

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

На правах рукописи

ВЛАСЕНКО АННА ЕВГЕНЬЕВНА

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ТЕТРОДОТОКСИН-
СОДЕРЖАЩИХ СТРУКТУР У НИЗКОТОКСИЧНОЙ
ГЕТЕРОНЕМЕРТИНЫ *KULIKOVIA ALBOROSTRATA***

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Магарламов Тимур Юсифович

ВЛАДИВОСТОК – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1 ТТХ и его производные	17
1.1.1 Свойства.....	17
1.1.2 Источник и круговорот в природе	18
1.1.3 Функции.....	22
1.2 ТТХ и его производные у разных типов животных	24
1.2.1. Диапазоны содержания	24
1.2.2 Токсин-содержащие структуры	28
1.3 ТТХ и его производные у немертин.....	31
1.3.1. Диапазоны содержания	31
1.3.2 Токсин-содержащие структуры	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	39
2.1 Сбор материала	39
2.2 Отбор слизи	39

2.3 Приготовление экстрактов для выявления токсинов ряда ТТХ методом ВЭЖХ-МС/МС	40
2.4 Высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).....	40
2.5 Изучение локализации ТТХ и его производных в теле <i>K. alborostrata</i> ..	44
2.6 Световая микроскопия.....	44
2.7 Флуоресцентная микроскопия.....	45
2.8 Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)	47
2.9 Электронная иммуногистохимия	48
2.10 Эксперимент по изучению изменения содержания ТТХ и его производных в теле и слизи <i>K. alborostrata</i> в течение 7 мес	49
2.11 Эксперимент по исследованию локализации ТТХ и его производных методом иммуногистохимии до и после секреции.....	50
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	51
3.1 Внутривидовая вариация концентраций ТТХ и его производных у особей <i>K. alborostrata</i>	51
3.2 Распределение ТТХ и его производных в теле <i>K. alborostrata</i>	52
3.3 ТТХ-содержащие структуры <i>K. alborostrata</i> и их морфологические особенности	56

3.4 Эксперимент по изучению изменения содержания ТТХ и его производных методом ВЭЖХ–МС/МС в теле и слизи <i>K. alborostrata</i> в условиях длительного содержания без доступа пищи.....	69
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	73
4.1 Содержание ТТХ и его производных у особей <i>K. alborostrata</i>	73
4.2 Поступление ТТХ и его производных в тело <i>K. alborostrata</i>	73
4.3 Распределение ТТХ и его производных в клетках и тканях <i>K. alborostrata</i>	79
4.4 Функционирование структур, содержащих ТТХ и его производные у <i>K. alborostrata</i>	82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	87
ВЫВОДЫ	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	90

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией
- КБ – какодилатный буфер
- КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия
- МЕ – мышинные единицы
- ТТХ – тетродотоксин
- ФСБ – фосфатно-солевой буфер
- ФСБ-Т – ФСБ с Tween-20
- ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс
- eV – энергия столкновения
- IgG – иммуноглобулины G
- LD₅₀ – полуметальная доза
- LoD – предел детекции
- LoQ – предел количественного определения
- MRM – мониторинг множественных реакций
- NaV канал – потенциал-зависимый натриевый канал
- PSTBP – Сакситоксин- и тетродотоксин-связывающий белок рыбы фугу (Pufferfish Saxitoxin and Tetrodotoxin Binding Protein)
- PSTs – паралитические токсины моллюсков (paralytic shellfish toxins)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Тетродотоксин (ТТХ) – нейротоксин бактериального происхождения, обнаруженный во множестве таксономически далеких друг от друга организмах, таких, как рыбы, крабы, лягушки, тритоны, осьминоги и иглокожие (Vane et al., 2014). В ТТХ-содержащих организмах часто обнаруживают производные ТТХ, тоже являющиеся нейротоксинами. Токсины ряда ТТХ не могут синтезироваться в организме многоклеточных, и, согласно общепринятому предположению, поступают в организм животных от симбиотических бактерий-продуцентов или по трофическим путям (Noguchi et al., 2006a). ТТХ был впервые выделен из рыб фугу и охарактеризован в 1909 году (Lago et al., 2015), и с тех пор и по настоящее время разносторонние исследования ТТХ-содержащих животных, как морских, так и наземных, не прерываются. Примерами множества направлений исследований ТТХ, наиболее часто освящающихся в литературе, являются поиск продуцентов ТТХ и его производных (Magarlamov et al., 2017; Vaelli et al., 2020; Yuan et al., 2021), установление путей их миграции в экосистемах (Itoi et al., 2015, 2018, 2020; Okabe et al., 2021; Ito et al., 2022) и выявление физиологической роли токсинов (Hwang et al., 2004; Okita et al., 2013; Sakakura, Takatani, 2017; Johnson et al., 2018; Noguchi et al., 2022; Miyazaki et al., 2024).

