клетках, локализованных на заднем конце и в середине тела личинок (рис. 5В, В1).

Апикальная железа и апикальная пластинка. На 3 сут апикальная пластинка окружена цитоплазматическими отростками (клеточными шейками) клеток апикальной железы (рис. 6А). Апикальная пластинка состоит из ресничных клеток, плотно прилегающих друг к другу (рис. 6Б). Апикальная железа занимает большую часть переднего конца личинки и состоит из гранулярных клеток (тип I). Тела гранулярных клеток I типа образуют основу апикальной железы, занимая базальную часть эпидермиса (рис. 6Б). Апикальные части гранулярных клеток I типа образуют цитоплазматические отростки (шейки), которые огибают апикальную пластинку и проходят до поверхности личинки. Тела клеток, проксимальная и центральная области шеек заполнены сферическими гранулами диаметром около 0,4 мкм (рис. 6В). Гранулы содержат паракристаллический секрет со слегка окрашенными изогнутыми фибриллами толщиной около 30 нм, окруженными гомогенным материалом с высокой электронной плотностью (рис. 5В). Гранулы в дистальной области шеек сливаются и гомогенный секрет образует цилиндрическую структуру (апикальный цилиндр) диаметром около 10 мкм, возвышающуюся на 12–20 мкм над поверхностью эпителия (рис. 6Б, Г). Апикальный цилиндр и слившиеся гранулы состоят из плотно упакованного мелкозернистого материала (рис. 6Г, Д). Султанчик проходит через центральную часть апикального цилиндра (рис. 6Д).

На 6 сут и на последующие сроки апикальная железа личинок имеет еще один тип гранулярных клеток (тип II) (рис. 7Б, В). Одиночные гранулярные клетки II

типа рассредоточены по периферии апикальной железы. Шейки и выпячивания этих клеток заполнены вытянутыми палочковидными секреторными гранулами (шириной около 0,35 мкм и длиной до 3 мкм) (рис. 7В).

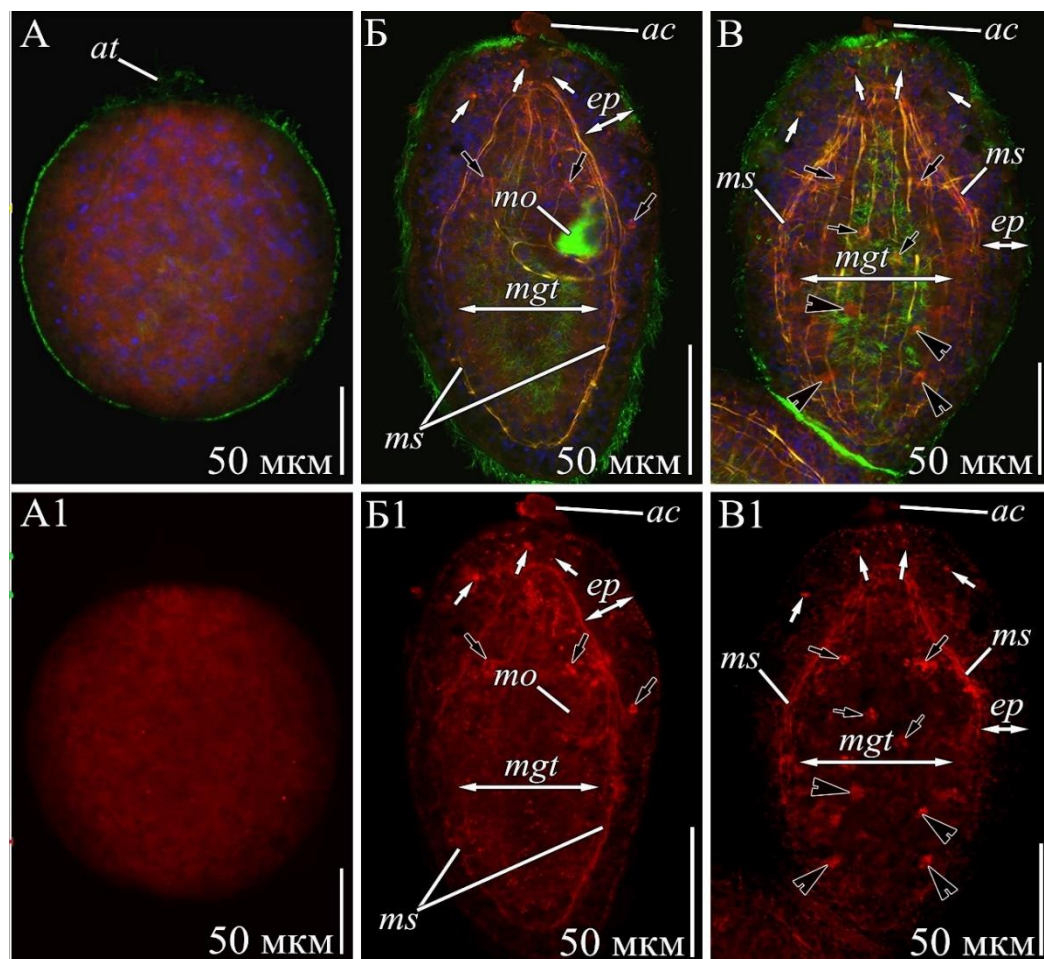


Рисунок 5 – Микрофотографии личинок *Cephalothrix cf. simula*, полученные методом КЛСМ. Красный – ТТХ; зеленый – α -тубулин; синий – ядра, DAPI; желтый – мышцы, фаллоидин. **А** – личинка на 24 ч после оплодотворения. **Б** – личинка на 4 сут после оплодотворения с ТТХ-позитивной меткой в клетках рядом с апикальной железой (белые стрелки) и ртом (черные стрелки). **В** – личинка на 6 сут после оплодотворения с ТТХ-позитивной меткой в клетках рядом с апикальной железой (белые стрелки), ртом (мелкие черные стрелки) и в мезодермальных клетках (крупные черные стрелки). Условные обозначения: *ac* – апикальный цилиндр; *at* – султанчик; *ep* – эпидермис; *mgt* – кишка; *mo* – рот; *ms* – мускулатура (Malykin et al., 2023).

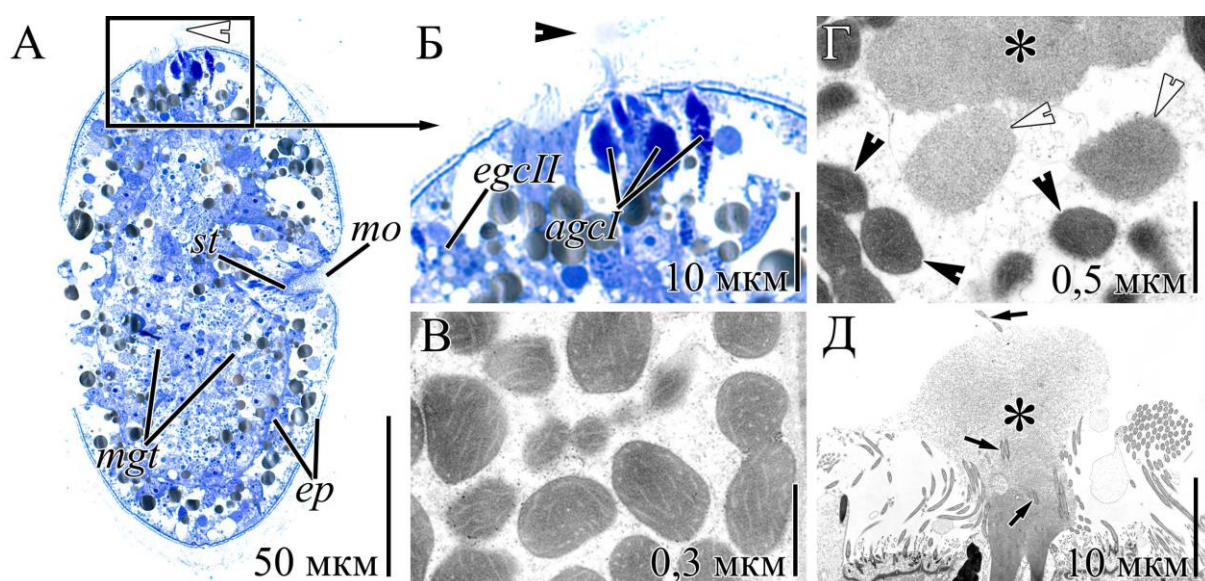


Рисунок 6 – Световые (А— Б) и электронные (Г—Д) микрофотографии срезов личинок *Cephalothrix* cf. *simula* через 3 сут после оплодотворения. А – панорамный вид личинки на 3 сут после оплодотворения, апикальный цилиндр (белая стрелка). Б – передний конец личинки, апикальный цилиндр (стрелка). В – гранулы гранулярных клеток I типа апикальной железы. Г – дистальная часть шейки гранулярной клетки I типа апикальной железы с интактными (черные стрелки), частично разрушенными (белые стрелки) и слившимися (звездочка) гранулами. Д – апикальный цилиндр (звездочка), султанчик (стрелки). Условные обозначения: *agcl* – гранулярные клетки I типа апикальной железы; *egcII* – гранулярные клетки II типа эпидермиса; *ep* – эпидермис; *mgt* – кишка; *mo* – рот; *st* – стомодеум.

Гранулы имеют гетерогенный состав с расположенным в центре однородным материалом умеренной электронной плотности и материалом с высокой электронной плотностью по периферии (рис. 7В). На последующие сроки, вплоть до конца наблюдаемого развития, структура апикальной железы и апикальной пластинки не изменялась.

У личинок на 4 сут была выявлена ТТХ-позитивная метка в апикальном цилиндре (рис. 5Б, 8А), сохраняясь и на последующие сроки (рис. 5В).

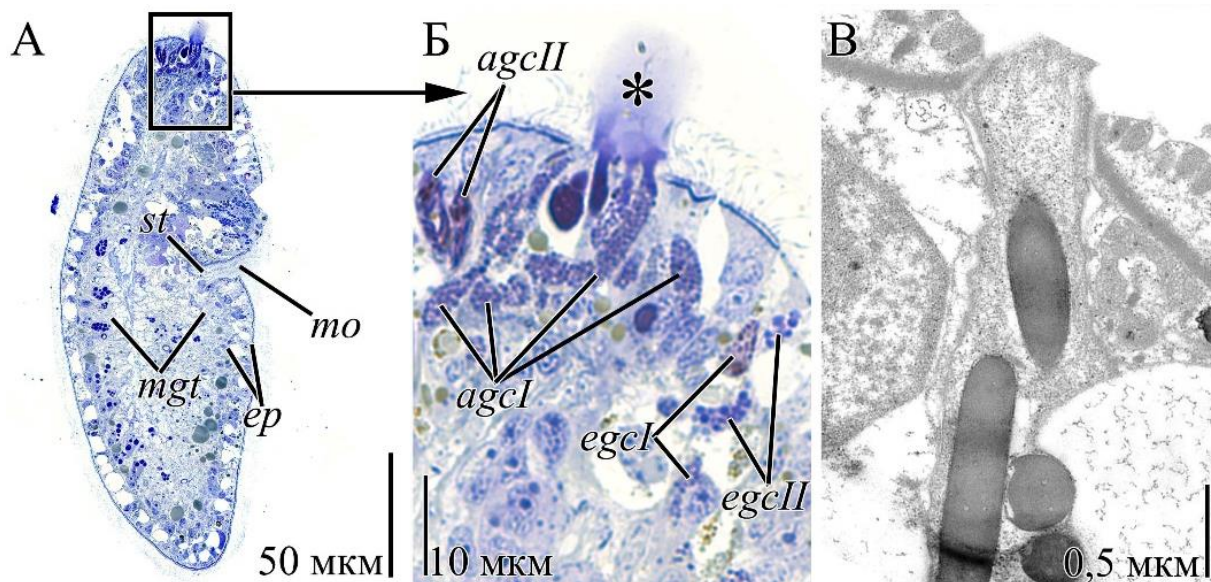


Рисунок 7 – Световые (А, Б) и электронная (В) микрофотографии срезов личинок *Cephalothrix cf. simula* через 6 (В) и 28 (А, Б) сут после оплодотворения. А – панорамный вид личинки на 28 сут после оплодотворения. Б – передний конец личинки, апикальный цилиндр (звездочка). В – шейка гранулярной клетки II типа. Условные обозначения: *agcI* – гранулярные клетки I типа апикальной железы; *agcII* – гранулярные клетки II типа апикальной железы; *egcI* – гранулярные клетки I типа эпидермиса; *egcII* – гранулярные клетки II типа эпидермиса; *ep* – эпидермис; *mgt* – кишка; *mo* – рот; *st* – стомодеум.

Буккальные железы. На 3 сут ротовое отверстие, расположенное в середине тела на брюшной стороне личинки, ведет в узкую трубообразную полость (стомодеум), переходящую в кишку (рис. 9А). В области рта было выделено две группы клеток: первая группа, «ротовые железы», располагается в базальной части эпидермиса над ртом (рис. 9А), а вторая группа, «железы стомодеума» – на дне стомодеума (рис. 9А). Большинство клеток в обеих группах желез имеют удлиненную веретенообразную форму. Центральная часть клеток имеет крупные

ядра овальной формы; околядерная цитоплазма заполнена длинными цистернами эндоплазматического ретикулума (ЭПР), расположенными в 2–3 ряда (рис. 9Б). Эти веретенообразные клетки, вероятно, представляют собой незрелые гранулярные клетки.

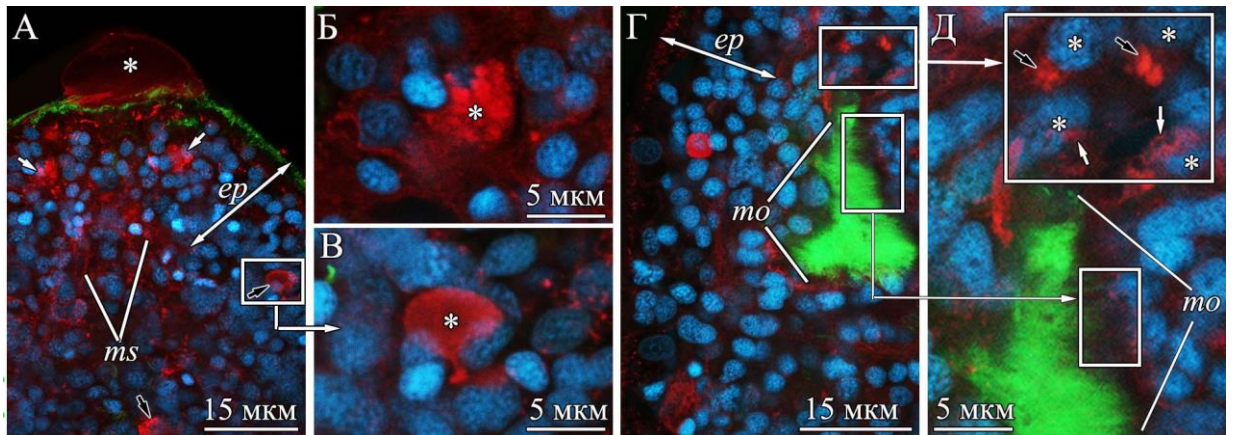


Рисунок 8 – Микрофотографии личинок *Cephalothrix* cf. *simula* через 4 сут после оплодотворения, полученные методом КЛСМ. Красный – тетродотоксин (ТТХ); зеленый – α -тубулин; синий – ядра, DAPI. **А** – апикальный конец личинки, апикальный цилиндр (звездочка), гранулярные клетки II типа (белые стрелки) и мукоидные клетки I типа (черные стрелки) эпидермиса. **Б** – тело гранулярной клетки II типа эпидермиса (звездочка). **В** – ТТХ-позитивная гранула (звездочка) мукоидной клетки I типа эпидермиса. **Г** – панорамный вид рта личинки. **Д** – тела клеток ротовых желез личинки (звездочки) с ТТХ-позитивными нитевидными структурами (белые стрелки) и секреторными гранулами (черные стрелки) в околядерном пространстве. Условные обозначения: *ep* – эпидермис; *to* – рот; *ms* – мускулатура.

В группе ротовых желез наряду с веретенообразными клетками присутствуют единичные гранулярные клетки (клетки I типа) (рис. 9В). Эти клетки заполнены гранулами сферической формы (диаметром от 0,5 до 0,75 мкм) с

гомогенным материалом высокой электронной плотности. На 6 сут и при последующем развитии личинок, в обеих группах желез появляется несколько типов гранулярных клеток (рис. 9Г) в то время, как веретенообразные клетки обнаружены не были. В дополнение к гранулярным клеткам I типа, группа ротовых желез содержит еще два типа гранулярных клеток: гранулярные клетки II и III типов (рис. 9Д). Гранулярные клетки II типа заполнены гранулами неправильной формы (диаметром около 1,4 мкм) с гомогенным материалом высокой электронной плотности (рис. 9Е). Гранулярные клетки III типа ротовых желез содержат секреторные гранулы овальной формы (0,17–0,37 мкм в диаметре и до 0,6 мкм в длину) с фибриллярным материалом средней электронной плотности, окутанным более плотным гомогенным материалом (рис. 9Ж). Количество клеток ротовых желез на продольный разрез составляет одну-две гранулярные клетки I и III типов, и около десяти гранулярных клеток II типа. Железы стомодеума содержат один тип гранулярных и один тип мукоидных клеток (рис. 9З). Среди желез стомодеума преобладают мукоидные клетки, которые заполнены гранулами сферической формы (диаметром около 0,6 мкм) с плотно или неплотно упакованным мелкозернистым фибриллярным материалом (рис. 9З). Гранулярные клетки заполнены палочковидными секреторными гранулами (около 0,3 мкм в диаметре и до 0,9 мкм длиной), содержащими гомогенный материал с высокой электронной плотностью (рис. 8З).

На 4 сут ТТХ у личинок выявляли в дистальной области ротовых желез (рис. 8Г). Метка была выявлена в околядерной области, предположительно, веретенообразных клеток. ТТХ-позитивные структуры имели нитевидную (предположительно, цистерны ЭПР) (рис. 8Д) или сферическую (предположительно – незрелые секреторные гранулы) форму (рис. 8Д). На 6 сут и на последующие сроки в ротовых железах метка была выявлена в секреторных гранулах клеток III типа (рис. 10Д). В некоторых железистых клетках метку выявляли в околядерной области (рис. 10Г). Поскольку гранулы этих клеток не были ТТХ-позитивными, тип клеток идентифицирован не был.

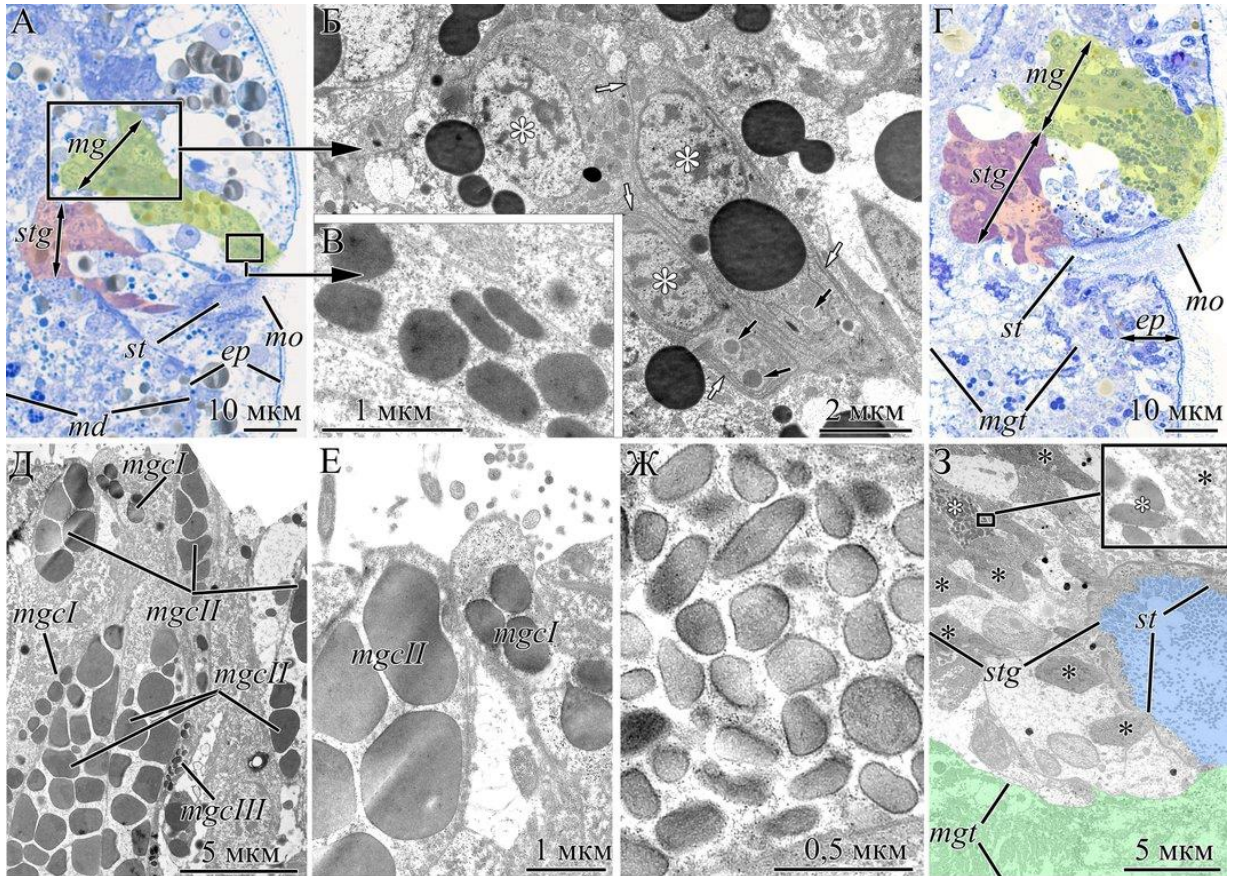


Рисунок 9 – Световые (А, Г) и электронные (Б, В, Д–З) микрофотографии срезов личинок *Cephalothrix* cf. *simula* в районе рта через 3 (А–В) и 28 (Г–З) сут после оплодотворения. А – панорамный вид рта, ротовые железы (желтый) и железы стомодеума (красный). Б – веретенообразные клетки ротовых желез (звездочки), цистерны ЭПР (белые стрелки), секреторные гранулы (черные стрелки). В – шейка гранулярной клетки I типа. Г – панорамный вид рта, ротовые железы (желтый) и железы стомодеума (красный). Д – панорамный вид ротовых желез. Е – шейки гранулярных клеток ротовых желез. Ж – гранулярные клетки III типа ротовых желез. З – панорамный вид дна стомодеума, гранулы мукоидных (белые звездочки) и гранулярных (черные звездочки) клеток. Условные обозначения: *ep* – эпидермис; *md* – мезодерма; *mg* – ротовая железа; *mgcl* – гранулярные клетки I типа ротовой железы; *mgclII* – гранулярные клетки II типа ротовой железы; *mgclIII* – гранулярные клетки III типа ротовой железы; *mgt* – кишка; *mo* – рот; *st* – стомодеум; *stg* – железы стомодеума.