Одной из самых интригующих задач для исследователей всего мира, для которой по сей день не удалось найти решение, является выявление причин накопления ТТХ и его производных в организме животных, а также установление физиологической роли токсинов. Важным шагом на пути к решению этой задачи

является накопление знаний об органах, тканях и клетках, задействованных в аккумуляции, переносе и экскреции токсинов ряда ТТХ.

Для некоторых животных на основании данных о локализации ТТХ и его производных была предположена роль токсинов в охоте и защите от хищников. Большая часть работ, посвящённых этой теме, сосредоточена на исследовании высокотоксичных животных, употребление которых в пищу людьми становилось причиной отравлений – рыбах, крабах и моллюсках. По этой причине многочисленные ТТХ-содержащие животные, в особенности – низкотоксичные, остаются без внимания, и их исследования ограничиваются подтверждением содержания токсинов, игнорируя изучение строения и функционирования токсин-содержащих структур.

К малоизученным ТТХ-содержащим животным относятся также немертинны (*Nemertea*), выбранные для настоящего исследования в качестве объекта для изучения накопления и экскреции токсинов ряда ТТХ. Немертинны – тип преимущественно хищных морских червей, включающий более 1300 видов, которые подразделяются на три основных класса – пилидиофора, палео- и гоппонемертинны (Kajihara et al., 2008). О наличии ТТХ и его производных у немертин сообщали различные научные группы (Miyazawa et al., 1988; Ali et al., 1990; Asakawa et al., 2000; Kwon et al., 2017). Существует всего несколько работ, рассматривающих локализацию ТТХ в теле немертин (Tanu et al., 2004; Campbell, Schwartz, 2008; Magarlamov et al., 2016; Malykin et al., 2021), и ни одной работы, исследующих функционирование структур, направленное на удержание, перенос и экскрецию токсинов. Большая часть ТТХ-содержащих видов немертин обладает следовыми концентрациями токсинов, и пути их накопления, как и

физиологическая роль токсинов этого ряда в жизнедеятельности немертин, не являются очевидными и могут быть выявлены только путем изучения организации токсин-содержащих клеток, их распределения и функционирования в теле немертин.

Степень разработанности темы. Исследованию организации структур, обеспечивающих аккумуляцию, миграцию и использование токсинов ТТХ-содержащими животными посвящено небольшое количество работ, подавляющая часть которых выполнена на позвоночных животных – рыбах и саламандрах.

Первые эксперименты, демонстрирующие участие ТТХ в поведенческих стратегиях животных, были проведены на саламандрах в 1983 году – было показано, что токсин выделяется во внешнюю среду покровами кожи в ответ на раздражение. Авторы исследования предположили, что экскреция токсинов является ответом на стресс и играет защитную функцию (Shimizu, Kobayashi, 1983). К такому же выводу пришли авторы исследований на рыбах фугу, обнаружившие ТТХ в выделяемом кожными покровами рыб секрете (Kodama et al., 1985; Saito et al., 1985).

Последующий поиск ТТХ-экскретирующих структур саламандр *Synops pyrrohogaster* (Tsuruda et al., 2002) и *Notophthalmus viridescens* (Mebs et al., 2010) с помощью иммуногистохимии выявил ТТХ-позитивную метку в двух типах железистых клеток покровного эпителия. Считается, что у амфибий эти токсин-содержащие железы выполняют защитную функцию, выделяя ядовитый секрет (Quay, 1972; Delfino et al., 1998), предотвращающий рост бактерий и отпугивающий хищников. Исследование восстановления ТТХ после секреции у саламандр *Taricha granulosa* показало, что кожные покровы секретируют до 90%

от всего содержащегося в теле ТТХ, после чего содержание токсина в структурах покровов восстанавливается в течение 9 мес за счет миграции ТТХ из тела (Cardall et al., 2004). В настоящее время источник токсинов ряда ТТХ для саламандр не установлен, однако ТТХ-положительная реакция наблюдалась в эпителии кишечника, что позволяет предположить поступление токсина вместе с пищей несмотря на то, что потенциальные ТТХ-содержащие объекты питания для тритонов не были обнаружены (Mebs et al., 2010).

Иммуногистохимическое изучение структур рыб фугу, задействованных в экскреции ТТХ в ответ на внешние раздражители, показало, что токсин, как правило, локализуется в железистых клетках (Tanu et al., 2002; Mahmud et al., 2003a; Mahmud et al., 2003b; Ikeda et al., 2009; Sato et al., 2021). В результате эксперимента по выявлению миграции ТТХ в теле рыбы фугу было выявлено, что первоначально токсин концентрировался в печени, а затем со временем переносился в кожу (Matsumoto et al., 2015; Zhang et al., 2020).

Функционированию ТТХ-содержащих структур и миграции токсинов в организмах беспозвоночных посвящено меньшее количество работ по сравнению с позвоночными. Тем не менее, экскреция ТТХ в ответ на внешнее раздражение была показана для гастропод *Natica lineata* (Hwang et al., 1990) и *Niotha clathrate* (Hwang et al., 1992). Эксперимент по кормлению нетоксичных гастропод *Pleurobranchaea maculata* пищей, содержащей ТТХ, показал накопление наиболее высоких количеств токсина в мантии (Khor et al., 2014), а последующее иммуногистохимическое исследование этого вида выявило локализацию ТТХ в нейтральных муциновых клетках и базальной мембране эпителия мантии (Salvitti et al., 2015), на основании чего была предположена защитная функция токсина.

На сегодняшний день существует несколько работ, затрагивающих вопросы функционирования ТТХ в теле немертин. Так, была продемонстрирована экскреция токсина экстремально токсичной палеонемертиной *Cephalothrix simula* (= *Cephalothrix linearis*) в ответ на раздражение (Ali et al., 1990; Vlasenko, Magarlamov, 2020). В 2021 году была проведена обширная работа по изучению ТТХ-содержащих структур *C. simula*: с помощью антител против ТТХ была продемонстрирована локализация ТТХ в серозных клетках и гранулярных клетках III типа покровного эпидермиса, а также в мукоидных клетках головных желез (Malykin et al., 2021). Хотя авторы и не изучали сам процесс экскреции токсина, было предположено, что обнаруженные ТТХ-позитивные гранулярные клетки III типа и мукоидные клетки экскретируют токсины ряда ТТХ в слизь, окружающую немертину, постоянно в небольших количествах, а серозные клетки мгновенно выбрасывают токсин в условиях стресса в качестве ответа на раздражитель (Norenburg, 1985; Malykin et al., 2021). Стоит отметить, что предположение не было подтверждено исследованием локализации ТТХ в процессе экскреции. Не была показана и способность ТТХ-позитивных структур к восстановлению содержания токсинов после их экскреции. В 2016 году было изучено распределение ТТХ в интегументе низкотоксичных немертин *Kulikovia alborostrata* (= *Lineus alborostratus*), принадлежащих к гетеронемертинам (класс Pilidiorphora), в ходе которого ТТХ был выявлен в субэпидермальных бациллярных железистых клетках первого типа кутиса – соединительно-тканного слоя, характерных для гетеронемертин, а также, в псевдокнид-содержащих и мукоидных клетках секреторного эпителия хобота (Magarlamov et al., 2016). Морфологические различия в строении покровов палео- и гетеронемертин, различия в концентрациях токсинов между представителями классов на 4–7