Кожные покровы. Сразу после выхода из яйцевых оболочек личинки покрыты слоем крупных ресничных клеток провизорного эпителия (рис. 11А, Б). В базальной части клеток располагается большое сферическое ядро (до 6 мкм в диаметре). Цитоплазма клеток заполнена многочисленными сферическими включениями (предположительно гранулами желтка), окрашенными от голубого до темно-синего метиленовым синим (рис. 11Б). Под цитоплазматической мембраной, контактирующей с внешней средой (внешней мембраной), лежит слой гомогенного электронно-плотного материала (толщиной 0,15–0,25 мкм), ориентированного параллельно поверхности личинки (рис. 11В). В околосмембранном пространстве располагается цилиарный аппарат и палочковидные включения (рис. 11В). Осевые корешки цилиарного аппарата проходят через слой гомогенного и электронно-плотного материала глубоко в цитоплазму. Палочковидные включения, ориентированные перпендикулярно поверхности личинки, имеют длину до 1,5 мкм и ширину около 0,3 мкм. Включения окружены двойной мембраной и заполнены неплотно упакованным гранулярно-фибрилярным материалом. Некоторые включения сливаются с внешней цитоплазматической мембраной, высвобождая содержимое (рис. 11В). На 3 сут в цитоплазме ресничных клеток были обнаружены большие вакуоли, заполненные рыхлым фибриллярным материалом (рис. 11Г).

На последующие сроки развития личинок ресничные клетки имеют аналогичную морфологию. У личинок на срок 3 сут в эпидермисе присутствует четыре типа железистых клеток (два типа гранулярных и два типа мукоидных клеток). Гранулярные клетки I и II типов, а также мукоидные клетки I типа встречаются только на переднем конце личинок (рис. 6Б, В, 8В), в то время как мукоидные клетки II типа расположены на заднем конце личинок вблизи каудального цирруса (рис. 12Г). Гранулярные клетки I типа (рис. 11Д) являются наиболее многочисленными среди железистых клеток эпидермиса и содержат сферические гранулы в телах (рис. 11Ж) и удлиненные ланцетовидные гранулы с заостренными полюсами в шейках и расширениях (рис. 11Е). Секрет гранул

представлен паракристаллическим содержимым, состоящим из тонких фибрилл низкой электронной плотности, окруженных гомогенным материалом с высокой электронной плотностью (рис. 11Е, Ж). Гранулярные клетки II типа в телах и протоках овальной формы (рис. 7Б), содержат сферические гранулы (диаметром до 0,9 мкм) с плотно упакованным мелкозернистым материалом (рис. 6Б, 11З).

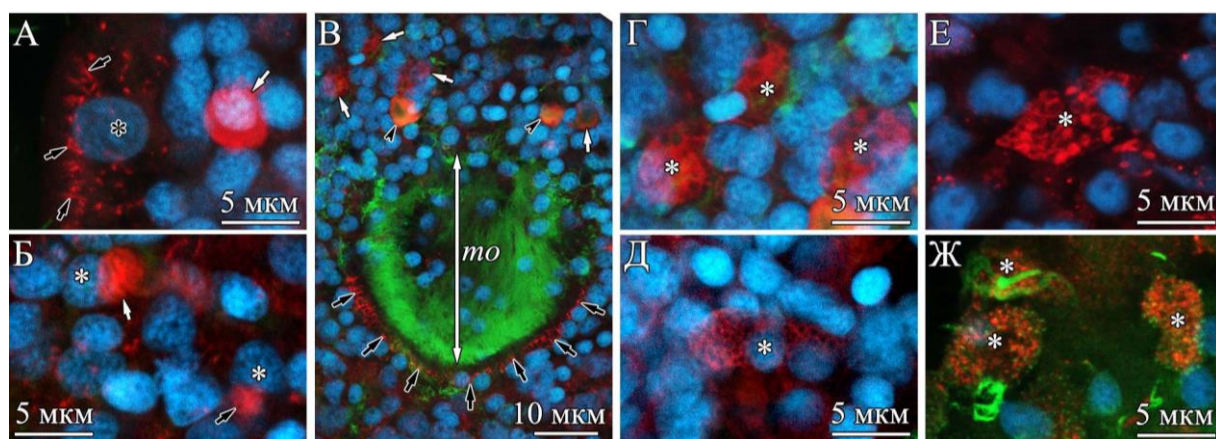


Рисунок 10 – Микрофотографии личинок *Cephalothrix* cf. *simula* через 4 (А, Б), 6 (В—Д), и 8 (Е, Ж) сут после оплодотворения, полученные методом КЛСМ. Красный – тетродотоксин (ТТХ); зеленый – α-тубулин; синий – ядра, DAPI. А – эпидермис латеральной стороны личинки, ресничные клетки (звездочка), ТТХ-положительные палочковидные структуры (черные стрелки); базальные клетки с ТТХ-положительными структурами в околядерном пространстве (белая стрелка). Б – базальный регион эпидермиса, ТТХ-положительные нитевидные (белая стрелки) и диффузные (черная стрелка) структуры в околядерном пространстве клеток. В – панорамный вид рта, ТТХ-положительные клетки ротовых желез (белые стрелки). ТТХ-положительные структуры вокруг рта (крупные черные стрелки) и структуры, обладающие автофлуоресценцией (мелкие черные стрелки). Г – клетки ротовых желез (звездочки), с ТТХ-положительными структурами в околядерном пространстве. Д – гранулярная клетка III типа ротовых желез (звездочка) с ТТХ-положительными гранулами. Е – мезодермальная клетка (звездочка) с ТТХ-положительными гранулами. Ж – ресничные клетки эпидермиса (звездочки). Условные обозначения: *mo* – рот.

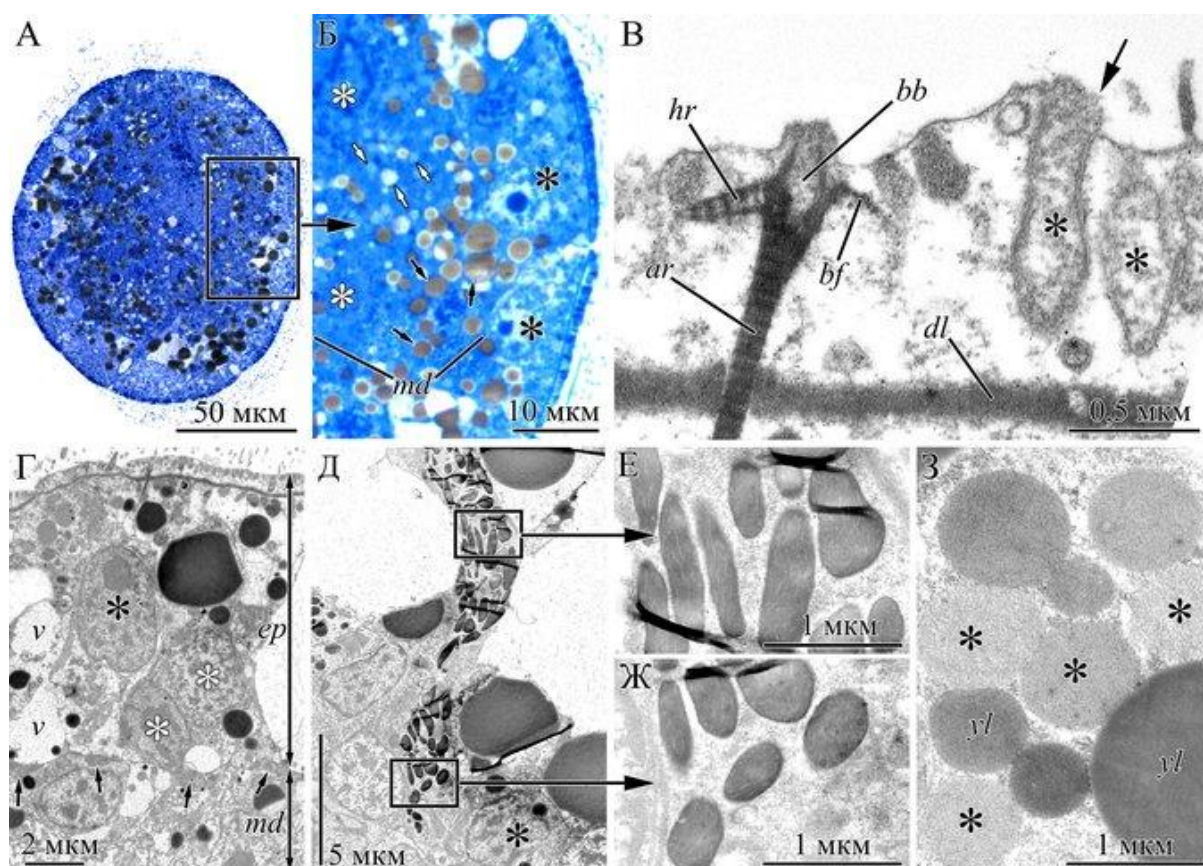


Рисунок 11 – Световые (А, Б) и электронные (В–З) микрофотографии срезов личинок *Cephalothrix cf. simula* через 1 (А, Б), 3 (В, З), 6 (Г–Ж) сут после оплодотворения. А – панорама. Б – ресничные клетки (черные звездочки) и мезодермальные клетки (белые звездочки), липофусцин-подобные гранулы желтка (черные стрелки). В – цилиарный аппарат (ЦА) и палочковидные включения (звездочки) ресничной клетки. Содержимое включения (стрелка). Г – панорама эпидермиса, ресничная клетка (черная звездочка) и базальные клетки (белые звездочки), волокна мышечных клеток (стрелки). Д – гранулярная клетка I типа (звездочка). Е – дистальная область гранулярных клеток эпидермиса I типа. Ж – проксимальная область гранулярных клеток эпидермиса I типа. З – секреторные (звездочки) и желточные (yl) гранулы клетки эпидермиса II типа. Условные обозначения: ar – осевые корешки ЦА; bb – базальное тело ЦА; bf – базальная ножка ЦА; dl – слой, отделяющий клеточную мембрану от цитоплазмы; ep – эпидермис; hr – корешок ЦА; md – мезодерма; yl – желток.

Структура секрета мукоидных клеток I типа различается в разных частях клетки; в проксимальной области клеток сферические гранулы (диаметром до 2 мкм) заполнены плотно упакованным фибриллярным материалом; в дистальной области клеток и в шейках гранулы сливаются, образуя единую массу из неплотно упакованного фибриллярного материала (рис. 12А, Б). В области зачатка мозга личинок были обнаружены одиночные шейки мукоидных клеток I типа (предположительно будущих клеток головной железы), лежащие под эпидермисом (рис. 9Л); тела клеток обнаружены не были. Мукоидные клетки II типа содержат сферические гранулы (около 0,4 мкм в диаметре), заполненные плотно упакованным фибриллярным материалом (рис. 12Г, Д).

На 28 сут общее количество железистых клеток в эпидермисе увеличивается в 3–4 раза, а их распределение по телу личинки (за исключением гранулярных клеток II типа) изменяется. Гранулярные клетки I типа остаются в большом количестве на переднем конце тела личинки и располагаются поодиночке на заднем конце, и в середине тела. Мукоидные клетки I типа располагаются в изобилии на дорсальной стороне (противоположной рту) и поодиночке встречаются на переднем конце личинок, в эпителии подо ртом. Мукоидные клетки II типа расположены по всему заднему концу тела личинок. У личинок на 28 сут в эпителии ниже ротового отверстия присутствует еще один тип клеток эпидермальных желез (тип III) (рис. 12Е). Эти клетки заполнены сферическими секреторными гранулами (диаметром 0,2–0,3 мкм) с гомогенным материалом высокой электронной плотности (рис. 12Ж). На 3 сут и на последующие сроки развития в базальной части эпидермиса встречаются базальные клетки (предположительно будущие клетки дефинитивного эпителия), содержащие большое ядро и тонкий ободок околядерной цитоплазмы (рис. 11Г). В цитоплазме некоторых базальных клеток был обнаружен хорошо развитый ЭПР и незрелые секреторные гранулы (рис. 12З). Базальные клетки образуют небольшие полосы или поодиночке разбросаны по всему эпидермису личинок и не контактируют с внешней средой.

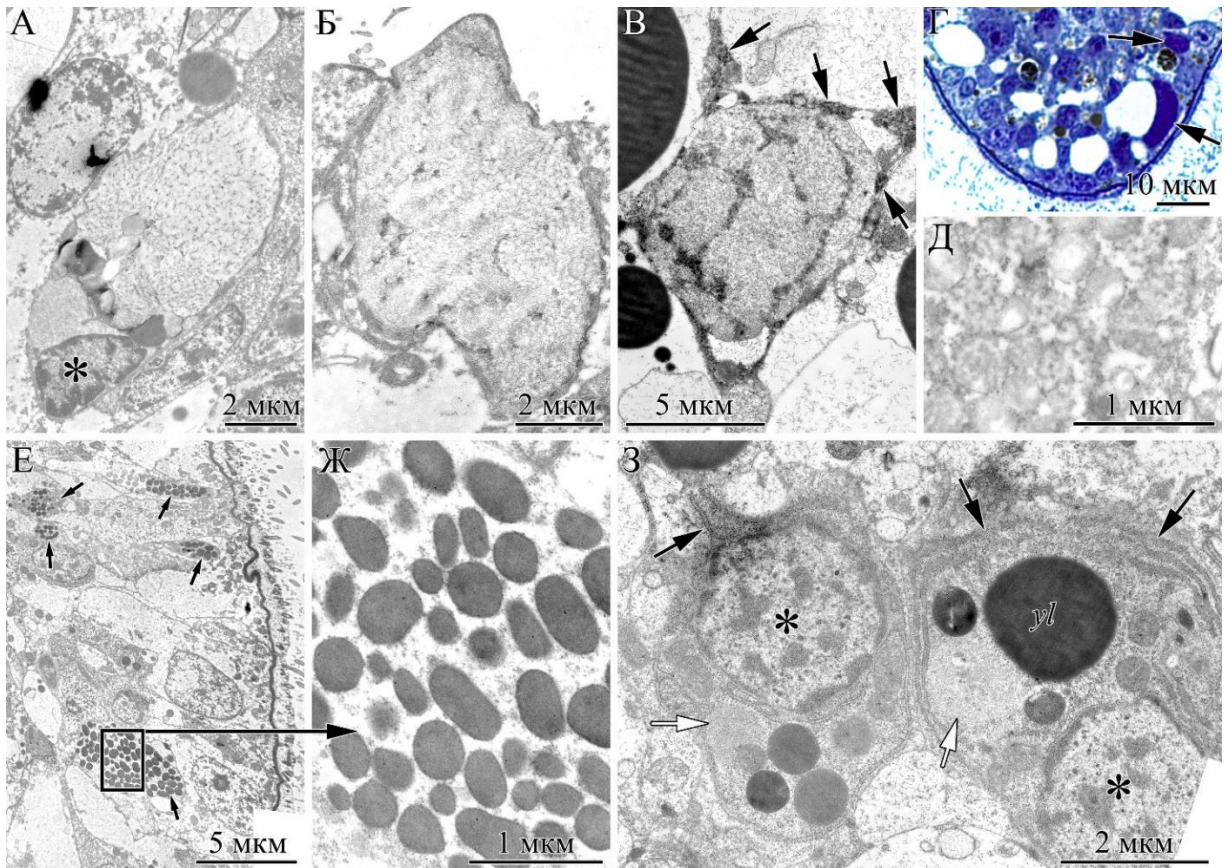


Рисунок 12 – Электронные (А–В, Д–З) и световая (Г) и микрофотографии срезов личинок *Cephalthrix cf. simula* через 3 (В, З), и 28 (А, Б, Г–Ж) сут после оплодотворения. А – мукоидная клетка I типа эпидермиса (звездочка). Б – выпячивание мукоидной клетки эпидермиса I типа. В – шейка мукоидной клетки I типа, расположенная в области зачатка мозга, мышечные волокна (стрелки). Г – панорамный вид заднего конца личинки с мукоидными клетками II типа (стрелки). Д – гранулы мукоидной клетки эпидермиса II типа. Е – панорама эпидермиса, гранулярные клетки III типа (стрелки). Ж – тело гранулярной клетки эпидермиса III типа, заполненное секреторными гранулами. З – базальные клетки (звездочки), цистерны эндоплазматического ретикулама (черные стрелки) и незрелые секреторные гранулы (белые стрелки). Условные обозначения: *yl* – желток.

В эпидермисе ТТХ-положительную реакцию антиген-антитело наблюдали в ресничных, некоторых базальных клетках и железистых клетках. В ресничных

клетках интенсивная ТТХ-позитивная метка присутствовала в палочковидных включениях, расположенных в околосембранном пространстве внешней мембраны (рис. 8А, Ж). В ресничных клетках в нижней части рта палочковидные включения имели высокую плотность; их длинные оси были направлены к центру ротового отверстия, образуя форму полумесяца, очерчивая границу рта (рис. 8Г, Д, 10В). Среди железистых клеток ТТХ содержали гранулярные клетки II типа и мукоидные клетки I типа (рис. 8А, Б, В). В базальных клетках ТТХ-позитивная метка локализовалась вокруг ядра (рис. 8Г, 10А) или имела нитевидную структуру (предположительно цистерны ЭПР) (рис. 10Б).

Мезодермальные структуры. Мезодерма личинок после выхода из яйцевых оболочек представлена крупными клетками, заполненными гранулами желтка (рис. 11А). Были идентифицированы два типа гранул желтка, различающихся по диаметру и гистохимическому окрашиванию: крупные желто-коричневые гранулы (до 4 мкм в диаметре), не окрашенные метиленовым синим, и мелкие (до 1 мкм в диаметре), окрашенные от голубого до темно-синего метиленовым синим (рис. 11Б). На 3 сут среди мезодермальных клеток были выделены мышечные и паренхимоподобные клетки (рис. 13А).

Мышечные клетки, локализованные под эпидермисом, имеют тело с отходящими длинными тонкими отростками, содержащими сократительные нити (рис. 11Г, 13А). Тела мышечных клеток содержат округлое ядро, многочисленные митохондрии, короткие цистерны ЭПР и одиночные гранулы желтка (рис. 13А). Паренхимоподобные клетки имеют округлую или овальную форму (рис. 13А) и содержат желточные гранулы обоих типов (рис. 11В). Плотность внутреннего содержимого гранул желтка варьирует от неплотно упакованного зернистого фибриллярного материала до однородного материала с высокой электронной плотностью (рис. 13А). Среди паренхимоподобных клеток выделяются клетки, содержащие только один тип желточных гранул, окрашенных метиленовым синим в темно-синий цвет (моногранулярные клетки) (рис. 11Б). Эти клетки располагаются на заднем конце и в середине тела личинки, а их общее количество

составляет от 4 до 6 клеток на личинку. Желточные гранулы (около 1 мкм в диаметре) моногранулярных паренхимоподобных клеток содержат однородный материал с высокой электронной плотностью (рис. 11Г). Цитоплазма этих клеток содержит одиночные длинные цистерны ЭПР и митохондрии. На 6 сут и на последующие сроки развития личинок количество мышечных и паренхимоподобных клеток увеличивается. В моногранулярных паренхимоподобных клетках изменяется количество органелл и структура желточных гранул. Количество длинных цистерн ЭПР и митохондрий в цитоплазме этих клеток увеличивается (рис. 13Ж). Внутреннее содержимое гранул желтка неоднородно: по периферии или на одном из полюсов гранулы заполнены мелкозернистым содержимым (диаметром около 20 нм), окруженным рыхлым фибриллярным материалом, остальная часть гранул заполнена гомогенным электронно-плотным материалом (рис. 13Ж).

На 6 сут и на последующих сроках ТТХ-позитивная метка в мезодерме присутствует в отростках мышечных клеток (рис. 5Б, 5В) и желточных гранулах моногранулярных паренхимоподобных клеток (рис. 5В, 10Е). В моногранулярных паренхимоподобных клетках ТТХ-позитивную метку выявляли на периферии желточных гранул, при этом центральная часть гранул не содержала метку (рис. 10Е).

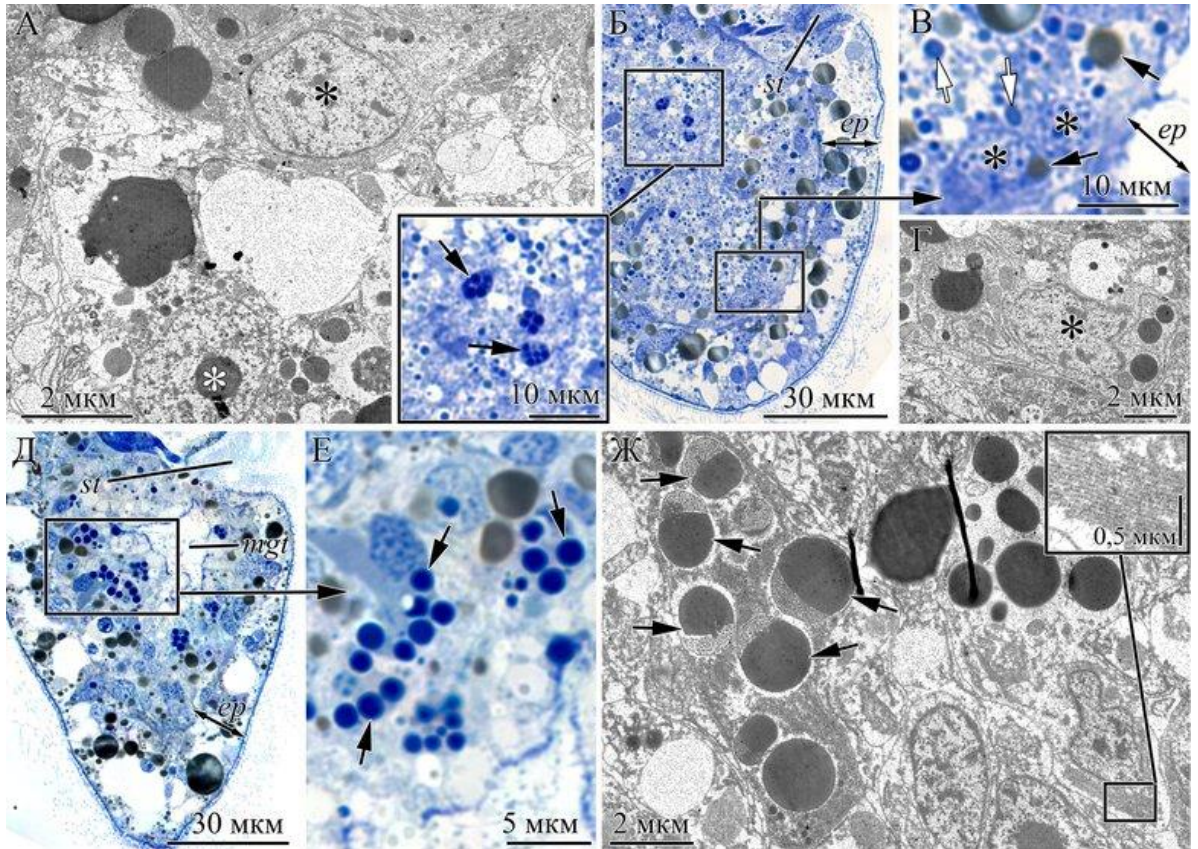


Рисунок 13 – Световые (Б, В, Д, Е) и электронные (А, Г, Ж) микрофотографии срезов личинок *Cephalthrix* cf. *simula*, показывающие мезодермальные структуры на 3 (А–Г) и 6 (Д–Ж) сут после оплодотворения. А – панорамный вид личиночной мезодермы, тело мышечной клетки (черная звездочка) и паренхимоподобной клетки (белая звездочка). Б – панорамный вид заднего конца личинки. На изображении с большим увеличением видны моногранулярные паренхимоподобные клетки (стрелки). В – паренхимоподобные клетки (звездочки) с крупными желто-коричневыми гранулами (черные стрелки) и мелкими гранулами желтка, окрашенными метиленовым синим от светло-синего до темно-синего цвета (белые стрелки). Г – паренхимоподобная клетка (звездочка). Д – панорамный вид заднего конца личинки. Е – панорамный вид моногранулярных паренхимоподобных клеток мезодермы (стрелки). Ж – желточные гранулы с неоднородным содержимым (стрелки). Цистерны ЭПР. Условные обозначения: *ep* – эпидермис; *mgt* – кишка; *st* – стомодеум.