порядков, а также отличная локализация токсинов ряда ТТХ у представителей этих классов привели к идее о необходимости проведения обширного и детального исследования структур *K. alborostrata*, задействованных в хранении токсинов, а также проведении исследований, устанавливающих локализацию токсинов в процессе функционирования секреторных структур.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является установление особенностей накопления и экскреции ТТХ и его производных в структурах *K. alborostrata* и исследование организации этих структур.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Исследовать распределение ТТХ и его производных в органах, тканях и клетках *K. alborostrata*.
2. Описать клеточный состав тканей *K. alborostrata*, содержащих ТТХ-позитивные структуры; установить организацию ТТХ-позитивных структур.
3. Определить пути поступления ТТХ и его производных в ткани *K. alborostrata*, выявить структуры, обеспечивающие аккумуляцию токсинов.
4. Изучить функционирование ТТХ-содержащих клеток покровного эпителия у *K. alborostrata* в процессе экскреции.

Научная новизна. Данная работа представляет собой первое комплексное изучение состава, организации и функционирования ТТХ-содержащих структур у немертин *K. alborostrata*. Произведена оценка индивидуальной variability содержания токсинов ряда ТТХ у особей *K. alborostrata* из одной популяции. Проведено измерение концентрации токсинов ряда ТТХ в секрете *K. alborostrata*,

вырабатываемом в ответ на раздражение и после длительного содержания немертин в условиях голодания. Изучена локализация ТТХ, морфология и организация ТТХ-позитивных структур на протяжении всего тела немертины, что позволило сделать вывод о механизме накопления и экскреции ТТХ и его производных железистыми клетками. Впервые показано содержание токсинов ряда ТТХ в железистых клетках кишечника немертин. Сопоставление всех результатов, полученных в ходе выполнения данной работы, включая данные содержания токсинов ряда ТТХ в разных отделах и органах, а также описание структур, ответственных за его хранение, позволило предположить схему вероятного поступления, переноса и экскреции ТТХ и его производных у немертин.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные в ходе работы результаты являются первыми данными о путях миграции ТТХ и его производных в теле немертин от поступления до выделения во внешнюю среду. Новые данные о неизвестных ранее ТТХ-аккумулирующих структурах могут послужить отправной точкой для изучения новых функций токсинов в жизнедеятельности организмов. Установление организации токсин-содержащих органов, тканей и клеток, а также физиологической роли токсинов у немертин является необходимым для расширения знаний о причинах накопления ТТХ и его производных в организме животных, в частности – низкотоксичных. Исследование немертин как одного из компонентов ТТХ-содержащего сообщества животных вносит вклад в выявление общих закономерностей содержания, передачи и накопления токсинов ряда ТТХ в биосистеме, компонентом которой являются немертины.

Методология и методы диссертационного исследования. В ходе проведения исследований ТТХ-содержащих структур у немертин *K. alborostrata* были применены традиционные и современные методы клеточной биологии и биохимии. Исследования морфологии и организации различных тканей немертин проводили с помощью световой микроскопии. Локализация ТТХ была изучена иммуногистохимическими методами с использованием электронной и флуоресцентной микроскопии. Определение концентраций ТТХ и его производных в экстрактах немертин проводили при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Выдвинута гипотеза о поступлении ТТХ и его производных и миграции токсинов в теле немертин: особи немертин, обитающие в одном ареале, получают ТТХ и его производные из единого пищевого источника. После поступления в энтероциты токсины мигрируют в стенку тела, откуда поступают в секреторный эпителий хобота и кожные покровы и выделяются во внешнюю среду с секретом.
2. Интегумент немертин покрыт слизью, содержащей небольшие количества токсинов ряда ТТХ, выделяемых токсин-содержащими железистыми клетками покровного эпителия. Воздействие внешнего раздражителя на покровный эпителий приводит к моментальному возрастанию содержания токсинов в слизи вследствие его выхода в больших количествах из тела клетки и миграции через узкую шейку в папиллу с последующим высвобождением.

Степень достоверности результатов. Достоверность полученных данных диссертационного исследования обеспечена применением современных средств и методик проведения экспериментальных исследований, в том числе цитологических и физико-химических методов исследования, повторами экспериментов и использованием методов обработки информации, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Большая часть полученных в ходе выполнения диссертационной работы результатов опубликована в рецензируемых научных изданиях.

Личный вклад автора. Автор осуществил сбор и первичную обработку образцов немертин для всех видов исследований, фиксацию материала для световой, электронной микроскопии и иммуногистохимии, исследования материала методами световой, флуоресцентной микроскопий, включая КЛСМ, приготовление экстрактов немертин для хроматографических исследований. Автором была проведена обработка данных, полученных в ходе перечисленных исследований. Автором были спланированы и осуществлены все физиологические эксперименты и проведена последующая интерпретация полученных данных. Все полученные в ходе экспериментов и исследований данные были проанализированы, интерпретированы и изложены в научных публикациях и представлены на конференциях при непосредственном участии автора.

Апробация результатов работы и публикации. Материалы диссертации были представлены на IX Международной конференции «Nemertean Biology», 13–17 августа 2018 г., г. Лист (о-в Зильт), Германия; на XVIII Международной научно-практической конференции «Advances in Science and Technoligy», 31

января 2019 г., г. Москва; на Международной конференции «Marine Biology in the 21st Century: Achievements and Development Outlook», 6–8 октября 2021 г., г. Владивосток.

По материалам диссертации опубликовано 6 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых международных журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science, и 3 тезисов научных конференций.

Объём и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы», «Результаты» и «Обсуждение», заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 115 страницах машинописного текста, содержит 19 рисунков и 7 таблиц.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю и наставнику, Магарламову Т.Ю., за неоценимый вклад в становлении автора как специалиста, всестороннюю поддержку и помощь, оказываемую на всех этапах выполнения диссертационной работы. Значимая помощь была оказана коллективом лаборатории фармакологии в написании совместных статей и проведении исследований: Кузнецовым В.Г., Малыкиным Г.В., Мельниковой Д.И. и Переверзевой А.О. Автор благодарен Чернышеву А.В. за ценные наставления и советы, Яковлеву К.В. за помощь в освоении методов, Веланскому П.В. за вклад в написание статей. Выражается благодарность коллективу ЦКП «Дальневосточный центр электронной микроскопии» ННЦМБ ДВО РАН, в частности, Фомину Д.В. и Шеферу К.А. за помощь при работе с микроскопическим оборудованием, коллективу ЦКП «Приморский океанариум», ННЦМБ ДВО РАН за содействие в организации исследований на конфокальном

микроскопе, а также сотрудникам Морской биологической станции «Восток» ННЦМБ ДВО РАН за помощь в организации работ.

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 15-15-20026, № 22-24-00464), РФФИ (грант № 18-04-00808 А); Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (гранты № 075-15-2020-796 и № 13.1902.21.0012).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 ТТХ и его производные

1.1.1 Свойства

ТТХ – низкомолекулярный гуанидиновый нейротоксин, впервые обнаруженный в яичниках рыб семейства Tetraodontidae (рыб фугу) в 1909 г (Tahara, 1910). Молекула ТТХ имеет брутто-формулу $C_{11}H_{17}N_3O_8$ с молекулярной массой 319,27 Да и представляет собой диоксоадамантановый скелет с шестью гидроксильными группами и циклической гуанидиновой группой (рис. 1). Механизм действия ТТХ заключается в его взаимодействии с наружной частью поры потенциал-зависимого натриевого (NaV) канала в нервных и мышечных клетках, что препятствует току ионов Na^+ внутрь клетки, необходимому для деполяризации мембраны на стадии инициации потенциала действия (Lee et al., 2008).