3.4 ТТХ-позитивные структуры у взрослых немертин *C. cf. simula*

Для установления локализации ТТХ методом КЛСМ были использованы 2 особи *C. cf. simula*. Токсин был выявлен во всех исследованных отделах тела червей, включая хобот, предротовой отдел, районы передней кишки и кишечника в среднем и заднем отделах тела (рис. 14). Интенсивная метка была выявлена в железистом эпителии хобота, в нефридиях, кожных покровах и в кишечном эпителии (табл. 2, рис. 15). Метка средней интенсивности была выявлена в головной железе, в центральной нервной системе и в яйцеклетках. Слабую метку наблюдали в мышцах стенки тела, хобота и в эндотелии кровеносных сосудов (табл. 2).

Железистый эпителий хобота. Железистый эпителий хобота *C. cf. simula* представляет собой однослойный многорядный эпителий, состоящий из поддерживающих (интерстициальных) клеток и четырех типов железистых клеток (рис. 16А). Интерстициальные клетки – это тонкие, формирующие множественные разветвления клетки, вклинивающиеся между телами железистых клеток (рис. 16Б). Гранулярные клетки I типа характеризуются овальной формой (рис. 16Б). Основной объем клетки заполнен сферическими гранулами, диаметр которых не превышает 0,4 мкм. Гранулярные клетки II типа (или бациллярные железистые клетки согласно Джуной (Junou et al., 2000)) – это клетки ланцетовидной формы, все свободное внутреннее пространство которых заполнено сильно вытянутыми бациллярной/палочковидной формы гранулами (рис. 16Г). Железистые клетки III типа или псевдокнид-содержащие клетки – это клетки, цитоплазма которых содержит экструсомы (именуемые как псевдокниды) – уникальные структуры в пределах типа Nemertea, подобные нематоцистам книдарий (Magarlamov et al., 2021) (рис. 16Д).

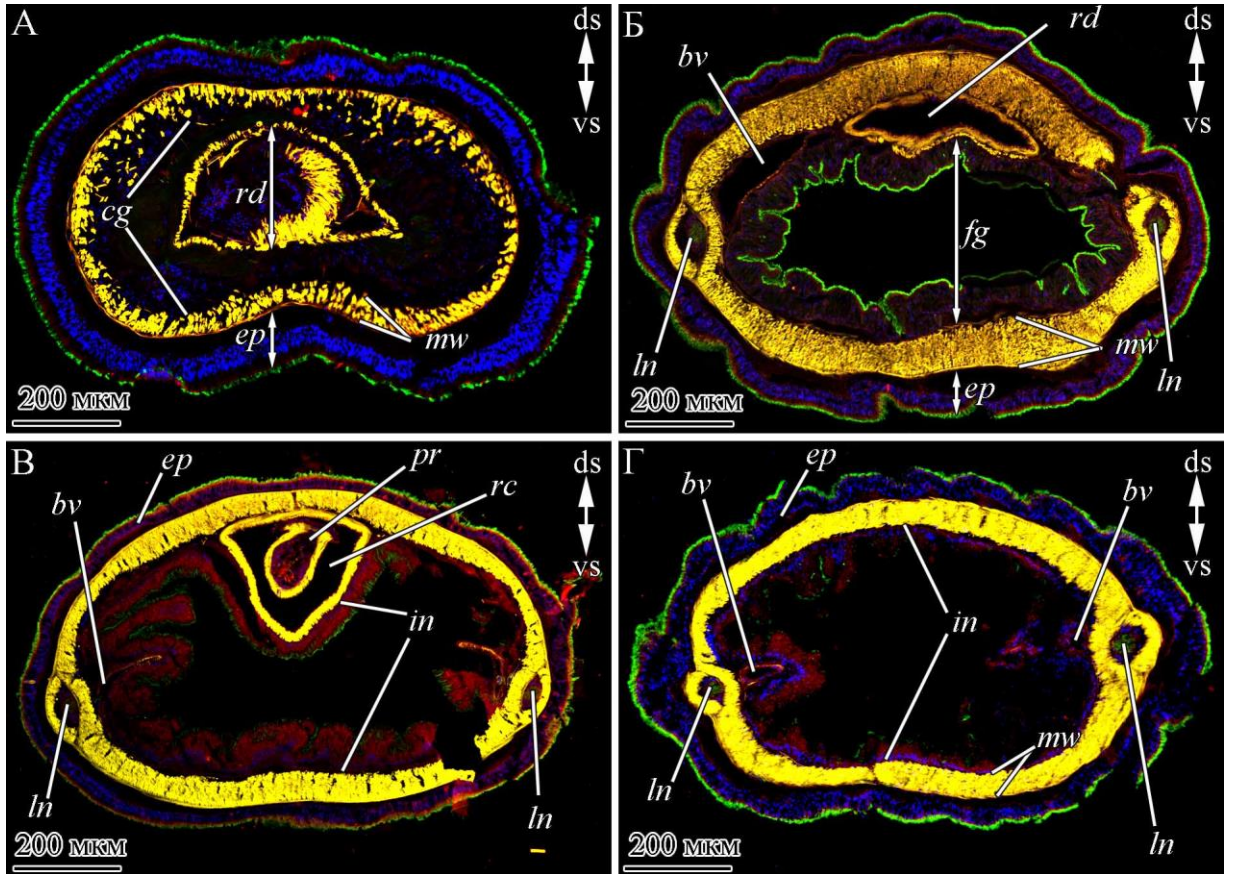


Рисунок 14 – Микрофотографии поперечных криосрезов различных отделов тела *Cephalothrix cf. simula*, полученные методом КЛСМ. Красный – тетродотоксин (ТТХ); зеленый – α -тубулин; синий – ядра, DAPI; желтый – мышцы, фаллоидин. А – предротовой отдел. Б – район передней кишки. В – средний отдел тела. Г – задний отдел тела. Условные обозначения: *bv* – кровеносный сосуд; *cg* – головная железа; *ds* – дорзальная сторона; *ep* – эпителий; *in* – кишечник; *ln* – латеральный нерв; *mw* – мускулатура стенки тела; *pr* – хобот; *rc* – ринхоцель; *rd* – ринходеум; *vs* – вентральная сторона (Malykin et al., 2021).

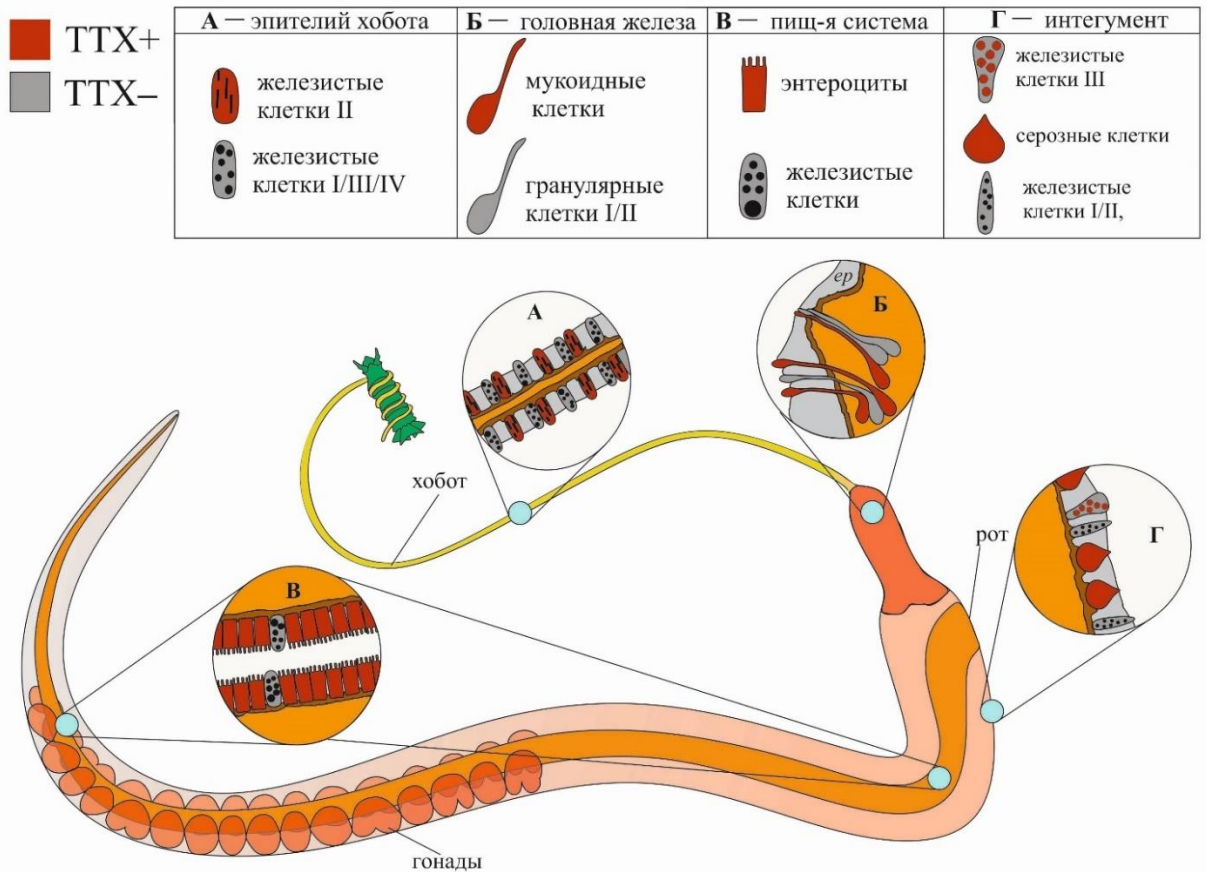


Рисунок 15 – Схема расположения основных тетродотоксин-положительных структур в хоботе, головной железе, интегументе и кишечнике *Cephalothrix* cf. *simula*. Условные обозначения: *ep* – эпидермис; «ТТХ+» – тетродотоксин-положительные клетки; «ТТХ-» – клетки, не содержащие тетродотоксин.

Зрелые псевдокинды, вышедшие из шеек желез, не покидают пределы хобота, а остаются с ним связанными, формируя монослойные кластеры на поверхности гранулярных клеток II типа (рис. 16Е, Ж). Такая ассоциация из двух типов клеток, относящихся к разным типам в одну структуру, была описана для гетеронемертины *Riseriellus occultus* и названа как «железистая система типа Б» (с англ. «type B glandular system») (Montalvo et al., 1998). Гранулярные железистые клетки IV типа (мукоидные железистые клетки согласно Джунуй и соавторам (Junoy et al., 2000)) имеют овальную форму (рис. 16В). Центральная и апикальная части клетки заполнены округлыми гранулами диаметром около 0,6 мкм.

Таблица 2 – Тетродотоксин-позитивные структуры в различных органах и тканях взрослых особей *Cephalothrix cf. simula*.

| Орган/ткань | ТТХ-позитивные структуры | Интенсивность метки |
|--------------------|---|---------------------|
| Хобот | Секреторные гранулы железистых клеток II типа | +++ (сильная) |
| | Перинуклеарное пространство железистых клеток II типа | ++ (средняя) |
| | Поверхность железистого эпителия | + (слабая) |
| Головная железа | Тела и шейки мукоидных клеток | ++ |
| Эпидермис | Секреторные гранулы серозных клеток | +++ |
| | Секреторные гранулы железистых клеток III типа | + ++ |
| | Перинуклеарное пространство железистых клеток | ++ |
| | Микроворсинки ресничных клеток | +++ |
| | Цитоплазма ресничных клеток | + |
| Кишечник | Фагосомы энтероцитов | +++ |
| | Цитоплазма энтероцитов | ++ |
| Кровеносные сосуды | Цитоплазма эндотелиоцитов | + |
| | Мышцы стенки сосудов | + |
| | Луковицы нефридиев | +++ |
| Латеральные нервы | Нейропиль | ++ |
| | Цитоплазма | ++ |
| Яйцеклетки | Цитоплазма | ++ |
| Стенка тела | Мускулатура | + |

Исследования методом КЛСМ показали, что в хоботе ТТХ-позитивная метка локализована внутри железистых клеток, на поверхности железистого эпителия и в просвете хобота (рис. 14В, 17А) (таб. 2). На поверхности железистого эпителия и в просвете хобота метка была диффузной, и имела слабую интенсивность. Метку содержали железистые клетки II типа (рис. 17А, Б). ТТХ-позитивную интенсивную метку выявляли в гранулах, локализованных в средней и апикальной частях клетки. На Z-проекциях некоторые гранулы железистых клеток II типа не содержали метки или метка была слабой – возможно, это связано с артефактами, полученными при пробоподготовке. Метка средней интенсивности была обнаружена в структурах клеток, расположенных в области ядра (рис. 17В, Г). Эти структуры имели либо серпообразную форму, либо форму тонких и длинных изгибающихся нитей. Серпообразные структуры локализовались преимущественно в дистальной части тела клетки (в области над ядром) (рис. 17Г), а нитевидные структуры в виде сети занимали все околядерное пространство клетки (рис. 17В). Предположительно, ТТХ-позитивные структуры в телах железистых клеток представляют из себя гетеросинтетический аппарат клетки.

Головная железа. Головная (фронтальная) железа *C. cf. simula* занимает основное пространство предротовой области (головной отдел) и представлена 4-мя долями (две дорзальные и две вентральные доли) (рис. 18А). На светооптическом уровне выявляются три типа железистых клеток: мукоидные, гранулярные клетки I типа и II типов (рис. 18Б–Д). В состав каждой из долей головной железы входят все три типа желез. Протоки всех трех типов желез открываются либо поодиночке по всей длине головного отдела (Kajihara, 2013) (рис. 18Г, Е, Ж). Мукоидные клетки — это основной клеточный тип фронтальной железы. Тела мукоидных клеток имеют овальную или слегка неправильную форму (диаметром около 3 мкм) (рис. 18Б, Д). От тела клетки формируется проток шириной от 2 до 3 мкм, заполненный крупными гранулами, содержимое которых не окрашивается метиленовым синим (рис. 18Б). Гранулярные клетки I типа имеют округлое (диаметром примерно 4 мкм) или неправильной формы тело (рис. 18В).

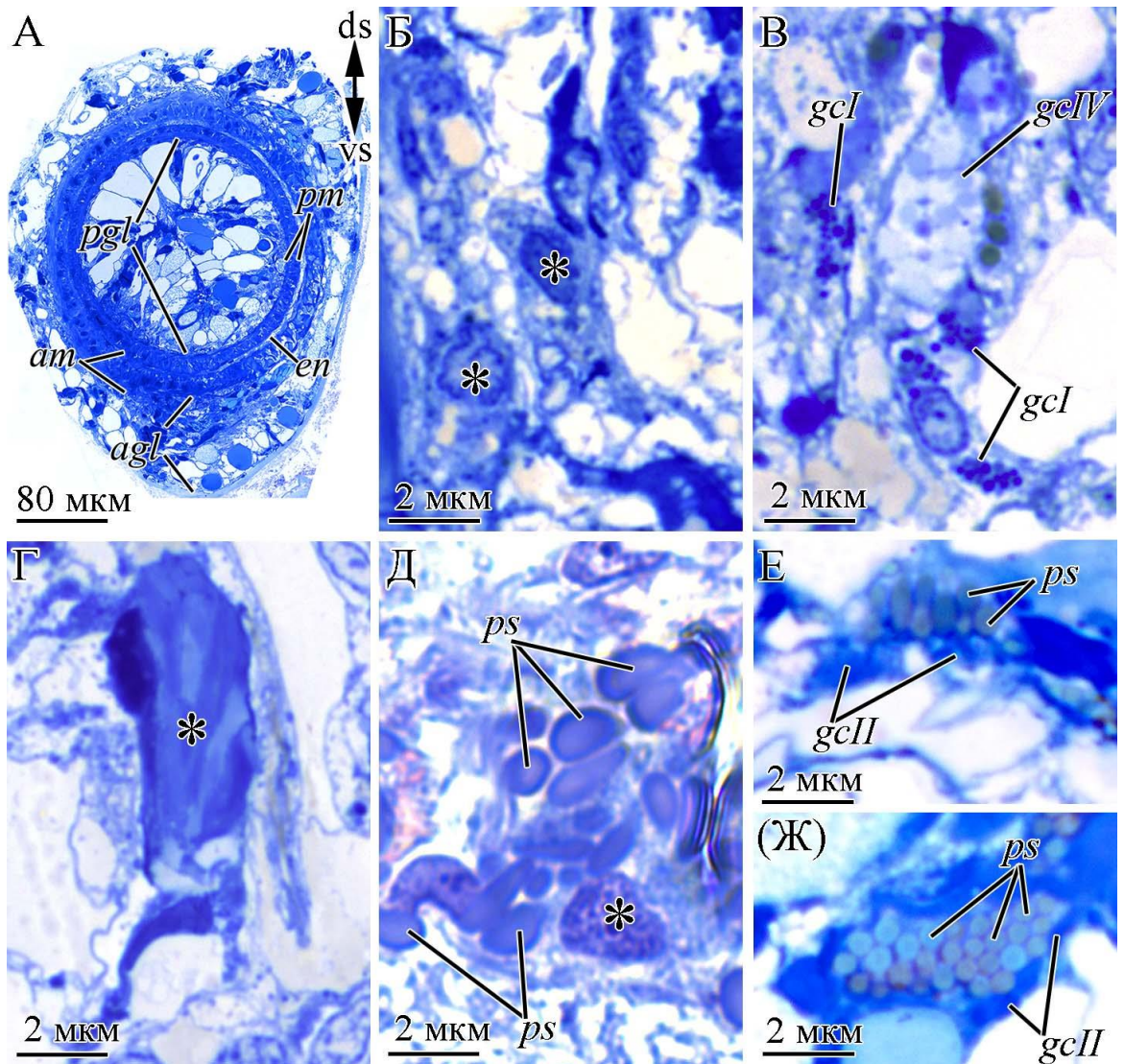


Рисунок 16 – Световые микрофотографии продольных (А–Е) и поперечных (Ж) срезов хобота *Cephalothrix* cf. *simula*. А – панорамный вид поперечного среза хобота. Б – интерстициальные клетки (звездочки). В – Гранулярные клетки I и IV типов. Г – Гранулярные клетки II типа (звездочка). Д – псевдокинд-содержащая клетка (звездочка). Е – псевдокинды на поверхности эпителия хобота. Ж – псевдокинды на поверхности железистой клетки II типа. Условные обозначения: *agl*, – железистый эпителий переднего сегмента хобота; *am* – мышечный слой переднего сегмента хобота; *ds* – дорзальная сторона; *en* – эндотелий; *gcl* – железистые клетки I типа; *gclII* – железистые клетки II типа; *gclIV* – железистые клетки IV типа; *ge* – железистый эпителий хобота; *pgl* – железистый эпителий заднего сегмента хобота; *pm* – мышечный слой заднего сегмента хобота; *ps* – псевдокинда; *vs* – вентральная сторона.

Их околядерная цитоплазма содержит от 1 до 3 овальной формы гранул (до 1 мкм в диаметре). Протоки гранулярных клеток I типа заполнены сферическими гранулами (около 0,3 мкм в диаметре) (рис. 18Д). Гранулярные клетки II типа имеют крупное (диаметром около 6 мкм) слегка неправильной формы тело (рис. 18Г). Тела и протоки клеток заполнены сферическими (диаметром около 0,2 мкм) гранулами (рис. 18Е).

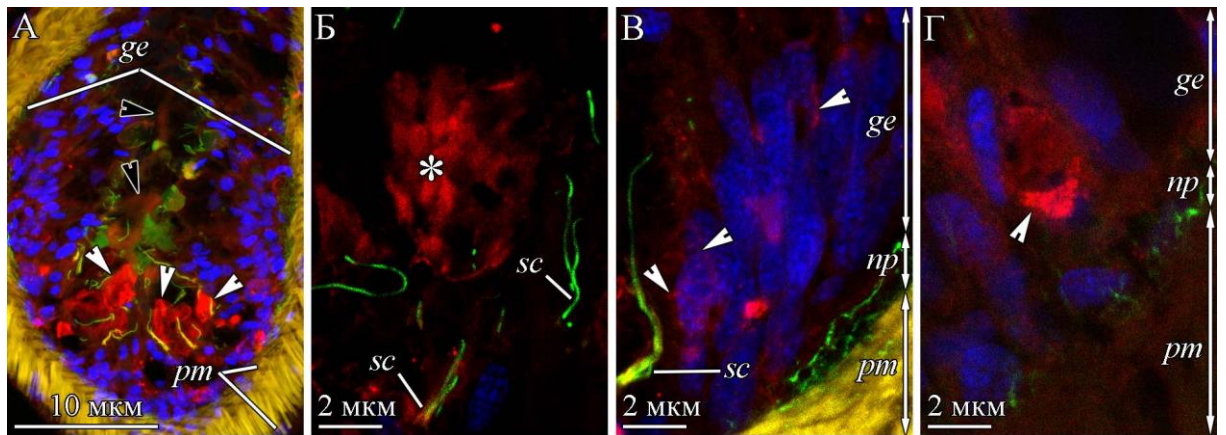


Рисунок 17 – Микрофотографии поперечных криосрезов *Cephalothrix* cf. *simula*, полученные методом КЛСМ. Хобот. Красный – тетродотоксин (ТТХ); зеленый – α -тубулин; синий – ядра, DAPI; желтый – мышцы, фаллоидин. **А** – хобот, панорама. Белые стрелки – ТТХ-позитивные клетки; черные стрелки – ТТХ-позитивная слизь на поверхности железистого эпителия и в просвете хобота. **Б** – ТТХ-позитивные гранулы железистых клеток I типа (звездочка). **В** – тела железистых клеток с тонкими нитевидными ТТХ-позитивными структурами (белые стрелки). **Г** – ТТХ-позитивные серповидные структуры в околядерном пространстве железистой клетки. Условные обозначения: *ge* – железистый эпителий хобота; *np* – базально-эпителиальный нервный плексус; *p* – пора; *pt* – мускулатура хобота; *sc* – ресничка сенсорной клетки.