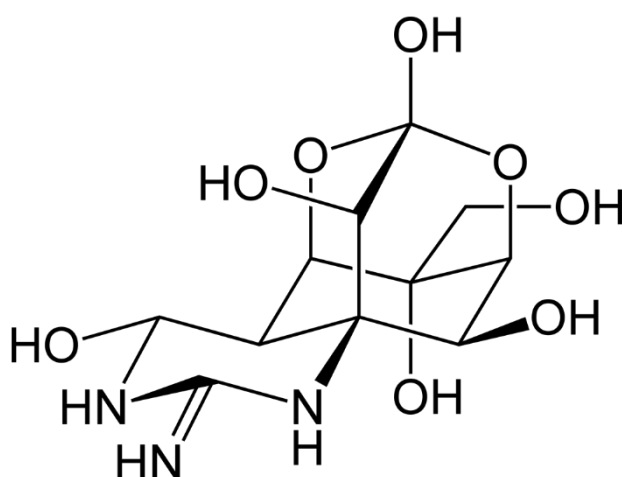


Рисунок 1 – Пространственная структура молекулы ТТХ.

ТТХ является одним из самых сильных нейротоксинов, известных на сегодняшний день, его полулетальная доза (LD_{50}) при пероральном введении равна 232 мкг/кг массы тела (Abal et al., 2017), при внутрибрюшинном и подкожном введении – 10,7 и 12,5 мкг/кг массы тела соответственно (Lago et al., 2015). Согласно Фукуда и Тани, существует четыре степени отравления ТТХ (Fukuda, Tani, 1941):

1 степень: периоральное онемение и парестезия (ощущение покалывания, щекотания или жжения кожи);

2 степень: онемение лица и языка, двигательный паралич и нарушение координации, невнятная речь при нормальных рефлексах;

3 степень: периферический паралич, дыхательная недостаточность, афония (потеря голоса из-за нарушения работы возвратного гортанного нерва) и расширенные зрачки;

4 степень: острая дыхательная недостаточность и гипоксия, гипотония, брадикардия, аритмия, возможна потеря сознания.

ТТХ является частой причиной отравлений морепродуктами в странах Индо-Тихоокеанского региона, вызывая 30–50 отравлений каждый год, из которых 6,6% заканчиваются летальным исходом (Noguchi et al., 2001).

1.1.2 Источник и круговорот в природе

Высокая частота отравлений ТТХ является следствием его широкого распространения среди различных групп животных. ТТХ был обнаружен почти у 140 таксономически далеких, в основном, морских животных из различных групп, а также встречается у некоторых пресноводных, наземных видов, красных

водорослей, динофлагеллятов и бактерий (Bane et al., 2014; Jal, Khora, 2015; Lago et al., 2015; Lorentz et al., 2016).

Хаотичное распределение ТТХ среди разнородных компонентов биосистемы может свидетельствовать о существовании единого источника токсина и его распространении среди компонентов вследствие миграции. Существует предположение, согласно которому хищные, всеядные животные и падальщики могут получать ТТХ по пищевым цепям или вследствие паразитизма и/или симбиоза. Этот механизм повторяется много раз, что приводит к накоплению ТТХ в высоких концентрациях у видов на верхних трофических уровнях. Так, рыба фугу, являясь высшим хищником, получает ТТХ, питаясь токсин-содержащими организмами, которые находятся ниже в пищевой цепи (Noguchi et al., 2006a) (рис. 2).