Согласно данным КЛСМ, ТТХ-позитивная метка была обнаружена в телах и шейках мукоидных клеток (рис. 14А, 19) (таб. 2). Метка имела среднюю

интенсивность и имела равномерное распределение, как в цитоплазме, так и в шейках (рис. 19). Шейки ТТХ-позитивных клеток проходили сквозь поры в субэпидермальном ЭЦМ и открывались на поверхности покровного эпителия (рис. 19В).

Интегумент. Интегумент *C. cf. simula* представлен многорядным однослойным железистым эпителием (рис. 14, 20А, Б). В предротовом отделе железистые клетки эпидермиса являются единичными, либо отсутствуют вовсе. Клеточный состав интегумента во всех остальных исследуемых районах тела одинаков и отличается лишь соотношением отдельных типов желез (см. ниже). Покровный эпителий включает в себя ресничные клетки и четыре типа железистых клеток (один тип серозных клеток и три типа гранулярных клеток). Ресничные клетки являются наиболее многочисленным клеточным типом в эпидермисе *C. cf. simula*. Обычно они располагаются между железистыми клетками и имеют сильно вытянутую воронковидную форму – относительно широкая апикальная часть клетки, сужаясь, переходит в расширенное тело, а затем в узкую ножку (рис. 20В). Ножки ресничных клеток, проходят в базальную часть эпидермиса, где прикрепляются к базальной мембране с помощью расширенной подошвы. Апикальная поверхность клетки несет множество ресничек и микроворсинок. Серозные клетки наиболее представленный клеточный тип железистых клеток эпидермиса. (рис. 20Г). Основной объем клетки занят одной крупной секреторной гранулой. Небольшая часть серозных клеток содержит «пустые» гранулы, секрет которых не окрашивается гистохимическим красителем (рис. 20Б–Г). Гранулярные клетки I типа имеют расширенное тело, расположенное в базальной части эпидермиса (рис. 20Ж). От дистальной поверхности тела клетки отходит один проток, который при подходе к апикальной поверхности формирует бульбообразное расширение (рис. 20Д, 3). Протоки и апикальные расширения заполнены секреторными гранулами бациллярной/палочковидной формы (высотой до 2,5 мкм и шириной до 0,5 мкм) (рис. 20Д, 3). Гранулярные клетки II типа состоят из расширенного тела, от дистальной части которого отходит шейка (рис. 20Е). В

апикальной части эпидермиса шейка клетки формирует ланцетовидное или овальной формы расширение (рис. 20Д). Тела и выводные протоки клеток заполнены сферической формы гранулами (диаметром около 0,3 мкм) (рис. 20Д, 3).

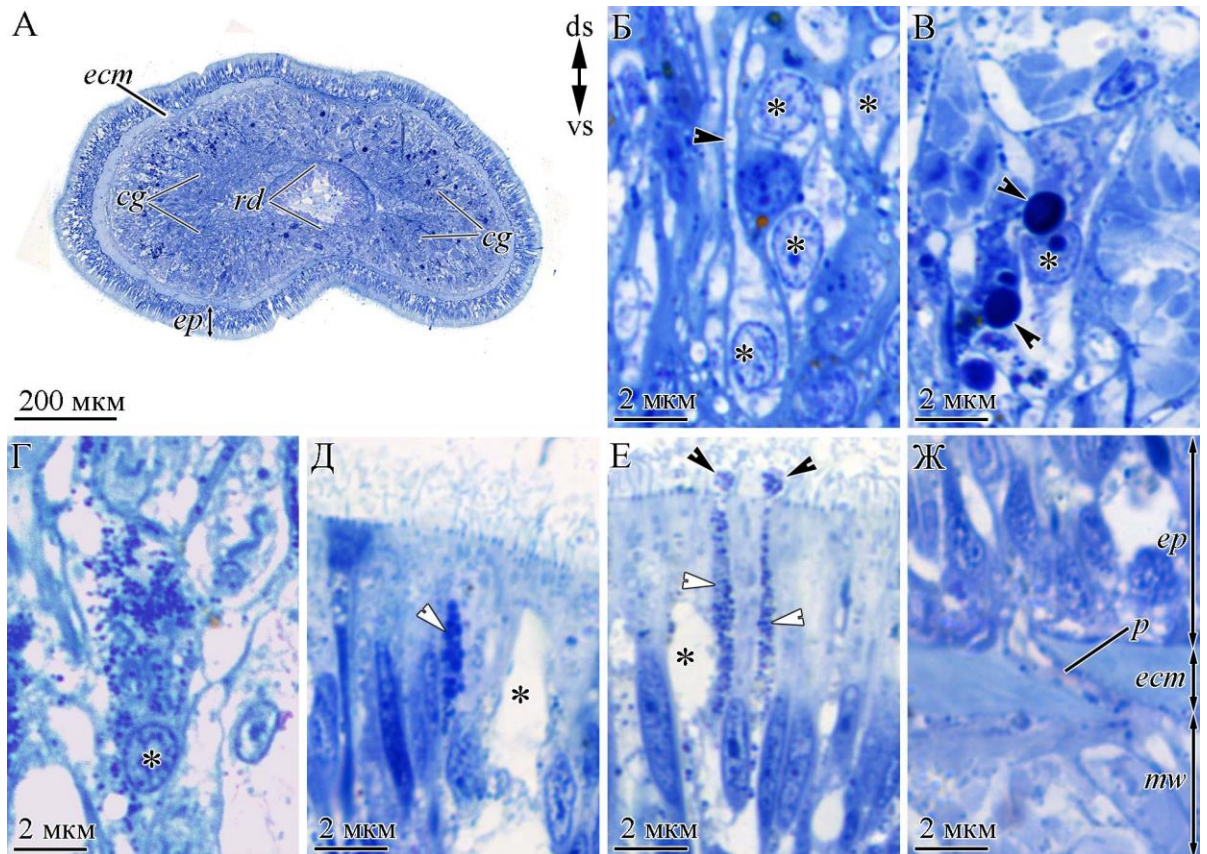


Рисунок 18 – Световые микрофотографии поперечных срезов предротового (головного) отдела *Cephalothrix* cf. *simula*. **А** – панорамный вид среза. **Б** – тела мукоидных клеток (звездочки), шейка мукоидной клетки (стрелка). **В** – тело гранулярной клетки I типа (звездочка), секреторная гранула (стрелка). **Г** – тело гранулярной клетки II типа (звездочка). **Д** – шейка гранулярной клетки I типа (стрелка) и мукоидной клетки (звездочка). **Е** – шейки гранулярных клеток I типа (белые стрелки) и мукоидной клетки (звездочка). Апикальные расширения гранулярных клеток I типа (черные стрелки). **Ж** – пора в экстрацеллюлярном матриксе эпидермиса. Условные обозначения: *cg* – головная железа; *ds* – дорзальная сторона; *ecm* – экстрацеллюлярный матрикс; *ep* – эпидермис; *mw* – мускулатура стенки тела; *p* – пора; *rd*, – ринходеум; *vs* – вентральная сторона.

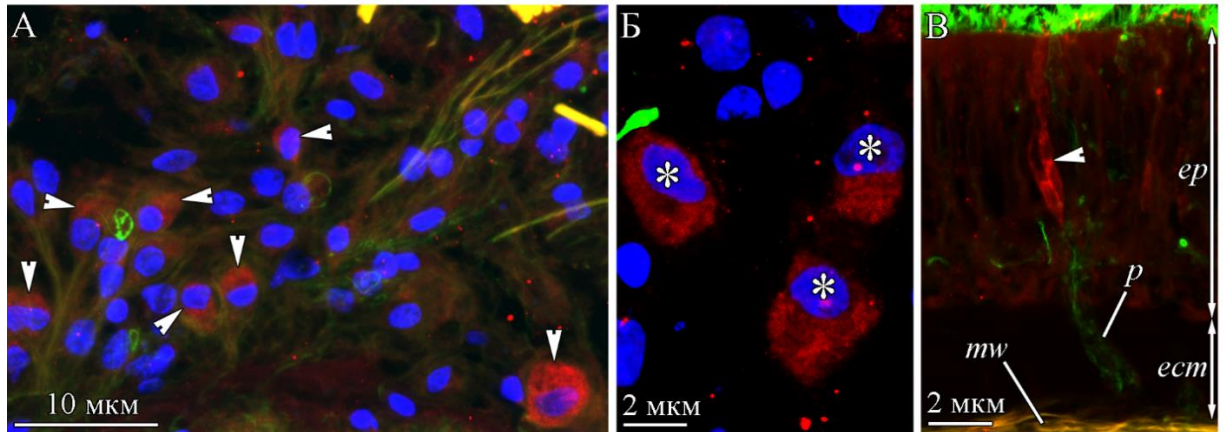


Рисунок 19 – Микрофотографии поперечных криосрезов *Cephalothrix cf. simula*, полученные методом КЛСМ. Головная железа. Красный – тетродотоксин (ТТХ); зеленый – α -тубулин; синий – ядра, DAPI; желтый – мышцы, фаллоидин. **А** – панорамный вид головной железы, ТТХ-позитивные мукоидные клетки (стрелки). **Б** – ТТХ-позитивные тела мукоидных клеток (звездочки). **В** – панорамный вид ТТХ-позитивной шейки (стрелка) мукоидной клетки, проходящего сквозь экстрацеллюлярный матрикс и интегумент. Условные обозначения: *ect*, – экстрацеллюлярный матрикс; *ep* – эпидермис; *mw* – мускулатура стенки тела; *p* – пора.

Гранулярные клетки III типа – самые малочисленные из всех. Апикальные расширения этих клеток имеют сферическую или овальную форму, заполнены сферическими гранулами диаметром 0,44–0,7 мкм (рис. 203). Из-за редкой встречаемости клеток, их тела выявить не удалось.

Иммуногистохимические исследования показали, что ТТХ-позитивная метка была локализована на поверхности эпидермиса, в ресничных, серозных и гранулярных клетках III типа (рис 14, 21А–В) (таб. 2). В ресничных клетках ТТХ-позитивную реакцию антиген-антитело наблюдали в цитоплазме апикальной части клеток и в микроворсинках (рис. 21Б, В). Метка в апикальной части ресничных клеток имела градиентное распределение: интенсивность метки падала от дистальной к проксимальной части клетки.

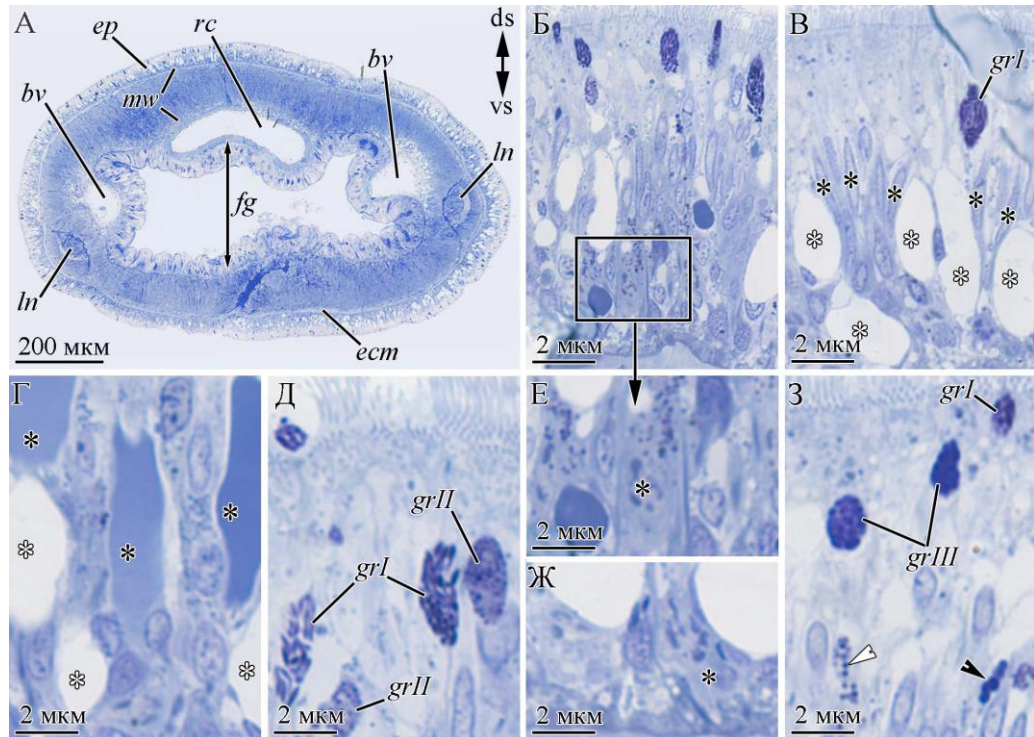


Рисунок 20 – Световые микрофотографии поперечных срезов *Cephalothrix* cf. *simula* в районе передней кишки. **А** – панорамный вид среза. **Б** – панорамный вид интегумента. **В** – ресничные (черные звездочки) и серозные клетки с «опустошенными» секреторными гранулами (белые звездочки). **Г** – серозные клетки с заполненными (черные звездочки) и опустошенными (белые звездочки) секреторными гранулами. **Д** – шейки железистых клеток. **Е** – тело гранулярной клетки II типа (звездочка). **Ж** – тело гранулярной клетки I типа (звездочка). **З** – шейки гранулярных клеток III типа (черная стрелка) и II типа (белая стрелка) и апикальные расширения железистых клеток. Условные обозначения: *bv* – кровеносный сосуд; *ds* – дорзальная сторона; *ect* – экстрацеллюлярный матрикс; *ep* – эпидермис; *fg* – просвет передней кишки; *grI* – гранулярные клетки I типа эпидермиса; *grII*, – гранулярные клетки II типа эпидермиса; *grIII* – гранулярные клетки III типа эпидермиса; *in* – кишечник; *ln* – латеральный нерв; *mw* – мускулатура стенки тела; *rc* – ринхоцель; *vs* – вентральная сторона.

В серозных клетках метка была равномерно распределена внутри гранулы; сама метка была интенсивной (рис. 21А, Б). Апикальные расширения гранулярных

клеток III типа были заполнены гранулами, содержащими ТТХ-позитивную метку высокой интенсивности (рис. 21В). В базальной части эпителия были выявлены тела железистых клеток, содержащие ТТХ-позитивные нитевидные структуры. Эти структуры формировали сеть вокруг ядра и вдавались в дистальную часть цитоплазмы тела клетки (рис. 21Г). Выяснить к какому типу железистых клеток относятся ТТХ-позитивные тела, не удалось.

Пищеварительная система. Пищеварительный тракт *C. cf. simula* выстлан однослойным ресничным эпителием (рис. 14, 22А). В состав эпителия входят фагоцитирующие энтероциты и железистые клетки. Среди железистых клеток по форме и размеру гранул, а также по характеру секрета выявляли три типа желез. Железы не формируют скоплений и одиночно располагаются по всей поверхности кишечного эпителия. Железы I типа характеризуется сферическими гранулами диаметром 0,2 мкм (рис. 22А). Железы II типа содержат сферические гранулы диаметром около 0,4 мкм, внутреннее содержимое которых представлено гетерогенным материалом (плотное ядро, окруженное светлым материалом) (рис. 22А). Железы III типа характеризуется сферическими гранулами диаметром до 0,5 мкм (рис. 22Б, В). I и II типы железистых клеток являются наиболее представленными и встречаются в районе передней кишки. III тип желез встречается редко и был выявлен только в кишечнике. Энтероциты характеризуются вытянутой прямоугольной формой (рис. 22А–В). Апикальная поверхность энтероцитов несет множество ресничек и микроворсинок. Основным внутриклеточным компонентом этих клеток являются фагосомы. Содержимое и размер фагосом от апикальной к базальной части энтероцитов меняется: в апикальной части располагаются преимущественно липофусцин-подобные (не прокрашенные гистохимическим красителем) фагосомы, диаметром до 0,5 мкм, в медиальной части – фагосомы диаметром до 0,5 мкм, внутреннее содержимое которых прокрашивается метиленовым синим в темно-синий цвет, а в базальной – довольно мелкие фагосомы (диаметром до 0,2 мкм) с секретом, окрашивающимся от светло-синего до синего цвета метиленовым синим (рис. 22А–В).

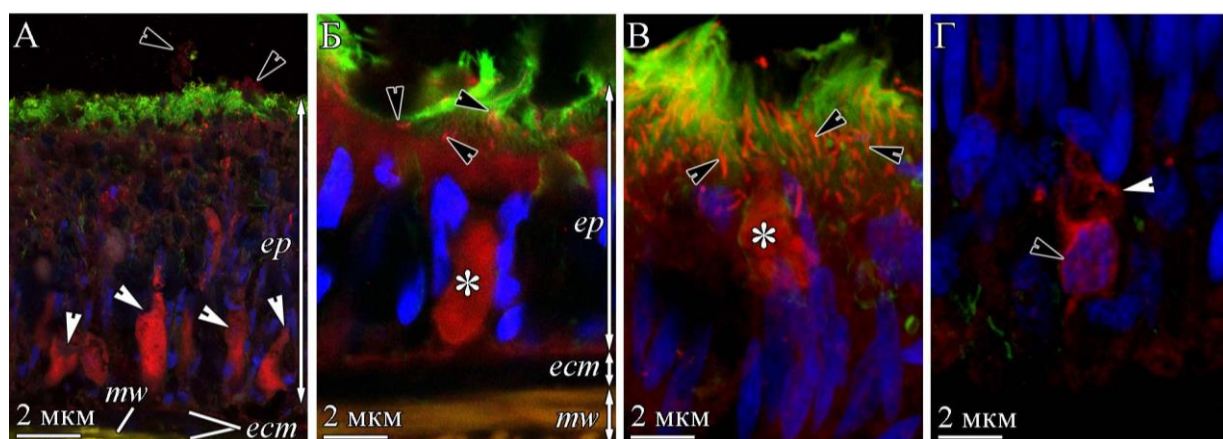


Рисунок 21 – Микрофотографии поперечных криосрезов *Cephalothrix cf. simula*, полученные методом КЛСМ. Интегумент. Красный – тетродотоксин (ТТХ); зеленый – α -тубулин; синий – ядра, DAPI; желтый – мышцы, фаллоидин. **А** – ТТХ-позитивные гранулы серозных клеток (белые стрелки) и ТТХ-позитивный секрет (черные стрелки) на поверхности эпидермиса. **Б** – ТТХ-позитивная гранула серозной клетки (звездочка) и ТТХ-позитивные микроворсинки ресничных клеток (стрелки). **В** – Дистальный регион эпидермиса, шейка (звездочка), заполненная ТТХ-позитивными сферическими гранулами, ТТХ-позитивные микроворсинки ресничных клеток (стрелки). **Г** – Проксимальный регион эпидермиса, ТТХ-позитивные нитевидные структуры в районе ядра клетки (черная стрелка) и в околядерном пространстве (белая стрелка). Условные обозначения: *est* – экстрацеллюлярный матрикс; *ep* – эпидермис; *mw* – мускулатура стенки тела.

Энтероциты в разных частях кишечной системы отличаются лишь количеством фагосом; в передней кишке количество фагосом на площади эпителия в 100 мкм^2 составляет 82 ± 20 ($n=7$), в кишечнике среднего и заднего отделов тела – 324 ± 87 ($n=7$) и 266 ± 34 ($n=7$) соответственно.

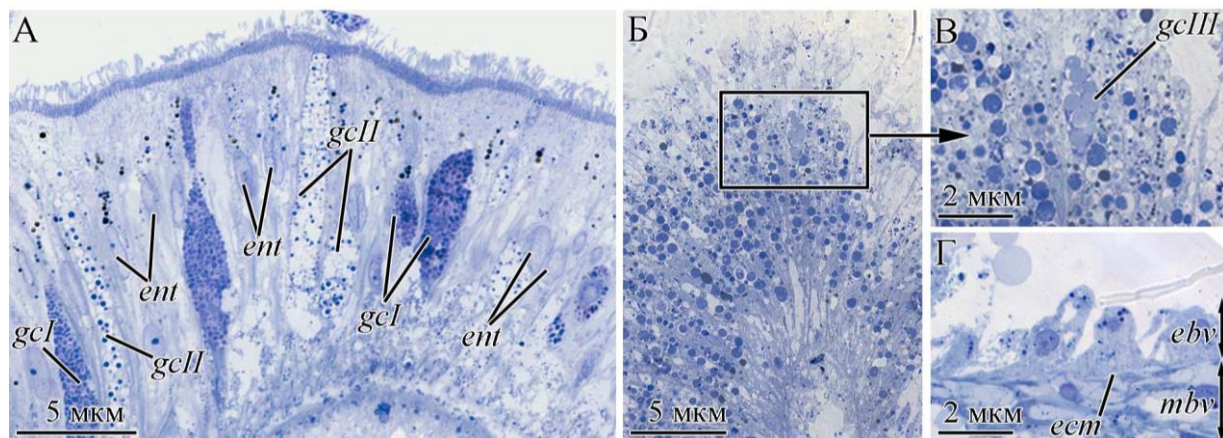


Рисунок 22 – Световые микрофотографии поперечных срезов *Cephalothrix* cf. *simula* в районах передней кишки (А) и кишечника (Б–Г). А – панорамный вид эпителия передней кишки. Б – панорамный вид эпителия кишечника среднего отдела тела червя. В – апикальное расширение железистой клетки III типа в панорамный вид эпителия кишечника заднего отдела тела червя. Г – стенка кровеносного сосуда. Условные обозначения: *ebv* – эндотелий кровеносных сосудов; *ecm* – экстрацеллюлярный матрикс; *ent* – энтероциты; *gcl* – железистые клетки I типа кишечного эпителия; *gclI* – железистые клетки II типа кишечного эпителия; *gclIII* – железистые клетки III типа кишечного эпителия; *in* – кишечник; *mbv* – мускулатура кровеносных сосудов.

При маркировании антителами против ТТХ метку выявляли только в энтероцитах (рис. 23А, Б) (таб. 2). При этом ТТХ-позитивные энтероциты были выявлены во всех трех исследуемых регионах пищеварительной системы *C. cf. simula* (рис. 23Б–Г). В энтероцитах ТТХ содержали цитоплазма и фагосомы. ТТХ-позитивные фагосомы содержали интенсивную метку и были выявлены по всему объему клетки (рис. 23А–В1). Комбинированная съемка с использованием детектора проходящего света и флуоресцентного детектора позволила выявить, что только 50% фагосом энтероцитов были ТТХ-позитивными (рис. 23Б). Сама цитоплазма энтероцитов содержала метку средней интенсивности, при этом метка содержалась преимущественно в базальной части клеток.

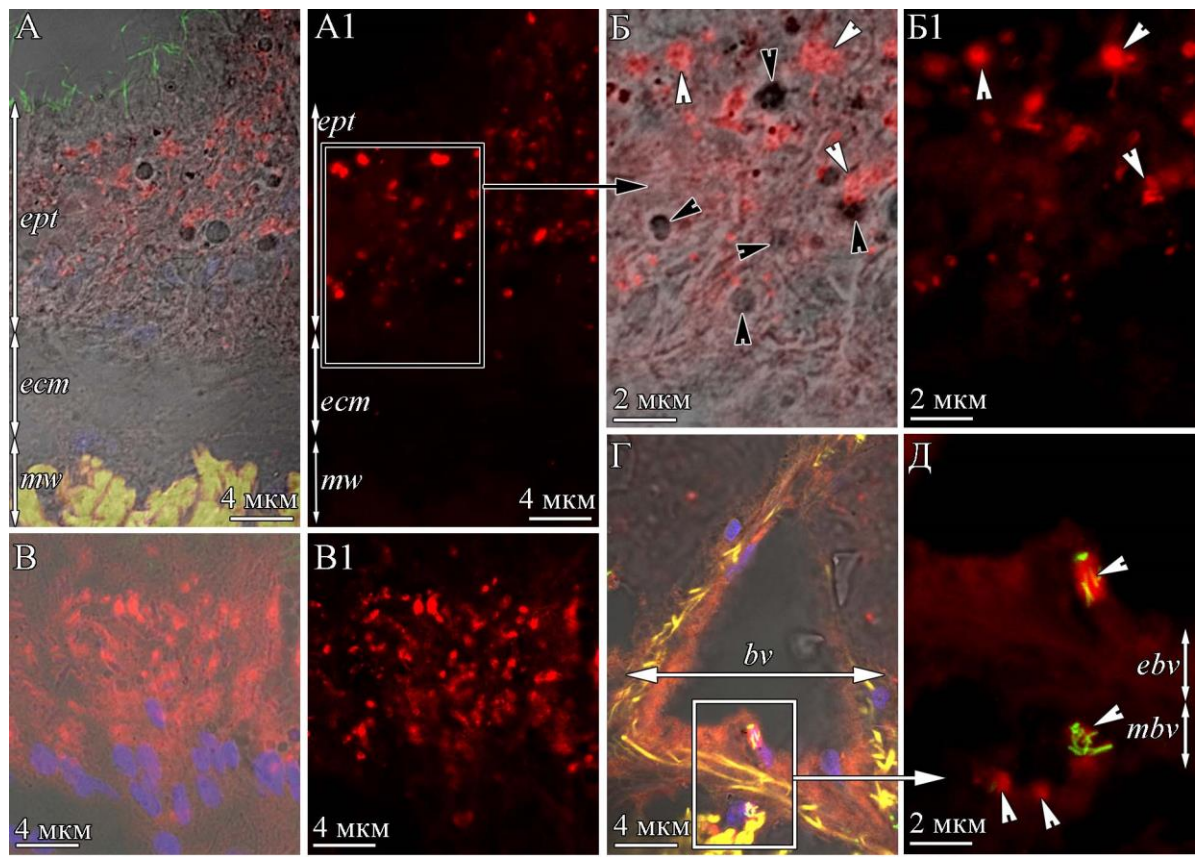


Рисунок 23 – Микрофотографии поперечных криосрезов стенки тела *Cephalothrix cf. simula*, полученные методом КЛСМ. Кишечник и сосуды. Красный – тетродотоксин (ТТХ); зеленый – α -тубулин; синий – ядра, DAPI; желтый – мышцы, фаллоидин. **А** – панорамный вид кишечного эпителия с прилегающей мускулатурой стенки тела. **Б** – кишечный эпителий с ТТХ-положительными (белые стрелки) и ТТХ-негативными (черные стрелки) фагосомами. **В** – эпителий передней кишки **Г** – панорамный вид латерального кровеносного сосуда. **Д** – нефридиальный ресничный канал с ТТХ-положительными клетками (стрелки). Условные обозначения: *bv* – кровеносный сосуд; *ebv* – эпителий кровеносного сосуда; *ect* – экстрацеллюлярный матрикс; *ept* – кишечный эпителий; *mw*, мускулатура стенки тела; *mbv* – мускулатура кровеносного сосуда.

Кровеносная и выделительная системы. Кровеносная система *C. cf. simula* представлена двумя боковыми кровеносными сосудами, идущими вдоль тела и плотно примыкающими к пищеварительному тракту (рис. 14Б–Г, 20А). В головном

отделе боковые кровеносные сосуды соединяются, формируя петлю; у представителей рода *Cephalothrix*, согласно данным Каджихары с соавторами (Kajihara et al., 2013), имеется ринхоцельный сосуд, проникающий в хоботную систему червя. Стенка кровеносных сосудов состоит из мышечной выстилки и однослойного эпителия (эндотелиоцитов) (рис. 22Г, 23Г). Форма эндотелиоцитов варьирует от кубоидальной до чешуевидной. Выделительная система у представителей рода *Cephalothrix* представлена нефридиями, дистальные части которых обращены в кровеносные сосуды, а проксимальные в виде трубчатого ресничного канала открываются на поверхности тела червя (Bartolomaeus, Döhren, 2010). Иммуногистохимические исследования выявили наличие диффузной метки слабой интенсивности в цитоплазме эндотелиоцитов кровеносных сосудов и в мышечной выстилке кровеносных сосудов. Интенсивную метку выявляли в цитоплазме протонефридиальных клеток (рис. 23Г, Д).

Нервная система. Центральная нервная система *C. cf. simula* представлена двумя боковыми нервными стволами, отходящими от вентральных (головных) ганглиев (рис. 14Б–Г, 20А). Тела нервных клеток, участвующие в формировании боковых нервных стволов, залегают вне нейропиля (рис. 24А, Б). При маркировании антителами против ТТХ, метка средней интенсивности была выявлена в телах некоторых нервных клеток и в нейропиле (рис. 24А–В). В телах ТТХ-позитивных клеток метка была обнаружена в нитевидных структурах в области ядра. В нейропиле метку выявляли в виде мелких гранул размером приблизительно 0,2 (рис. 24А–В).

Репродуктивная (половая) система. В половой системе метка была выявлена только в цитоплазме яйцеклеток (рис. 24Г). Метка была ассоциирована с гранулярным компонентом яйцеклеток и характеризовалась средней интенсивностью.

Мышечная ткань. В мышцах стенки тела, хобота, кровеносных сосудов была выявлена слабая ТТХ-позитивная метка, имеющая одинаковую интенсивность (рис. 17Г, 23Д, 24А).

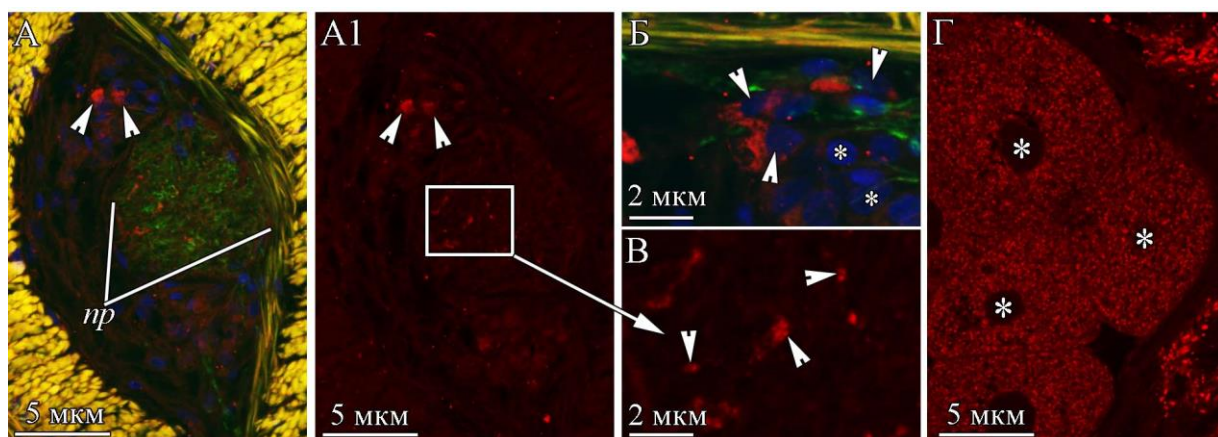


Рисунок 24 – Микрофотографии поперечных криосрезов *Cephalothrix* cf. *simula*., полученные методом КЛСМ. Нервы и гонады. Красный – тетродотоксин (ТТХ); зеленый – α -тубулин; синий – ядра, DAPI; желтый – мышцы, фаллоидин. **А** – панорамный вид латерального нерва с ТТХ-положительными телами нервных клеток (стрелки). **Б** – ТТХ-положительные (стрелки) и ТТХ-негативные (звездочки) тела нервных клеток (звездочки). **В** – ТТХ-положительные нервные стволы (стрелки). **Г** – ооциты (звездочки). Условные обозначения: np – нейропил.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 ТТХ-позитивные структуры у взрослых немертин *C. cf. simula*

ТТХ был обнаружен у многих видов немертин (Göransson et al., 2019), и только на 6 видах: *C. simula* (Tanu et al., 2004), *D. Atra*, *M. Verrilli*, *T. sexlineatus* и *T. polymorphous* (Campbell, Schwartz 2009), а также на *K. alborostrata* (Magarlamov et al. 2016), распределение ТТХ в некоторых отделах тела было показано с помощью иммуногистохимических методов. На сегодняшний день единственное исследование, показывающее, что ТТХ поступает в организм немертин благодаря фагоцитарной активности клеток кишечника, которые поглощают его вместе с тканями добычи, выполнено на немертине *C. simula* (Tanu et al., 2004). Авторы исследовали район передней кишки и показали, что при маркировании тканей антителами против ТТХ, единственными структурами кишечника, которые содержали ТТХ-позитивную метку, являлись фагосомы энтероцитов («ресничные клетки» согласно Тану с соавторами (Tanu et al., 2004)). В настоящей работе было проведено расширенное исследование – был изучен район передней кишки и кишечника в среднем и заднем отделах тела немертины (Malykin et al., 2021). ТТХ-позитивные фагосомы были выявлены в энтероцитах во всех трех исследованных регионах пищеварительной системы. Также было обнаружено, что гомогенная ТТХ-позитивная метка средней интенсивности присутствует и в цитоплазме энтероцитов. Согласно Дженнингсу и Гибсону (Jennings, Gibson, 1969), у немертин рода *Cephalothrix* процесс пищеварения можно разделить на две фазы, протекающие практически одновременно: первая фаза включает разрушение пищи ферментами в полости передней кишки в условиях кислой среды (рН ~ 5,0), а вторая фаза включает фагоцитоз измельченных частиц пищи энтероцитами в различных отделах кишечника. В настоящей работе было показано, что количество фагосом на один энтероцит и самих энтероцитов в кишечнике примерно в 3–4 раза больше, чем таковых в передней кишке, а количество железистых клеток и их

разнообразии – напротив, больше в передней кишке, нежели в других регионах, что позволяет предполагать протекание основных процессов всасывания пищи посредством фагоцитоза именно в кишечнике. Однако, по данным работы Власенко и Магарламова (Vlasenko, Magarlamov, 2020), концентрация ТТХ в передней кишке значительно выше, а потому напрашивается вывод, что передняя кишка является основным отделом пищеварительной системы, в котором происходит всасывание ТТХ: свободный токсин, экстрагированный из лизированных тканей жертвы, активно всасывается энтероцитами без участия фагосом.

Эксперименты, проведенные на осьминогах и рыбах фугу показывают, что ТТХ может поступать в организм животных с пищей, а затем мигрировать в определенные органы и ткани благодаря транспортным системам организма, таким, как кровеносная и лимфатическая системы (Noguchi, Arakawa, 2008; Salvitti et al., 2015; Williams et al., 2011). Проведенные на *C. simula* исследования Тану с соавторами (Tanu et al., 2004), а также данные текущей работы показали, что у немертин ТТХ-позитивная метка локализована в кровеносной и ассоциированной с ней выделительной системах. Эти результаты свидетельствуют о том, что кровь немертин участвует в транспорте ТТХ, а его избыточное количество выводится выделительной системой. Стоит отметить, что у *C. cf. simula* токсин распределен очень неравномерно: наибольшее его количество выявлено в переднем отделе тела и в хоботе, а в заднем и среднем отделах тела концентрация ТТХ значительно ниже (Vlasenko, Magarlamov, 2020). Такие серьезные различия в концентрациях могут объясняться тем, что лишь органы переднего (предротового) отдела немертин наиболее обильно снабжаются кровью за счет разветвленной системы сосудов (Gibson, 1972b), а у немертин рода *Cephalothrix* отмечается присутствие ринхоцельного сосуда в хоботной системе (Kajihara, 2013). В остальных отделах тела кровь разносится лишь двумя боковыми, не имеющими разветвлений сосудами. Таким образом, особенности организации кровеносной системы могут приводить к накоплению ТТХ преимущественно в предротовом отделе и в хоботе.

В текущем исследовании ТТХ также был обнаружен в нервной и мышечной системах немертин. И хотя аналогичные данные были получены и для *C. simula* (Tanu et al., 2004), наличие токсина в мышечной и нервной системах не позволяет связать его присутствие в них с какой-либо определенной функцией.

Интегумент немертин представлен железистым эпителием, формирующим в больших количествах слизь, окутывающую животное (Norenburg, 1985). В формировании слизи также принимает участие и головная железа, имеющая эктодермальное происхождение и расположенная в предротовом отделе тела под кожно-мышечным мешком (Чернышев, 2011). Слизь, выделяемая немертинами, выполняет множество функций, связанных с механической защитой от твердых частиц, облегчением скольжения по сложному рельефу в местах обитания, вынашиванием потомства, формированием «домиков» (Oaks 1978; Voie, 1952; Norenburg, 1985), а также благодаря наличию токсинов различной природы, служит для отпугивания потенциальных врагов (Kem, 1985, Ali et al., 1990; Vlasenko, Magarlamov 2020). В текущем исследовании было показано, что из 4 типов железистых клеток, выявленных в интегументе, только два типа содержат ТТХ-положительный секрет – серозные клетки и гранулярные клетки III типа. В головной железе метка была выявлена в мукоидных железистых клетках; гранулярные клетки I и II типа не содержали ТТХ. Серозные клетки являются наиболее представленным типом кожных желез у *C. cf. simula*. По мнению ряда авторов, именно этот тип клеток служит для строительства слизистых «домиков» (Voie, 1952; Norenburg, 1985). Также показано, что эти клетки способны мгновенно опустошаться, полностью выделяя весь имеющийся секрет в ответ на стимуляцию (Oaks, 1978; Norenburg, 1985), что вероятно и объясняет обнаруженные «пустые» серозные клетки в интегументе *C. cf. simula*. Ряд авторов полагает, что такой мгновенный выброс слизи с одной стороны служит для моментального формирования стенок «домика», а с другой – может служить оперативным защитным механизмом в стрессовых условиях (Voie, 1952; Kem, 1985). ТТХ в секрете серозных клеток вероятно оказывают защитный эффект и служит для

отпугивания хищников. Другие эктодермальные железистые системы *C. cf. simula*, наоборот, выбрасывают токсичный секрет постоянно, небольшими порциями: это гранулярные клетки интегумента и мукоидные клетки фронтальной железы головного отдела. Согласно имеющимся данным, гранулярные клетки способны выделять секрет пролонгированно, в небольших количествах: по одной грануле (Oaks, 1978; Norenburg, 1985). Немногочисленные исследования, в которых обсуждаются функции головной железы, показывают, что ее клетки непрерывно вырабатывают слизь, которая дозированно высвобождается на поверхность покровного эпителия (Ferraris, 1979). Таким образом, ТТХ-позитивные гранулярные клетки интегумента и ТТХ-позитивные мукоидные клетки головной железы могут поддерживать некоторую постоянную концентрацию токсина в слизи.

Немертины являются преимущественно хищниками, которые используют выворачивающийся хобот в качестве оружия. В ряде работ показано, что секрет хобота немертин содержит целый спектр веществ различного действия (литического, нейротоксического и т.д.) (Stricker, Cloney, 1983; Ali et al., 1990; Von Reumont et al., 2020). В текущем исследовании было выявлено наличие ТТХ в составе секрета, аккумулирующегося в просвете хобота и в гранулах железистых гранулярных клеток II типа железистого эпителия хобота *C. cf. simula*. Было установлено, что гранулярные клетки II типа ассоциированы в пары с псевдокнид-содержащими клетками. Такая железистая система была описана и для других представителей палеонемертин и *Pilidiophora* (Montalvo et al., 1998, Turbeville, 2006, Magarlamov et al., 2021), и согласно предположениям многих авторов, эта система может принимать участие в обездвиживании и удержании добычи. Иными словами, «адгезивный» компонент, входящий в состав секрета бациллярных клеток, способен усиливать адгезию псевдокнид к тканям тела жертвы (Magarlamov et al., 2021), а токсичный компонент оказывает иммобилизирующее действие на нее.

Возможный путь внутриклеточной миграции ТТХ у немертин был предложен в исследовании распределения токсина у немертины *K. alborostrata*, проведенном Магарламовым с соавторами (Magarlamov et al. 2016). Было показано, что предположительными местами внутриклеточной локализации токсина являются секреторные гранулы отдельных типов клеток и их синтетический аппарат. Авторы предположили, что, попадая в клетку, ТТХ оседает в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме (ШЭР), связываясь с тропными ему структурами, вероятно, белками. Затем, связанный токсин переносится в секреторные гранулы. Полученные в настоящем исследовании результаты говорят об аналогичной внутриклеточной локализации ТТХ у *C. cf. simula*. Стоит отметить, что наличие ТТХ-связывающих транспортных белков было впервые показано на рыбе фугу (Yotsu-Yamashita et al., 2001), а также предполагается их наличие у других видов животных, содержащих ТТХ (Williams, 2010). Наличие подобных веществ у немертин и их структуру еще предстоит выяснить, что может являться дальнейшим направлением работы.

4.2 ТТХ-позитивные структуры у личинок *C. cf. simula*

Согласно данным о тканевом и клеточном распределении ТТХ у взрослых немертин *C. cf. simula*, токсин локализован преимущественно в эктодермальных структурах и пищеварительной системе (Malykin et al., 2021). В эктодермальных структурах, включая кожные покровы и железистый эпителий хобота, а также головную железу, ТТХ содержат железистые и ресничные клетки. Основными клетками, накапливающими ТТХ в пищеварительной системе взрослых немертин, являются энтероциты. У личинок *C. cf. simula* интенсивная ТТХ-позитивная метка локализуется в железистых и ресничных клетках эпидермиса, а также в ротовых железах уже на самых ранних стадиях развития (Malykin et al., 2023). Можно выдвинуть гипотезу, что некоторые личиночные ТТХ-позитивные клетки

эктодермального происхождения могут являться предшественниками таковых у взрослого животного.

Железистые клетки эпидермиса личинок можно отнести к клеткам дефинитивного эпителия, который не исчезает в процессе метаморфоза (Maslakova, von Döhren, 2009), а потому можно предположить, что клетки эпидермиса личинок, сходные по морфологии и локализации с таковыми у взрослого животного, могут являться их предшественниками. В настоящей работе в эпидермисе личинок *C. cf. simula* было выявлено четыре типа железистых клеток, из которых два – гранулярные клетки II типа и мукоидные клетки I типа содержали ТТХ (рис. 25). В эпидермисе взрослых червей *C. cf. simula* были идентифицированы три типа железистых клеток, а ТТХ был обнаружен в двух типах – гранулярных клетках III типа и серозных клетках. Наиболее сходными по форме и секреторной организации ТТХ-содержащими клетками эпидермиса личинок и взрослых особей являются гранулярные клетки II типа личинок и гранулярные клетки III типа взрослых особей соответственно. Можно предположить, что они относятся к одному и тому же типу клеток. Протоки обоих типов имеют овальную форму и заполнены крупными ТТХ-положительными секреторными гранулами сферической формы, содержащими плотно упакованный материал. Серозные клетки не были обнаружены у личинок *C. cf. simula*, но, в отличие от взрослых червей, эпидермис личинок содержит два типа мукоидных клеток. У взрослого *C. cf. simula* единственным эктодермальным органом, содержащими мукоидные клетки, является головная железа. Головная железа взрослых червей содержит два типа гранулярных клеток и один тип мукоидных клеток (Malykin et al., 2021), и только мукоидные клетки являются ТТХ-содержащими. Стоит отметить, что некоторые мукоидные клетки I типа личинок, локализованные в области зачатка головного мозга, занимают субэпидермальное положение и образуют длинные шейки, выходящие на поверхность эпидермиса. Можно выдвинуть гипотезу, что эти клетки, вероятно, являются будущими ТТХ-положительными мукоидными клетками головной железы взрослых червей. Однако, для подтверждения этого

предположения необходимы исследования формирования головной железы на заключительных стадиях личиночного развития и у ювенильных червей.

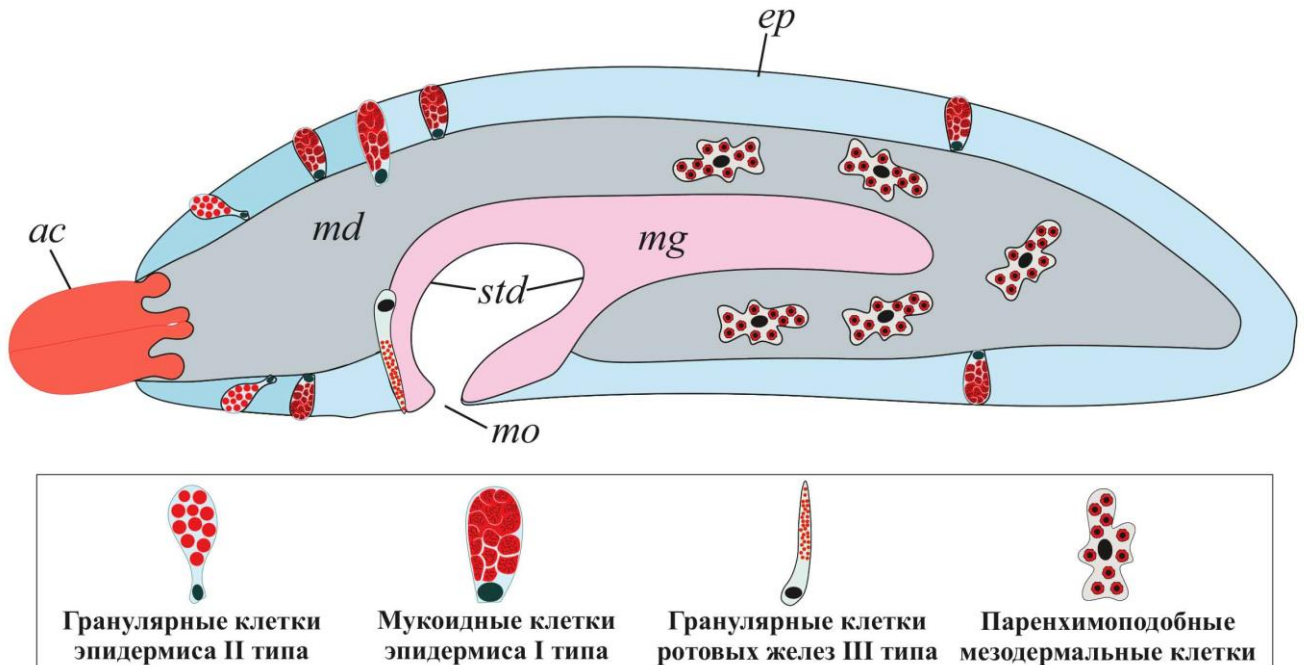


Рисунок 25 – Схема расположения основных тетродотоксин-позитивных структур у личинок *Cephalothrix cf. simula*. Красный – тетродотоксин-позитивные структуры. Условные обозначения: *ac* – апикальный цилиндр; *ep* – эпидермис; *md* – мезодерма; *mg* – кишка; *mo* – рот; *std* – стомодеум.

Пищеварительный канал личинок *C. cf. simula*, полностью сформированный на 3 сут, представлен ротовым отверстием на брюшной стороне тела, ведущим к узкому стомодеуму, переходящему в слепо заканчивающуюся кишку. На данном сроке пищеварительный канал имеет две отдельные железистые системы: железы стомодеума и ротовые железы. Расположение желез стомодеума на дне его полости рядом с кишкой указывает на то, что они могут участвовать в переваривании тканей добычи. Предположительно, добыча, в особенности крупные объекты, могут обволакиваться секретом железы в полости стомодеума личинки, а затем попадают в кишку, где происходит их переваривание. Считается, что железистые клетки, расположенные в стомодеуме, дают начало другим типам железистых клеток пищеварительной системы (Iwata, 1960), т.е. пищеварительные железы взрослых

немертин имеют эктодермальное происхождение (Smith, 1935; Iwata, 1960). Ротовые железы личинок *C. cf. simula*, расположенные в эпидермисе над ротовым отверстием, могут участвовать в адгезии к частичкам пищи при охоте. Железистые клетки, проявляющие адгезивную и якорную функции, уже были описаны у личинок и взрослых немертин (Iwata, 1960; Ferraris, 1979; Stricker, Reed, 1981; Norenburg, 1985; Montalvo et al., 1998). Например, считается, что клетки железы на заднем конце тела личинок немертин родов *Carcinonemertes* и *Cephalothrix* выделяют липкий материал, позволяющий им адгезировать к различным субстратам (Smith, 1935; Iwata, 1960; Stricker, Reed, 1981). У взрослых немертин железистые клетки, продуцирующие секрет, выполняющий адгезивную функцию, в основном локализованы в хоботе (Чернышев, 2011). Наблюдения за питанием личинок *in vivo* в ходе текущего исследования показали, что после встречи с добычей, личинка *C. cf. simula* захватывает ее ртом и кружит вокруг, не прерывая контакта с ее поверхностью, постепенно заглатывая целиком или небольшими фрагментами. Аналогичный тип питания описан и для личинок гоппонемертины *Emplectonema viride* (Mendes et al., 2023). Проведенные в настоящей работе иммуногистохимические исследования показали, что гранулярные клетки III типа ротовой железы содержат ТТХ, таким образом, ротовые железы могут участвовать не только в адгезии личинок к жертве, но и помогают ее иммобилизовать при помощи токсина.

На переднем конце личинки *C. cf. simula* расположена апикальная железа, секрет которой образует цилиндрическую структуру (апикальный цилиндр) (рис. 25), окружающую базальную часть султанчика. Данная структура впервые описана для личинок немертин в настоящей работе. Апикальные железы были описаны у личинок плоских червей отряда Polycladida (Ruppert, 1978; Lacalli, 1982, 1983; Dittmann et al., 2023) и гоппонемертин (Stricker, Reed, 1981; Magarlamov et al., 2020). Апикальные железы этих личинок являются частью апикального органа – нервной структуры, играющей важную роль в восприятии сигналов окружающей среды (Page, Parries, 2000; Sinigaglia et al., 2014). Несмотря на то, что в настоящей работе

апикальный орган не был подробно исследован, ассоциация апикальной железы с клетками апикальной пластинки позволяет предположить, что у личинок *C. cf. simula* апикальная железа также является частью апикального органа. Функции апикальной железы у личинок широко обсуждаются. Диттман и соавторы (Dittmann et al., 2023) выдвинули гипотезу, что у планктонной Мюллеровской личинки плоского червя *Prostheceraeus crozieri* чередование шеек железистых клеток апикальной железы выполняет стабилизирующую функцию султанчика. Считается, что секрет апикальной железы личинок паразитических гоплонемертин *Carcinonemertes epialti* позволяет им прикрепляться к подходящему субстрату во время оседания (Stricker, Reed, 1981). У гоплонемертин *QuasitetraSTEMMA stimpsoni* (= *TetraSTEMMA stimpsoni*) апикальная железа личинок трансформируется в головную железу взрослых червей (Magarlamov et al., 2020) и, следовательно, может выполнять аналогичную функцию, т.е. продуцировать слизь, попадающую на поверхность эпидермиса (Bürger, 1909). Однако у личинок палеонемертин апикальный орган, включая апикальную железу, полностью исчезает во время метаморфоза (Чернышев, 2011). Таким образом, вопрос о роли апикальной железы в жизнедеятельности личинок *C. cf. simula* остается открытым. Единственной структурой, обнаруженной в апикальной железе личинок *C. cf. simula*, содержащей ТТХ, является апикальный цилиндр. Хотя функции апикального цилиндра неочевидны, наблюдение за поведением личинок *in vivo* позволяет предположить, что он может быть вовлечен в обездвиживание добычи или отпугивание потенциальных хищников (Malykin et al., 2023). При встрече с яйцеклетками *K. alborostrata*, личинки *C. cf. simula* сначала прикасаются к их поверхности передним концом тела и только после этого начинают процесс их поедания. Токсин, содержащийся в апикальном цилиндре личинок, вероятно, может проникать в тело жертвы или хищника и обездвиживать их.

Единственными клетками в мезодерме личинок *C. cf. simula*, присутствующими в течение всего периода наблюдения, являются мышечные и паренхимоподобные клетки. Мышечная система личинок полностью формируется

к 3 сут. Подобно многим планулоподобным личинкам немертин, мышцы личинок *C. cf. simula* начинают функционировать сразу после формирования (von Döhren, 2016). Остальная часть пространства бластоцели занята неструктурированной массой паренхимоподобных клеток. Поскольку паренхимоподобные клетки заполнены гранулами желтка, вероятнее всего, их основной функцией является обеспечение личинки питательными веществами. В настоящей работе среди этих клеток была выделена субпопуляция моногранулярных паренхимоподобных клеток, цитоплазма которых содержит множественные цистерны ЭПР и желточные гранулы только одного типа. В этой субпопуляции происходит специфическая резорбция желточных гранул, не обнаруженная в других паренхимоподобных клетках: периферия гранул или один из их полюсов деградируют, в то время как центральная часть гранул остается цельной. В мезодерме личинок *C. cf. simula* только мышечные и моногранулярные паренхимоподобные клетки содержали ТТХ (рис. 25). ТТХ был обнаружен как в мышцах взрослых особей *C. cf. simula*, так и у других ТТХ-содержащих животных (Melnikova, Magarlamov, 2022). Однако неясно, выполняет ли ТТХ какую-либо физиологическую функцию в мышцах или накапливается в них из-за своих физико-химических свойств. Несмотря на то, что моногранулярные паренхимоподобные клетки уже были дифференцированы у личинок на 3 сут (рис.13А), ТТХ в этих клетках выявляли только у личинок на 6 сут (рис. 5В). Вероятно, что обнаружение ТТХ в гранулах желтка связано с его резорбцией, в результате чего антитела против ТТХ становятся способными проникать внутрь гранул. Это косвенно подтверждает и отсутствие ТТХ-позитивной метки в центральной части гранул и ее наличие на периферии. И хотя не представляется возможным выяснить, какое количество ТТХ содержат моногранулярные паренхимоподобные клетки в сравнении с остальными клеточными типами личинок, можно предположить, что они представляют из себя депо для ТТХ, из которого токсин при последующем развитии распределяется в целевые органы и ткани.

Несмотря на то, что большинство типов ТТХ-содержащих клеток у личинок и взрослых животных имеют различную морфологию, необходимо отметить общие закономерности в их тканевой локализации. Так же, как и у взрослых немертин, ТТХ-позитивные клетки у личинок присутствуют в интегументе, что говорит об их защитной функции. Личинки и взрослые особи обладают различным пищевым поведением: взрослые немертины являются засадными хищниками, охотясь на довольно широкий спектр типов животных, например – полихет и ракообразных (Göransson et al, 2017), в то время, как личинки являются лецитотрофными организмами, но на сроках развития от 3 сут способны питаться планктонными частицами, фрагментируя добычу, либо проглатывая целиком. Однако и взрослые особи, и личинки содержат токсин-содержащие клетки в органах, позволяющих им добывать питание: у личинок это ротовые железы, а у взрослых особей – это хобот, используемый немертинами для охоты.

4.3 Динамика содержания ТТХ у личинок *C. cf. simula*

В настоящей работе ТТХ у личинок был обнаружен в клетках, способных экскретировать токсин во внешнюю среду. Однако, на всех исследованных стадиях развития личинки сохраняли ТТХ, полученный от материнских яйцеклеток. Аналогичная закономерность в содержании ТТХ наблюдалась при раннем развитии тритона *T. granulosa*. У эмбрионов и недавно вылупившихся особей *T. granulosa* уровень ТТХ оставался таким же, как и у яиц (Gall et al., 2011, 2014). Содержание ТТХ значительно снижалось через четыре недели после вылупления тритонов и оставалось относительно постоянным вплоть до метаморфоза (Gall et al., 2011). У содержащих ТТХ рыб фугу и синекольчатых осьминогов *Naralochlaena* spp. напротив – содержание ТТХ постепенно увеличивалось в процессе эмбрионального развития и при последующем развитии после вылупления (Matsumura et al., 1998; Nagashima et al., 2010; Williams et al., 2011). У мальков *T. rubripes* общее содержание ТТХ снижалось, а затем увеличивалось на

поздних стадиях развития при содержании в клетке в море (Nagashima et al., 2010). Авторы данных работ предположили, что развивающиеся мальки или их бактериальные симбионты способны к синтезу ТТХ. На сегодняшний день не найдено доказательств того, что материнский организм, содержащий ТТХ, способен передавать потомству бактерий-продуцентов токсина. Более того, лабораторные условия могут негативно повлиять на рост потенциальных бактериальных симбионтов и продукцию ими ТТХ. Нагасима и соавторы предположили, что пищевые объекты также могут быть вовлечены в токсификацию рыбы фугу на поздних стадиях развития (Nagashima et al. 2010). В своей работе Кодама с коллегами обнаружили появление ТТХ в процессе развития личинок эктопаразитического копепода *Caligus fugu*. Авторы показали, что личинки *C. fugu* не содержали ТТХ на планктонной стадии, но в последующем получали его во время питания слизью, выделяемой кожными железами рыбы фугу (Kodama et al., 2021).

В отсутствие пищи, содержащей ТТХ, у личинок *C. cf. simula* не было выявлено признаков синтеза токсина, что указывает на то, что материнский организм (желток яйцеклеток) является для личинок единственным источником ТТХ. Исследования методом КЛСМ также не выявили ТТХ в кишке личинок. В то же время, взрослые особи *C. cf. simula* содержали ТТХ в фагосомах и цитоплазме энтероцитов во всех изученных регионах пищеварительной системы. Несмотря на имеющиеся на сегодняшний день данные о симбиотических бактериях, продуцирующих ТТХ у немертин (Carroll et al., 2003; Magarlamov et al., 2017; Turner et al., 2018), количества токсина, вырабатываемого бактериями, едва ли сопоставимы с уровнями ТТХ у соответствующего хозяина (Melnikova et al., 2019). Результаты морфологических исследований и физико-химического анализа взрослых особей *C. cf. simula* указывают на то, что ТТХ, обнаруженный в пищеварительной системе, имеет скорее пищевое, нежели бактериальное происхождение. Однако проведенные эксперименты не позволяют полностью

исключить или подтвердить влияние бактериальных штаммов-продуцентов ГТХ на токсичность развивающейся немертины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа посвящена иммуногистохимическим, ультраструктурным и физико-химическим исследованиям тканей и клеток взрослых особей и личинок высокотоксичной немертины *C. cf. simula* на разных стадиях развития: от выхода из яйцевых оболочек до поздней стадии личинки (41 сут). У взрослого животного впервые была изучена клеточная и тканевая локализация ТТХ в различных отделах тела: предротовом регионе, районе передней кишки, а также в среднем и заднем отделах тела немертин. Установлено, что у взрослых немертин ТТХ преимущественно аккумулируется в секреторных системах: гранулярных клетках III типа и серозных железистых клетках интегумента, мукоидных клетках головной железы, гранулярных клетках II типа железистого эпителия хобота. ТТХ также был ассоциирован с фагосомами энтероцитов кишечника. Впервые был проведен всесторонний комплексный анализ онтогенетических изменений в содержании, клеточной и тканевой локализации ТТХ у личинок животных, а также впервые получены данные о становлении и строении ТТХ-содержащих клеток и тканей личинок. Было установлено, что ТТХ в яйцеклетках *C. cf. simula* связан с гранулярным компонентом цитоплазмы, а у личинок сразу после выхода из яйцевых оболочек равномерно распределяется по клеткам, покрывающим личинку. Затем ТТХ аккумулируется в определенных типах клеток и структурах личинок (преимущественно секреторных): апикальном цилиндре, мукоидных клетках I типа и гранулярных клетках II типа эпидермиса, гранулярных клетках III типа ротовых желез, моногранулярных паренхимоподобных клетках мезодермы. Внутри клеток как личинок, так и взрослых немертин ТТХ ассоциирован преимущественно с гранулами железистых клеток, а также, предположительно, с ШЭР, что может говорить о наличии ТТХ-связывающих белков у немертин *C. cf. simula*. Было установлено, что структуры, аккумулирующие ТТХ у личинок, начиная с ранних личиночных стадий, и у взрослых особей *C. cf. simula*, входят в состав органов и тканей, которые используются немертинами для охоты, защиты и депонирования токсина, что впервые показано для животных. При этом, был проведен

сравнительный анализ ТТХ-содержащих структур у личинок и взрослых немертин, а также выдвинута гипотеза, что некоторые ТТХ-позитивные клетки личинок являются предшественниками таковых у взрослых особей. Также в работе впервые описан клеточный состав в ТТХ-позитивных тканях взрослого животного и личинок *C. cf. simula*. В работе помимо функций ТТХ-содержащих структур обсуждаются вопросы поступления и миграции токсина в организме немертин. Полученные в работе данные вносят вклад в понимание общих закономерностей строения и функционального назначения ТТХ-содержащих структур у различных типов животных. Результаты работы открывают перспективы последующих направлений исследований, к которым можно отнести поиск ТТХ-связывающих белков у немертин, исследование динамики содержания ТТХ, тканевой и клеточной локализации токсина, а также клеточного состава ТТХ-позитивных тканей у ювенильных особей *C. cf. simula*.

ВЫВОДЫ

1. Взрослые немертину *C. cf. simula* содержали от 2905,5 нг до 35102,5 нг ТТХ. Яйцеклетки немертин содержали от 8,917 до 11,951 нг ТТХ. Личинки различных стадий развития, развивающиеся в условиях, исключающих поступление токсина с пищей, содержали от 4,401 до 12,529 нг ТТХ. У таких личинок не выявлено статистически значимых различий в уровне содержания ТТХ с яйцеклетками и между личинками различных стадий развития, что говорит о сохранении ТТХ, полученного с яйцеклетками.

2. У личинок местами аккумуляции токсина являются эпидермис, апикальный цилиндр, ротовые железы, мезодермальные структуры. У взрослых немертин таковыми являются секреторные системы: интегумент, головная железа, железистый эпителий хобота, а также пищеварительный тракт. Ткани и органы, содержащие клеточные элементы, аккумулирующие ТТХ у личинок и у взрослых особей *C. cf. simula*, используются животным для охоты, защиты и депонирования токсина.

3. У личинок *C. cf. simula* в эпидермисе идентифицированы 6 клеточных типов, из которых ТТХ аккумулируют преимущественно мукоидные железистые клетки I типа и гранулярные железистые клетки II типа. В группе ротовых желез идентифицировано 4 типа клеток, из которых ТТХ содержат железистые клетки III типа. В мезодерме ТТХ-позитивными являются моногранулярные паренхимоподобные клетки.

4. У взрослых немертин *C. cf. simula* в интегументе идентифицированы 5 типов клеток, из которых ТТХ аккумулируют преимущественно серозные железистые клетки и гранулярные железистые клетки III типа. В железистом эпителии хобота идентифицированы 5 типов клеток, из которых ТТХ аккумулируют преимущественно железистые клетки II типа. В головной железе идентифицированы 3 типа клеток, из которых ТТХ содержат мукоидные железистые клетки. В эпителии пищеварительного тракта идентифицированы 4 типа клеток, из которых ТТХ содержат фагоцитирующие энтероциты.

5. Гранулярные железистые клетки II типа эпидермиса личинок и мукоидные клетки эпидермиса личинок демонстрируют сходство в форме, секреторной организации и локализации с гранулярными железистыми клетками III типа интегумента, и мукоидными клетками головной железы взрослых особей соответственно, и могут давать им начало.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Магарламов Т.Ю., Чернышев А.В. Ультратонкое строение эпидермиса личинок немертины *QuasitetraSTEMMA stimpsoni* (Chernyshev, 1992) (HoploneMerteA) // Биология моря. 2009. Т. 35. С. 22–28.
2. Чернышев А.В. Сравнительная морфология, систематика и филогения немертин. Владивосток: Дальнаука, 2011. С.132–133.
3. Abal P., Carmen Louzao M., Antelo A., Alvarez M., Cagide E., Vilariño N., Mercedes R., Botana Luis V., Botana Luis M. Acute oral toxicity of tetrodotoxin in mice: Determination of lethal dose 50 (LD50) and no observed adverse effect level (NOAEL) // Toxins. 2017. Vol. 9, № 3. Article No. 75. DOI: 10.3390/toxins9030075.
4. Akbora H.D., Kunter İ., Erçetin T., Elagöz A.M., Çiçek B.A. Determination of tetrodotoxin (TTX) levels in various tissues of the silver cheeked puffer fish (*Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789)) in Northern Cyprus Sea (Eastern Mediterranean) // Toxicon. 2020. Vol. 175. P. 1–6. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.12.002
5. Ali A.E., Arakawa O., Noguchi T., Miyazawa K., Shida Y., Hashimoto K. Tetrodotoxin and related substances in a ribbon worm *Cephalothrix linearis* (Nemertean) // Toxicon. 1990. Vol. 28, № 9. P. 1083–1093.
6. Antonelli P., Peruzzo A., Mancin M., Boscolo Anzoletti A., Dall'Ara S., Orsini M., Bordin P., Arcangeli G., Zanolin B., Barco L., Losasso C. Tetrodotoxin in bivalve mollusks: An integrated study towards the comprehension of the influencing factors of a newly native phenomenon // Chemosphere. 2023. Vol. 339. Article No. 139682. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2023.139682.
7. Asakawa M., Toyoshima T., Shida Y., Noguchi T., Miyazawa, K. Paralytic toxins in a ribbon worm *Cephalothrix* species (Nemertean) adherent to cultured oysters in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan // Toxicon. 2000. Vol. 38, № 6. P. 763–773.
8. Asakawa M., Toyoshima T., Ito K., Bessho K., Yamaguchi C., Tsunetsugu S., Shida Y., Kajihara H., Mawatari S.F., Noguchi T., Miyazawa K. Paralytic toxicity in the

ribbon worm *Cephalothrix* species (Nemertea) in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan and the isolation of tetrodotoxin as a main component of its toxins // *Toxicon*. 2003. Vol. 41, № 7. P. 747–753.

9. Asakawa M., Gomez-Delan G., Tsuruda S., Shimomura M., Shida Y., Taniyama S., Barte-Quilantang M., Shindo J. Toxicity assessment of the xanthid crab *Demania cultripes* from Cebu Island, Philippines // *Journal of Toxicology*. 2010. Vol. 2010. Article No. 1–7. DOI: 10.1155/2010/172367.

10. Asakawa M., Ito K., Kajihara H. Highly toxic ribbon worm *Cephalothrix simula* containing tetrodotoxin in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan // *Toxins*. 2013. Vol. 5, № 2. P. 376–395.

11. Asakawa M., Matsumoto T., Umezaki K., Kaneko K., Yu X., Gomez-Delan G., Tomano S., Noguchi T., Ohtsuka S. Toxicity and toxin composition of the greater blue-ringed octopus *Hapalochlaena lunulata* from Ishigaki Island, Okinawa Prefecture, Japan // *Toxins*. 2019. Vol. 11, № 5. Article No. 245. DOI: 10.3390/toxins11050245.

12. Bacchiocchi S., Campacci D., Siracusa M., Dubbini A., Leoni F., Tavoloni T., Accoroni S., Gorbi S., Giuliani M.E., Stramenga A., Piersanti A. Tetrodotoxins (TTXs) and *Vibrio alginolyticus* in mussels from Central Adriatic Sea (Italy): Are they closely related? // *Marine Drugs*. 2021. Vol. 19, № 6. Article No. 304. DOI:10.3390/md19060304.

13. Bane V., Lehane M., Dikshit M., O'Riordan A., e Furey A. Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection // *Toxins*. 2014. Vol. 6, № 2. Article No. 693–755. DOI: 10.3390/toxins6020693.

14. Bane V., Brosnan B., Barnes P., Lehane M., Furey A. High-resolution mass spectrometry analysis of tetrodotoxin (TTX) and its analogues in puffer fish and shellfish // *Food Additives & Contaminants. Part A*. 2016. Vol. 33, № 9. P. 1468–1489. DOI:10.1080/19440049.2016.1218070.

15. Bartolomaeus T., Von Döhren J. Comparative morphology and evolution of the nephridia in Nemertea // *Journal of Natural History*. 2010. Vol. 44, № 37–40. P. 2255–2286.
16. Bartolomaeus T., Maslakova S., Von Döhren J. Protonephridia in the larvae of the paleonemertean species *Carinoma mutabilis* (Carinomidae, Nemertea) and *Cephalothrix (Procephalothrix) filiformis* (Cephalothricidae, Nemertea) // *Zoomorphology*. 2014. Vol. 133, № 1. P. 43–57. DOI:10.1007/s00435-013-0206-3.
17. Biessy L., Smith K. F., Boundy M. J., Webb S. C., Hawes I., Wood S. A. Distribution of tetrodotoxin in the New Zealand clam, *Paphies australis*, established using immunohistochemistry and liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry // *Toxins*. 2018. Vol. 10, № 7. Article No. 282. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins10070282>.
18. Biessy L., Boundy M.J., Smith K.F., Harwood D.T., Hawes I., Wood S.A. Tetrodotoxin in marine bivalves and edible gastropods: A mini-review // *Chemosphere*. 2019. Vol. 236. Article No. 124404. DOI:10.1016/j.chemosphere.2019.124404.
19. Boie H. J. Die Paketdrüsenzzone von *Lineus rüber* O. F. Müller (Nemertini) // *Zeitschrift für Morphology und Ökologie der Tiere*. 1952. Vol. 41. P. 188–222.
20. Brodie E.D., Jr., Hensel J.L., Jr., Johnson J.A. Toxicity of the urodele amphibians *Taricha*, *Notophthalmus*, *Cynops* and *Paramesotriton* (Salamandridae) *Copeia*. 1974. P. 506–511.
21. Bucciarelli G. M., Li A., Kats L. B., Green D. B. Quantifying tetrodotoxin levels in the California newt using a non-destructive sampling method // *Toxicon*. 2014. Vol. 80. P. 87–93.
22. Bürger O. (1909) Die Nemertinen. In: *Deutsche Tiefsee Expedition 1898-1899*. P. 171–221.

23. Campbell M.E., Schwartz M. (2008) Immunohistological visualization of tetrodotoxin in *Micrura verrili* and *Dushia atra* (Phylum Nemertea). In: National Conferences for Undergraduate Research (NCUR). Salisbury, MD, USA, 10–12 April.
24. Chernyshev A.V., Magarlamov T.Yu., Turbeville J.M. Morphology of the proboscis of *Hubrechtella Juliae* (nemertea, pilidiophora): Implications for pilidiophoran monophyly // *Journal of Morphology*. 2013. Vol. 274, № 12. P. 1397–1414.
25. Chernyshev A.V. Nemertean biodiversity in the Sea of Japan and adjacent areas. In *Marine Biodiversity and Ecosystem Dynamics of the Northwest Pacific Ocean* // Publishing House of Science: Beijing, 2014; P. 119–135.
26. Chernyshev A.V., Kajihara H. Comparative muscular morphology in Archinemertea (Nemertea: Palaeonemertea) // *Zoomorphology*. 2019. Vol. 138, № 2. P. 193–207.
27. Dao H.V., Takata Y., Sato S., Fukuyo Y. Kodama M. Frequent occurrence of the tetrodotoxin-bearing horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda* in Vietnam // *Fisheries Science* 2009. Vol. 75, № 2. P. 435–438.
28. Dittmann I.L., Grosbusch A.L., Nagler M., Salvenmoser W., Zankel A., Telford M.J., Egger B. The ultrastructure of the apical organ of the Müller's larva of the tiger flatworm *Prostheceraeus crozieri* // *Cell Biology International*. 2023. Vol. 47, № 8. P. 1354–1367.
29. Dhanji-Rapkova M., Alves M. T., Triñanes J. A., Martinez-Urtaza J., Haverson D., Bradley K., Baker-Austin C., Huggett J.F., Stewart G., Ritchie J. M., Turner A.D. Sea temperature influences accumulation of tetrodotoxin in British bivalve shellfish // *Science of The Total Environment*. 2023. Vol. 885. Article No. 163905. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.163905.
30. Do H.K., Kogure K., Simidu U. Identification of deep-sea-sediment bacteria which produce tetrodotoxin // *Applied and Environmental Microbiology*. 1990. Vol. 56, № 4. P. 1162–1163.

31. Endo R. Toxicological studies on puffer fishes: Comparison of toxicities on the various species. *The Journal of Toxicological Science*. 1984. Vol. 9. P. 1–11.
32. Ferraris J.D. Histological study of cephalic glands in selected nemertina // *Transactions of the American Microscopical Society*. 1979. Vol. 93. P. 437–446.
33. Ferrer R.P., Zimmer R.K. The scent of danger: Arginine as an olfactory cue of reduced predation risk // *Journal of Experimental Biology*. 2007. Vol. 210, № 10. P. 1768–1775.
34. Gall B.G., Stokes A.N., French S.S., Schlepphorst E.A., Brodie Jr E.D., Brodie III E.D. Tetrodotoxin levels in larval and metamorphosed newts (*Taricha granulosa*) and palatability to predatory dragonflies // *Toxicon*. 2011. Vol. 57, № 7–8. P. 978–983.
35. Gall B.G., Stokes A.N., Pett J.J., Spivey K.L., French S.S., Brodie III E.D. Brodie Jr, E.D. Tetrodotoxin concentrations within a clutch and across embryonic development in eggs of the rough-skinned newts (*Taricha granulosa*) // *Toxicon*. 2014. Vol. 90. P. 249–254.
36. Gao W., Kanahara Y., Tatsuno R., Soyano K., Nishihara G.N., Urata C., Takatani T., Arakawa O. Maturation-associated changes in internal distribution and intra-ovarian microdistribution of tetrodotoxin in the pufferfish *Takifugu pardalis* // *Fisheries Science*. 2018. Vol. 84, № 4. P. 723–732.
37. Gao W., Yamada M., Ohki R., Nagashima Y., Tatsuno R., Ikeda K., Kawatsu K., Takatani T., Arakawa O. Evaluation of the tetrodotoxin uptake ability of pufferfish *Takifugu rubripes* tissues according to age using an in vitro tissue slice incubation method // *Toxicon*. 2020. Vol. 174. P. 8–12.
38. Gibson R. The physiology of digestion in nemertean worms // *Boi. Zool. E Biol. Marinha, N. S.* 1972. Vol. 29. P. 55–64.
39. Gibson R. The role of the blood system in Nemerteans // *Bol. Zool. E Biol. Mar.* 1972. Vol. 29, № 29. P. 45.

40. Gibson R. Nemertea biology of the integument // J. Bereiter-Hahn et al. (eds.), *Biology of the Integument*. 1984. P. 205–211
41. Göransson U., Jacobsson E., Strand M., Andersson H. S. The toxins of nemertean worms // *Toxins*. 2019. Vol. 11, № 2. Article No. 120. DOI: 10.3390/toxins11020120.
42. Guardone L., Maneschi A., Meucci V., Gasperetti L., Nucera D., Armani A. Global retrospective study on human cases of tetrodotoxin (TTX) poisoning after seafood consumption // *Food Reviews International*. 2019. Vol. 36, № 7. P. 645–667.
43. Hanifin C.T., Yotsu-Yamashita M., Yasumoto T., Brodie Jr E.D., Brodie III E.D. Toxicity of dangerous prey: Variation of tetrodotoxin levels within and among populations of the newt *Taricha granulosa* // *Journal of Chemical Ecology*. 1999. Vol. 25. P. 2161–2175.
44. Hanifin C.T., Brodie E.D., Brodie E.D. Tetrodotoxin levels of the rough-skin newt, *Taricha granulosa*, increase in long-term captivity // *Toxicon*. 2002. Vol. 40, № 8. P. 1149–1153.
45. Hanifin C.T. The chemical and evolutionary ecology of tetrodotoxin (TTX) toxicity in terrestrial vertebrates // *Marine Drugs*. 2010. Vol. 8, № 3. P. 577–593.
46. Hassoun A.E.R., Ujević I., Jemaa S., Roje-Busatto R., Mahfouz C., Fakhri M., Nazlić N. Concentrations of tetrodotoxin (TTX) and its analogue 4,9-anhydro TTX in different tissues of the silver-cheeked pufferfish (*Lagocephalus sceleratus*, Gmelin, 1789) caught in the South-Eastern Mediterranean Sea, Lebanon // *Toxins*. 2022. Vol. 14, № 2. Article No. 123. DOI:10.3390/toxins14020123.
47. Herre A.W. *Gobies of the Philippines and the China Sea* // Bureau of Printing, 1927. P. 352.
48. Hiebert L.S., Gavelis G.S., von Dassow G., Maslakova S.A. Five invaginations and shedding of the larval epidermis during development of the hoplonemertean

Pantionemertes californiensis // Journal of Natural History. 2010. Vol. 44. P. 2331–2347.

49. Honda S., Ichimaru S., Arakawa O., Takatani T., Noguchi T., Ishizaki S., Nagashima Y. Toxicity of puffer fish fins // Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 2007. Vol. 48. P. 159–162.

50. Huang H.N., Zheng R.J., Liu L.L., Zheng, M., Li Z.J. Determination of tetrodotoxin in *Carcinoscorpius rotundicauda* (Horseshoe Crab) by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Analytical Letters. 2016. Vol. 49, № 15. P. 2377–2383.

51. Hwang D.F., Arakawa O., Saito T., Noguchi T., Simidu U., Tsukamoto K., Shida Y., Hashimoto K. Tetrodotoxin-producing bacteria from the blue-ringed octopus *Octopus maculosus* // Marine Biology. 1989. Vol. 100, № 3. P. 327–332.

52. Ikeda K., Venmathi Maran B.A., Honda S., Ohtsuka S., Arakawa O., Takatani T., Asakawa M., Boxshall G.A. Accumulation of tetrodotoxin (TTX) in *Pseudocaligus fugu*, a parasitic copepod from panther puffer *Takifugu pardalis*, but without vertical transmission—Using an immunoenzymatic technique // Toxicon. 2006. Vol. 48, № 1. P. 116–122.

53. Ito K., Okabe S., Asakawa M., Bessho K., Taniyama S., Shida Y., Ohtsuka S. Detection of tetrodotoxin (TTX) from two copepods infecting the grass puffer *Takifugu niphobles*: TTX attracting the parasites? // Toxicon. 2006. Vol. 48, № 6. P. 620–626.

54. Itoi S., Yoshikawa S., Tatsuno R., Suzuki M., Asahina K., Yamamoto S., Takanashi S., Takatani T., Arakawa O., Sakakura Y., Sugita H. Difference in the localization of tetrodotoxin between the female and male pufferfish *Takifugu niphobles*, during spawning // Toxicon. 2012. Vol. 60, № 6. P. 1000–1004.

55. Itoi S., Yoshikawa S., Asahina K., Suzuki M., Ishizuka K., Takimoto N., Mitsuoka R., Yokoyama N., Detake A., Takayanagi C., Eguchi M., Tatsuno R., Kawane M., Kokubo S., Takanashi S., Miura A., Suitoh K., Takatani T., Arakawa O., Sakakura Y.,

Sugita H. Larval pufferfish protected by maternal tetrodotoxin // *Toxicon*. 2014. Vol. 78. P. 35–40.

56. Itoi S., Suzuki M., Asahina K., Sawayama E., Nishikubo J., Oyama H., Takei M., Shiibashi N., Takatani T., Arakawa O., Sugita H. Role of maternal tetrodotoxin in survival of larval pufferfish // *Toxicon*. 2018. Vol. 148. P. 95–100.

57. Itoi S., Sato T., Takei M., Yamada R., Ogata R., Oyama H., Teranishi S., Kishiki A., Wada T., Noguchi K., Abe M., Okabe T., Akagi H., Kashitani M., Suo R., Koito T., Takatani T., Arakawa O., Sugita H. The planocercid flatworm is a main supplier of toxin to tetrodotoxin-bearing fish juveniles // *Chemosphere*. 2020. Vol. 249. Article No. 126217. DOI:10.1016/j.chemosphere.2020.126217.

58. Iwata F. Studies on the comparative embryology of nemertean with special reference to their interrelationships // *Publications from the Akkeshi Marine Biological Station*. 1960. Vol. 10. P. 2–51.

59. Jang J., Yotsu-Yamashita M. Distribution of tetrodotoxin, saxitoxin, and their analogs among tissues of the puffer fish *Fugu pardalis* // *Toxicon*. 2006. Vol. 48, № 8. P. 980–987.

60. Jennings J.B. Ultrastructural observations on the phagocytic uptake of food materials by the ciliated cells of the rhynchocoelan intestine // *Biology Bulletin*. 1969. Vol. 137, № 3. P. 476–485.

61. Jennings, J.B., Gibson, R. Observations on the nutrition of seven species of rhynchocoelan worms // *Biology Bulletin*. 1969. Vol.136. P. 405–433.

62. Junoy J., Montalvo S., Roldán C., García-Corrales P. Ultrastructural study of the bacillary, granular and mucoid proboscoidal gland cells of *Riseriellus occultus* (Nemertini, Heteronemertini) // *Acta Zoologica*. 2000. Vol 81. P. 235–242.

63. Kadota N., Narita H., Murakami R., Noguchi T. The toxicity of starfishes, *Astropecten* genus, inhabiting the coast of Toyama Bay // Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi). 2008. Vol. 49, № 6. P. 422–427.
64. Kajihara H., Sun S.C., Chernyshev A.V., Chen H., Ito K., Asakawa M., Maslakova S. A., Norenburg J. L., Strand M., Sundberg P., Iwata F. Taxonomic identity of a tetrodotoxin-accumulating ribbon-worm *Cephalothrix* cf. *simula* (Nemertea: Palaeonemertea): A species artificially introduced from the Pacific to Europe // Zoological Science 2013. Vol. 30, № 11. P. 985–997.
65. Kajihara H. Resolving a 200-year-old taxonomic conundrum: Neotype designation for *Cephalothrix linearis* (nemertea: Palaeonemertea) based on a topotype from Bergen, Fauna Norvegica 2019, Vol. 39, P. 39–76.
66. Katikou P., Gokbulut C., Kosker A.R., Campàs M., Ozogul F. An updated review of tetrodotoxin and its peculiarities // Marine Drugs. 2022. Vol. 20, № 1. Article No. 47. doi:10.3390/md20010047.
67. Kem W.R. Structure and action of nemertine toxins // Integrative and Comparative Biology. 1985. Vol. 25. P. 99–111.
68. Kodama M., Sato S., Ogata T., Suzuki Y., Kaneko T., Aida K. Tetrodotoxin secreting glands in the skin of puffer fishes // Toxicon. 1986. Vol. 24, № 8. P. 819–829.
69. Kodama T., Ikeda K., Arakawa O., Kondo Y., Asakawa M., Kawatsu K., Ohtsuka S. Evidence of accumulation of tetrodotoxin (TTX) in tissues and body parts of ectoparasitic copepods via their feeding on mucus of TTX-bearing pufferfish // Toxicon. 2021. Vol. 204. P. 37–43.
70. Kudo Y., Yasumoto T., Konoki K., Cho Y., Yotsu-Yamashita M. isolation and structural determination of the first 8-epi-type tetrodotoxin analogs from the newt, *Cynops ensicauda popei*, and comparison of tetrodotoxin analogs profiles of this newt and the puffer fish, *Fugu poecilonotus* // Marine Drugs. 2012. Vol. 10, № 12. P. 655–667.

71. Kudo Y., Chiba C., Konoki K., Cho Y., Yotsu-Yamashita M. Dietary administration of tetrodotoxin and its putative biosynthetic intermediates to the captive-reared non-toxic Japanese fire-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster* // *Toxicon*. 2017. Vol. 137. P. 78–82.
72. Kungsuwan A., Noguchi T., Hashimoto K., Nagashima Y., Shida Y., Suvapeepan S., Suwansakornku P. Tetrodotoxin in the horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda* inhabiting Thailand // *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Nippon Suisan Gakkaishi)*. 1987. Vol. 53. P. 261–266.
73. Lacalli T.C. The brain and central nervous system of Müller's larva // *Canadian Journal of Zoology*. 1983. Vol. 61, № 1. P. 39–51.
74. Lago J., Rodríguez L. P., Blanco L., Manuel Vieites J., Cabado A. G. Tetrodotoxin, an Extremely Potent Marine Neurotoxin: Distribution, Toxicity, Origin and Therapeutical Uses // *Marine Drugs*. 2015. Vol. 13, № 10. P. 6384–6406.
75. Lin S.J., Tsai Y.H., Lin H.P., Hwang D.F. Paralytic toxins in Taiwanese starfish *Astropecten scoparius* // *Toxicon*. 1998. Vol. 36, № 5. P. 799–803.
76. Lin S.J., Hwang D. F. Possible source of tetrodotoxin in the starfish *Astropecten scoparius* // *Toxicon*. 2001. Vol. 39, P. 573–579.
77. Ling E.A. 1971. The proboscis apparatus of the nemertine *Lineus ruber* // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. Vol. 262, Article No. 840. DOI:10.1098/rstb.1971.0077.
78. Magarlamov T.Y., Shokur O.A., Chernyshev A.V. Distribution of tetrodotoxin in the ribbon worm *Lineus alborostratus* (Takakura, 1898) (Nemertea): Immunoelectron and immunofluorescence studies // *Toxicon*. 2016. Vol. 112. P. 29–34.
79. Magarlamov T.Y., Melnikova D.I., Chernyshev A.V. Tetrodotoxin-producing bacteria: Detection, distribution and migration of the toxin in aquatic systems // *Toxins*. 2017. Vol. 9. Article No. 166. DOI:10.3390/toxins9050166.

80. Magarlamov T.Yu., Melnikova D.I., Shokur O.A., Gorobets E.A. Rapid production of tetrodotoxin-like compounds during sporulation in a marine isolate *Bacillus* sp. 1839 // *Microbiology*. 2017. Vol. 86, № 2. P. 192–196.
81. Magarlamov T.Y., Dyachuk V.A., Chernyshev A.V. Does the frontal sensory organ in adults of the hoplonemertean *Quasitetrastemma simpsoni* originate from the larval apical organ? // *Frontiers in Zoology*. 2020. Article No. 17:1–19. <https://doi.org/10.1186/s12983-019-0347-4>.
82. Magarlamov T.Y., Turbeville J.M., Chernyshev A.V. Pseudocnidae of ribbon worms (Nemertea): Ultrastructure, maturation, and functional morphology // *PeerJ*. 2021. Vol. 9, Article No. e10912. DOI: 10.7717/peerj.10912.
83. Mahmud Y., Arakawa O., Ichinose A., Tanu M.B., Takatani T., Tsuruda K., Kawatsu K., Hamano Y., Noguchi T. Intracellular visualization of tetrodotoxin (TTX) in the skin of a puffer *Tetraodon nigroviridis* by immunoenzymatic technique // *Toxicon*. 2003. Vol. 41, № 5. P. 605–611.
84. Mahmud Y., Okada K., Takatani T., Kawatsu K., Hamano Y., Arakawa O., Noguchi T. Intra-tissue distribution of tetrodotoxin in two marine puffers *Takifugu vermicularis* and *Chelonodon patoca* // *Toxicon*. 2003. Vol. 41. P. 13–18.
85. Mailho-Fontana P.L., Jare, C., Antoniazzi M.M., Sciani J.M., Pimenta D.C., Stokes A.N., Grant T., Brodie E.D., Brodie E.D. Variations in tetrodotoxin levels in populations of *Taricha granulosa* are expressed in the morphology of their cutaneous glands // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, № 1. Article No. 18490. DOI:10.1038/s41598-019-54765-z.
86. Malykin G.V., Chernyshev A.V., Magarlamov T.Yu. Intrabody tetrodotoxin distribution and possible hypothesis for its migration in ribbon worms *Cephalothrix* cf. *simula* (Palaeonemertea, Nemertea) // *Marine Drugs*. 2021. Vol. 19, № 9. Article No. 494. DOI: 10.3390/md19090494.

87. Malykin G.V., Velansky P.V., Melnikova D.I., Magarlamov T.Y. Tetrodotoxins in larval development of ribbon worm *Cephalothrix cf. simula* (Palaeonemertea, Nemertea) // *Marine Biotechnology*. 2023. Vol. 25. P. 918–934.
88. Maslakova S.A., Martindale M.Q., Norenburg J.L. Vestigial prototroch in a basal nemertean, *Carinoma tremaphoros* (Nemertea; Palaeonemertea) // *Evol. Dev.* 2004. Vol. 6, № 4. P. 219–226.
89. Maslakova S.A., Hiebert T.C. From trochophore to pilidium and back again - a larva's journey // *International Journal of Developmental Biology*. 2014. Vol. 58, № 6-7-8. P. 585–591. DOI: 10.1387/ijdb.140090sm.
90. Maslakova S.A., von Döhren J. Larval development with transitory epidermis in *Paranemertes peregrina* and other hoplonemerteans // *Biology Bulletin*. 2009. Vol. 216 P. 273–292. DOI: 10.1086/BBLv216n3p273.
91. Matsumoto T.; Nagashima Y.; Kusuhara H.; Ishizaki S.; Shimakura K.; Shiomi K. Pharmacokinetics of tetrodotoxin in puffer fish *Takifugu rubripes* by a single administration technique // *Toxicon*. 2008. Vol. 51, № 6. P. 1051–1059. DOI:10.1016/j.toxicon.2008.01.007.
92. Matsumura K. Tetrodotoxin as a pheromone // *Nature*. 1995. Vol. 378. P. 563–564. DOI:10.1038/378563b0.
93. Matsumura K. Production of tetrodotoxin in puffer fish embryos // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 1998. Vol. 6, № 4. P. 217–219. DOI:10.1016/S1382-6689(98)00037-4.
94. McDermott J.J. Observations on the food and feeding behavior of estuarine nemertean worms belonging to the order Hoplonemertea // *Biol. Bull.* 1976. Vol. 150, № 1. P. 57–68.
95. McDermott J.J., Roe P. Food, Feeding Behavior and Feeding Ecology of Nemerteans // *American Zoologist*. 1985. Vol. 25, № 1. P. 113–125.

96. Mebs D., Arakawa O., Yotsu-Yamashita M. Tissue distribution of tetrodotoxin in the red-spotted newt *Notophthalmus viridescens* // *Toxicon*. 2010. Vol. 55, № 7. P. 1353–1357. DOI:10.1016/j.toxicon.2010.02.009.
97. Melnikova D.I., Vlasenko A.E., Magarlamov T.Y. Stable tetrodotoxin production by *Bacillus* sp. Strain 1839 // *Marine Drugs*. 2019. Vol. 17, №12. Article No. 704. DOI: 10.3390/md17120704.
98. Melnikova D.I., Magarlamov T.Yu. An overview of the anatomical distribution of tetrodotoxin in animals // *Toxins*. 2022. Vol. 14, № 8. Article No. 576. DOI:10.3390/toxins14080576.
99. Mendes C.B., von Dassow G., Andrade S.C.S., Maslakova S. Raising predatory babies: Development from fertilization to sexual maturity of the hoplonemertean *Emplectonema viride* (Nemertea) // *Marine Biology*. 2023. Vol. 170, № 11. Article No. 135. DOI:10.1007/s00227-023-04287-0.
100. Miyazawa K., Jeon J.K., Maruyama J., Noguchi T., Ito K., Hashimoto K. Occurrence of tetrodotoxin in the flatworm *Planocera multitentaculata* // *Toxicon*. 1986. Vol. 24, № 7. P. 645–650.
101. Miyazawa K., Jeon J.K., Noguchi T., Ito K., Hashimoto, K. Distribution of tetrodotoxin in the tissues of the flatworm *Planocera multitentaculata* (Platyhelminthes) // *Toxicon*. 1987. Vol. 25, № 9. P. 975–980. DOI:10.1016/0041-0101(87)90160-7.
102. Miyazawa K., Higashiyama M., Ito K., Noguchi T., Arakawa O., Shida Y., Hashimoto K. Tetrodotoxin in two species of ribbon worm (Nemertini), *Lineus fuscoviridis* and *Tubulanus punctatus* // *Toxicon*. 1988. Vol. 26, № 9. P. 867–874. DOI:10.1016/s0021-9258(17)33279-9.
103. Mochida K., Kitada M., Ikeda K., Toda M., Takatani T., Arakawa O. Spatial and temporal instability of local biotic community mediate a form of aposematic defense in newts, consisting of carotenoid-based coloration and tetrodotoxin // *J. Chem. Ecol.* 2013. Vol. 39, № 9. P. 1186–1192. DOI 10.1007/s10886-013-0342-8.

104. Montalvo S., Junoy J., Roldan C., García-Corrales P. Ultrastructural study of the sensory cells of the proboscis glandular epithelium of *Riseriellus occultus* (Nemertea, Heteronemertea) // Journal of Morphology. 1996. Vol. 229. P. 83–96.
105. Montalvo S., Roldán C., Junoy J., García-Corrales P. Ultrastructural study of two glandular systems in the proboscoidal glandular epithelium of *Riseriellus occultus* (Nemertea, Heteronemertea) // Zoomorphology. 1998. Vol. 117, № 4. P. 247–257.
106. Nagashima Y., Matakai I., Toyoda M., Nakajima H., Tsumoto K., Shimakura K., Tsumoto K. Change in tetrodotoxin content of the puffer fish *Takifugu rubripes* during seed production from fertilized eggs to juveniles // Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi). 2010. Vol. 51. P. 48–51.
107. Nagashima Y., Nagashima Y., Matsumoto T., Kadoyama K., Ishizaki S., Terayama M. Toxicity and molecular identification of green toadfish *Lagocephalus lunaris* collected from Kyushu Coast, Japan // Journal of Toxicology. 2011. Vol. 2011. Article No. 801285. DOI:10.1155/2011/801285.
108. Nagashima Y., Arakawa O. Pufferfish poisoning and tetrodotoxin // Marine and Freshwater Toxins / ed. Gopalakrishnakone P. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. Article No. 1–21. DOI 10.1007/978-94-007-6650-1_12-1.
109. Nam S.E., Rhee J.S. Characterization and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of the marine ribbon worm *Cephalothrix* species (Nemertea: Palaeonemertea) // Mitochondrial DNA Part B. 2020. Vol. 5, № 2. P. 2012–2014.
110. Sugita H., Matsubara S., Miwa N., Akahane S., Murakami M., Goto T., Nara M., Noguchi T., Saito T., Shida Y., Hashimoto K. *Vibrio alginolyticus*, a TTX-producing bacterium isolated from the starfish *Astropecten polyacanthus* // Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Nippon Suisan Gakkaishi). 1987. Vol. 53, P. 617–621.
111. Ngy L., Yu Chun-Fai., Takatani T., Arakawa O. Toxicity assessment for the horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda* collected from Cambodia // Toxicon. 2007. Vol. 49, № 6. P. 843–847.

112. Noguchi T., Arakawa O., Takatani T. TTX accumulation in pufferfish // *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2006. Vol. 1, № 1. P. 145–152.
113. Noguchi T., Arakawa O. Tetrodotoxin—Distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication // *Marine Drugs*. 2008. Vol. 6. P. 220–242.
114. Norenburg J.L. Structure of the nemertine integument with consideration of its ecological and phylogenetic significance // *American Zoology*. 1985. Vol. 25. P. 37–51.
115. Nuñez-Vázquez E.J., Yotsu-Yamashita M., Sierra-Beltran A.P., Yasumoto T., Ochoa J.L. Toxicities and distribution of tetrodotoxin in the tissues of puffer fish found in the coast of the Baja California Peninsula, Mexico // *Toxicon*. 2000. Vol. 38. P. 729–734.
116. Oaks J.A. Ultrastructure of *Lineus ruber* (rhyncocoela) epidermis // *Tissue Cell*. 1978. Vol. 10. P. 227–242.
117. Okabe T., Oyama H., Kashitani M., Ishimaru Y., Suo R., Sugita H., Itoi S. Toxic flatworm egg plates serve as a possible source of tetrodotoxin for pufferfish // *Toxins*. 2019. Vol 11. P. 20–23.
118. Okita K., Takatani T., Nakayasu J., Yamazaki H., Sakiyama K., Ikeda K., Arakawa O., Sakakura Y. Comparison of the localization of tetrodotoxin between wild pufferfish *Takifugu rubripes* juveniles and hatchery-reared juveniles with tetrodotoxin administration // *Toxicon*. 2013. Vol. 71. P. 128–133.
119. Page L.R., Parries S.C. Comparative study of the apical ganglion in planktotrophic caenogastropod larvae: Ultrastructure and immunoreactivity to serotonin // *Journal of Comparative Neurology*. 2000. Vol. 418, № 4. P. 383–401.
120. Pereverzeva A.O., Chernyshev A.V., Magarlamov T.Y. Microscopic anatomy of the integument in the ribbon worm *Micrura bella* (Stimpson, 1857) (Pilidiophora, Nemertea) // *Journal of Morphology*. 2022. Vol. 284, № 1. Article No. e21529. DOI: 10.1002/jmor.21529.

121. Puilingi C.G., Kudo Y., Cho Y., Konoki K., Yotsu-Yamashita M. Tetrodotoxin and its analogues in the pufferfish *Arothron hispidus* and *A. nigropunctatus* from the Solomon Islands: A comparison of their toxin profiles with the same species from Okinawa, Japan // *Toxins*. 2015. Vol. 7, № 9. P. 3436–3454.
122. Reverter M., Tapissier-Bontemps N., Lecchini D., Banaigs B., Sasal P. Biological and ecological roles of external fish mucus: A review // *Fishes*. 2018. Vol. 3, Article No. 41. DOI:10.3390/fishes3040041.
123. Ruppert E.E. A review of metamorphosis of turbellarian larvae. In: Chia FS (ed) *Settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae*. New York and Oxford: Elsevier, New York, 1978. P. 65–82.
124. Sagorny, C., Wesseler C., Krämer D., von Döhren J. Assessing the diversity and distribution of *Cephalothrix* species (Nemertea: Palaeonemertea) in European waters by comparing different species delimitation methods // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2019, Vol. 57, P. 497–519
125. Saito T. Noguchi T., Harada T., Murata O., Hashimoto K. Tetrodotoxin as a biological defense agent for puffers // *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Nippon Suisan Gakkaishi)*. 1985. Vol. 51, № 7. P. 1175–1180.
126. Saito T., Kohama T., Ui K., Watabe S. Distribution of tetrodotoxin in the xanthid crab (*Atergatis floridus*) collected in the coastal waters of Kanagawa and Wakayama Prefectures // *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2006. Vol. 1, № 1. P. 158–162.
127. Salvitti L., Wood S.A., Winsor L., Cary S.C. Intracellular immunohistochemical detection of tetrodotoxin in *Pleurobranchaea maculata* (Gastropoda) and *Stylochoplana* sp. (Turbellaria) // *Marine Drugs*. 2015. Vol. 13, № 2. P. 756–769.
128. Sasaki K., Takayama Y., Tahara T., Anraku K., Ito Y., Akaike N. Quantitative analysis of toxin extracts from various tissues of wild and cultured puffer fish by an electrophysiological method // *Toxicon*. 2008. Vol. 51, № 4. P. 606–614.

129. Sato S., Komaru K., Ogata K., Kodama M. Occurrence of tetrodotoxin in cultured puffer. // Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Nippon Suisan Gakkaishi). 1990. Vol. 56, № 7. P. 1129–1131.
130. Sato S., Kawaura R., Togashi K., Mizusawa N., Yasumoto K., Takada K., Amano M., Watabe S. De novo accumulation of tetrodotoxin and its analogs in pufferfish and newt and dosage-driven accumulation of toxins in newt: Tissue distribution and anatomical localization // Journal of Marine Science and Engineering. 2021. Vol. 9, № 9. Article No. 1004. DOI:10.3390/jmse9091004.
131. Schwartz, M.L., Norenburg, J.L. Three new species of *Micrura* (Nemertea: Heteronemertea) and a new type of heteronemertean larva from the Caribbean Sea // Caribbean Journal of Science. 2005. Vol. 41. P. 528–543.
132. Sheumack D.D., Howden M. E. H. Maculotoxin: A Neurotoxin from the venom glands of the octopus *Hapalochlaena maculosa* identified as tetrodotoxin // Science. 1978. Vol. 199, № 4325. P. 188–189.
133. Silva M., Rodríguez I., Barreiro A., Kaufmann M., Neto A.I., Hassouani M., Sabour B., Alfonso A., Botana L. M., Vasconcelos V. Tetrodotoxins occurrence in non-traditional vectors of the North Atlantic waters (Portuguese Maritime Territory, and Morocco Coast) // Toxins. 2019. Vol. 11. Article No. 306. DOI:10.3390/toxins11060306.
134. Sinigaglia C., Busengdal H., Lerner A., Oliveri P., Rentzsch F. Molecular characterization of the apical organ of the anthozoan *Nematostella vectensis* // Developmental Biology. 2015. Vol. 398, № 1. P. 120–133.
135. Smith J.E. The early development of the nemertean *Cephalothrix rufifrons* // Journal of Microscopy Science. 1935. Vol. 77. P. 335–381.
136. Norenburg J., Alfaya J. E., Fernández-Álvarez F. Á., Andersson H. S., Andrade S. C. S., Bartolomaeus T., Beckers P., Bigatti G., Cherneva I., Chernyshev A., Chung B. M., von Döhren J., Giribet G., Gonzalez-Cueto J., Herrera-Bachiller A., Hiebert T., Hookabe N., Junoy J., Kajihara H., Krämer D., Kvist S., Magarlamov T. Yu., Maslakova S.,

- Mendes C. B., Okazaki R., Sagorny C., Schwartz M., Sun Shi-Chun, Sundberg P., Turbeville J. M., Xu Cong-Mei. Nemertean taxonomy—Implementing changes in the higher ranks, dismissing Anopla and Enopla // *Zool. Scr.* 2019. Vol. 48, № 1. P. 118–119.
137. Stricker S.A., Reed C.G. Larval morphology of the Nemertean *Carcinonemertes epialti* (Nemertea: Hoplonemertea) // *Journal of Morphology* 1981. Vol. 169, № 1. P. 61–70.
138. Stricker, S.A.; Cloney, R.A. The ultrastructure of venom-producing cells in *Paranemertes peregrina* (Nemertea, Hoplonemertea) // *Journal of Morphology*. 1983. Vol. 177. P. 89–107.
139. Suehiro M. Historical review on chemical and medical studies of globefish toxin before World War II // *Yakushigaku Zasshi*. 1994. Vol. 29, № 3. P. 428–434.
140. Sugita, H., Ueda R., Berger L. R., Deguchi Y. Microflora in the gut of Japanese coastal crustacea // *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Nippon Suisan Gakkaishi)*. 1987. Vol.53. P. 1647–1655.
141. Suo R. Kashitani M., Oyama H., Adachi M., Nakahigashi R., Sakakibara R., Nishikawa T., Sugita H., Itoi S. First detection of tetrodotoxins in the cotylean flatworm *Prosthiostomum trilineatum* // *Marine Drugs*. 2021. Vol. 19, № 1. Article No. 40. DOI:10.3390/md19010040.
142. Takahashi D., Inoko Y. Untersuchungen über das Fugugift, *Centralbl // Med. Wiss.* 1889. Vol. 27. P. 529–530.
143. Taniyama S., Takatani T., Sorimachi T., Sagara T., Kubo H., Oshiro N., Ono K., Xiao N., Tachibana K., Arakawa O. Toxicity and toxin profile of scavenging and carnivorous gastropods from the Coastal Waters of Okinawa Prefecture, Japan // *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*. 2013. Vol. 54, № 1. P. 49–55.

144. Tanu M.B., Noguchi T. Tetrodotoxin as a toxic principle in the horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda* collected from Bangladesh // Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi). 1999. Vol. 40. P. 426–430.
145. Tanu M.B., Mahmud Y., Takatani T., Kawatsu K., Hamano Y., Arakawa O., Noguchi T. Localization of tetrodotoxin in the skin of a brackishwater puffer *Tetraodon steindachneri* on the basis of immunohistological study // Toxicon. 2002. Vol. 40, № 1. P. 103–106.
146. Tanu M.B., Mahmud Y., Arakawa O., Takatani T., Kajihara H., Kawatsu K., Hamano Y., Asakawa M., Miyazawa K., Noguchi T. Immunoenzymatic visualization of tetrodotoxin (TTX) in *Cephalothrix* species (Nemertea: Anopla: Palaeonemertea: Cephalotrichidae) and *Planocera reticulata* (Platyhelminthes: Turbellaria: Polycladida: Planoceridae) // Toxicon. 2004. Vol. 44, № 5. P. 515–520.
147. Tao J., Wei W.J., Nan L., Lei L.H., Hui H.C., Fen G.X., Jun L.Y., Jing Z., Rong J. Development of competitive indirect ELISA for the detection of tetrodotoxin and a survey of the distribution of tetrodotoxin in the tissues of wild puffer fish in the waters of south-east China // Food Additives and Contaminants. Part A. 2010. Vol. 27, № 11. P. 1589–1597.
148. Tatsuno R., Shikina M., Soyano K., Ikeda K., Takatani T., Arakawa O. Maturation-associated changes in the internal distribution of tetrodotoxin in the female goby *Yongeichthys criniger* // Toxicon. 2013. Vol. 63. P. 64–69.
149. Tatsuno R., Gao W., Ibi K., Mine T., Okita K., Nishihara G.N., Takatani T., Arakawa O. Profile differences in tetrodotoxin transfer to skin and liver in the pufferfish *Takifugu rubripes* // Toxicon. 2017. Vol. 130. P. 73–78.
150. Carroll S., McEvoy E. G., Gibson R. The production of tetrodotoxin-like substances by nemertean worms in conjunction with bacteria // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2003. Vol. 288, №1. P. 51–63.

151. Tsai U., Hwang D., Chai T., Jeng S. Occurrence of tetrodotoxin and paralytic shellfish poison in the Taiwanese crab *Lophozozymus pictor* // *Toxicon*. 1995. Vol. 33, № 12. P. 1669–1673.
152. Tsuda K., Kawamura M. The constituents of the ovaries of globefish. I. The isolation of meso-inositol and scillitol from the ovaries // *Journal of Pharmacological Society of Japan*. 1950. Vol. 70. P. 70–73.
153. Tsuruda K., Arakawa O., Kawatsu K., Hamano Y., Takatani T., Noguchi T. Secretory glands of tetrodotoxin in the skin of the Japanese newt *Cynops pyrrhogaster* // *Toxicon*. 2002. Vol. 40, № 2. P. 131–136.
154. Turbeville J.M. Ultrastructure of the pseudocnidae of the palaeonemertean *Cephalothrix* cf. *rufifrons* and *Carinomella lactea* and an assessment of their phylogenetic utility // *Journal of Natural History*. 2006. Vol. 40, № 15–16. P. 967–979.
155. Turbeville J.M. Nemertinea // *Microscopic anatomy of invertebrates*. Vol. 3: Platyhelminthes and Nemertinea. N.Y.: Wiley-Liss, 1991. P. 285–328.
156. Turner A.D., Boundy M.J., Rapkova M.D. Development and single-laboratory validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for quantitation of tetrodotoxin in mussels and oysters // *Journal of AOAC International*. 2017. Vol. 100, № 5. P. 1469–1482.
157. Turner A., Fenwick D., Powell A., Dhanji-Rapkova M., Ford C., Hatfield R. G., Santos A., Martinez-Urtaza J., Bean T. P., Baker-Austin C., Stebbing P. New invasive nemertean species (*Cephalothrix* cf. *simula*) in England with high levels of tetrodotoxin and a microbiome linked to toxin metabolism // *Marine Drugs*. 2018. Vol. 16, № 11. Article No. 452. DOI:10.3390/md16110452.
158. Twitty V.C., Elliott H.A. The relative growth of the amphibian eye, studied by means of transplantation // *Journal of Experimental Zoology*. 1934. Vol. 68, № 2. P. 247–291.

159. Vlasenko A.E., Velansky P.V., Chernyshev A. V., Kuznetsov V.G., Magarlamov T.Yu. Tetrodotoxin and its analogues profile in nemertean species from the Sea of Japan // *Toxicon*. 2018. Vol. 156. P. 48–51.
160. Vlasenko A.E., Magarlamov T.Yu. Tetrodotoxin and Its Analogues in *Cephalothrix cf. simula* (Nemertea: Palaeonemertea) from the Sea of Japan (Peter the Great Gulf): Intrabody Distribution and Secretions // *Toxins*. 2020. Vol. 12, № 12. Article No. 745. DOI:10.3390/toxins12120745.
161. Vlasenko A.E. Kuznetsov V.G., Malykin G.V., Pereverzeva A.O. Velansky P.V., Yakovlev K.V., Magarlamov T.Yu. Tetrodotoxins secretion and voltage-gated sodium channel adaptation in the ribbon worm *Kulikovia alborostrata* (Takakura, 1898) (Nemertea) // *Toxins*. 2021. Vol. 13, № 9. Article No. 606. DOI:10.3390/toxins1309060.
162. Von Döhren J. First record on the development of the larva of the basally branching nemertean species *Carinina ochracea* (Palaeonemertea) // *Helgoland Marine Research*. 2016. Vol. 70. Article No. 13. DOI 10.1186/s10152-016-0466-7.
163. Von Reumont B.M. Lüddecke T., Timm T., Lochnit G., Vilcinskis A., von Döhren J., Nilsson M.A. Proteo-transcriptomic analysis identifies potential novel toxins secreted by the predatory, prey-piercing ribbon worm *Amphiporus lactifloreus* // *Marine Drugs*. 2020. Vol. 18, № 8. Article No. 407. DOI:10.3390/md18080407.
164. Whitelaw B.L., Cooke I. R., Finn J., Zenger K., Strugnell J.M. The evolution and origin of tetrodotoxin acquisition in the blue-ringed octopus (genus *Hapalochlaena*) // *Aquatic Toxicology*. 2019. Vol. 206. P. 114–122.
165. Williams B.L. Behavioral and chemical ecology of marine organisms with respect to tetrodotoxin // *Marine Drugs*. 2010. Vol. 8, № 3. P. 381–398.
166. Williams B.L., Lovenburg V., Huffard C.L., Caldwell R.L. Chemical defense in pelagic octopus paralarvae: Tetrodotoxin alone does not protect individual paralarvae of the greater blue-ringed octopus (*Hapalochlaena lunulata*) from common reef predators // *Chemoecology*. 2011. Vol. 21, № 3. P. 131–141.

167. Wood S.A., Casas M., Taylor D.I., McNabb P., Salvitti L., Ogilvie S. S., Cary C. Depuration of tetrodotoxin and changes in bacterial communities in *Pleurobranchea maculata* adults and egg masses maintained in captivity // *Journal of Chemical Ecology*. 2012. Vol. 38, № 11. P. 1342–1350.
168. Yamada R., Tsunashima T., Takei M., Sato T., Wajima Y., Kawase M., Oshikiri S., Kajitani Y., Kosoba K., Ueda H., Abe K., Itoi S., Sugita H. seasonal changes in the tetrodotoxin content of the flatworm *Planocera multitentaculata* // *Marine Drugs*. 2017. Vol. 15, № 3. Article No. 56. DOI:10.3390/md15030056.
169. Yasumoto T., Hagai H., Yasumura D., Michishita T., Endo A., Yotsu M., Kotaki Y. Interspecies distribution and possible origin of tetrodotoxin // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1986. Vol. 479, № 1. P. 44–51.
170. Yotsu M., Iorizzi M., Yasumoto T. Distribution of tetrodotoxin, 6-epitetrodotoxin, and 11-deoxytetrodotoxin in newts // *Toxicon*. 1990. Vol. 28, №2. P. 238–241.
171. Yotsu-Yamashita M., Sugimoto A., Terakawa T., Shoji Y., Miyazawa T., Yasumoto T. Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel soluble saxitoxin and tetrodotoxin binding protein from plasma of the puffer fish, *Fugu pardalis* // *European Journal of Biochemistry*. 2001. Vol. 268. P. 5937–5946.
172. Yotsu-Yamashita M., Mebs D., Flachsenberger W. Distribution of tetrodotoxin in the body of the blue-ringed octopus (*Hapalochlaena maculosa*) // *Toxicon*. 2007. Vol. 49, № 3. P. 410–412.
173. Yotsu-Yamashita M., Toennes S.W., Mebs D. Tetrodotoxin in Asian newts (Salamandridae) // *Toxicon*. 2017. Vol. 134. P. 14–17.
174. Yu V. C. H. Hoi-Fu Yu P., Ho K.C., Wang-Fat Lee F. Isolation and identification of a new tetrodotoxin-producing bacterial species, *Raoultella terrigena*, from Hong Kong marine puffer fish *Takifugu niphobles* // *Marine Drugs*. 2011. Vol. 9, № 11. P. 2384–2396.

175. Zheng R., Guan Q., Zheng M., Huang Z., Huang H., Fu W., Lin S., Yang Y. Toxin and toxicity identification of mangrove horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda* collected from South China // *Toxicon*. 2019. Vol. 161. P. 23–27.

ПРИЛОЖЕНИЕ I

Таблица 1 – Содержание тетродотоксина (ТТХ) в выборке яйцеклеток и личинок *Cephalothrix cf. simula* на различных стадиях развития (нг/образец*).

| Срок развития | Содержание ТТХ (нг) | | | | | Среднее значение | Стандартное отклонение |
|---------------|---------------------|--------|---------|--------|---------|------------------|------------------------|
| | яйцеклетки | | | | | | |
| яйцеклетки | 11,9512 | 8,9027 | 8,9172 | | | 9,9237 | 1,7559 |
| 36 ч | 6,8415 | 7,3619 | 7,9535 | 6,6321 | 7,8998 | 7,3378 | 0,5999 |
| 48 ч | 6,0294 | 6,8150 | 7,9227 | 6,0054 | 10,1400 | 7,3825 | 1,7281 |
| 4 сут | 12,5299 | 6,4305 | 6,0235 | 7,0817 | 4,4007 | 7,2932 | 3,0899 |
| 6 сут | 7,2640 | 6,5151 | 10,1984 | 7,1246 | 7,7687 | 7,7742 | 1,4269 |
| 8 сут | 9,7953 | 9,7914 | 6,9002 | 8,6988 | 3,9553 | 7,8282 | 2,4669 |
| 10 сут | 7,4181 | 9,4227 | 6,0093 | 7,7228 | 7,1213 | 7,5388 | 1,2361 |
| 12 сут | 8,1602 | 9,3601 | 9,4080 | 9,3605 | 6,4910 | 8,5560 | 1,2689 |
| 15 сут | 6,8952 | 9,6760 | 6,6913 | 7,6145 | 8,0657 | 7,7885 | 1,1907 |
| 21 сут | 8,2291 | 7,4076 | 6,0721 | 5,9539 | 7,2062 | 6,9738 | 0,9580 |
| 41 сут | 6,6375 | 6,8552 | 5,9501 | 5,9032 | 5,8358 | 6,2364 | 0,4736 |

* образец представляет собой экстракт 1 яйцеклетки/личинки