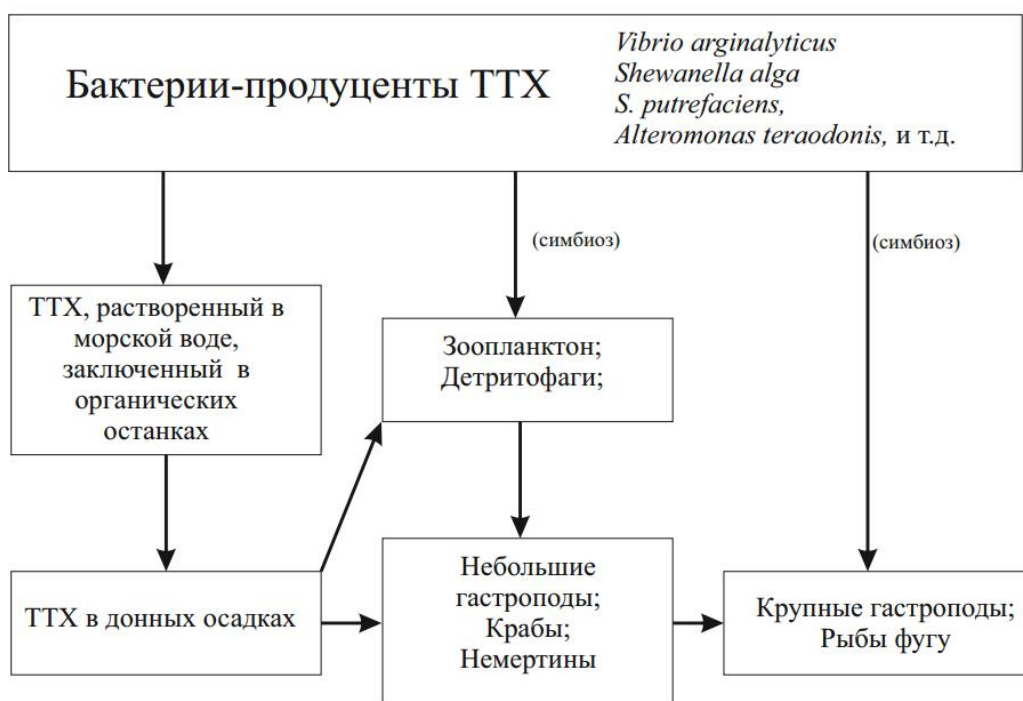


Рисунок 2 – Предположительная схема миграции ТТХ в биосистеме (Noguchi et al., 2006a).

Описанная схема может объяснить накопление ТТХ у некоторых животных в больших количествах и его территориальный и таксономический разброс в природе, однако из всех компонентов цепи экспериментально или натуралистически было доказано только существование ТТХ-продуцирующих бактерий и употребление в пищу рыбами фугу плоских червей (Ito et al., 2022) и немертин (Kajihara et al., 2013), а также вклад плоских червей в накопление ТТХ у морских двустворчатых моллюсков (Okabe et al., 2021). Осуществление же передачи ТТХ по остальным представленным путям является умозрительным заключением.

Согласно схеме, представленной выше, а также одной из общепризнанных теорий, одним из первоначальных источников ТТХ являются симбиотические бактерии-продуценты ТТХ, впервые обнаруженные в 1987 году в организме краба *Atergatis floridus* (Noguchi et al., 1986). После этого ТТХ-синтезирующие бактерии были выделены из множества источников: красных водорослей (Yasumoto et al., 1986), крабов (Sugita et al., 1987), синекольчатых осьминогов (Hwang et al., 1989), гастропод (Cheng et al., 1995), морских звезд (Narita et al., 1987), а также из морских (Do et al., 1990) и пресноводных (Do et al., 1993) донных осадков. Показано, что в кишечнике рыб фугу естественным образом обитают эндосимбиотические бактерии, потенциально являющиеся источниками ТТХ (Yu et al., 2004; Wu et al., 2005; Wang et al., 2010; Yang et al., 2010). К ТТХ-синтезирующим бактериям относятся виды из родов *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Photobacterium*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas* и *Vibrio* (Miyazawa, Noguchi, 2001; Magarlamov et al., 2017). Однако уровни ТТХ в бактериях и морских отложениях

низкие, что оставляет без объяснения высокие концентрации ТТХ, обнаруженные в животных.

В ТТХ-содержащих организмах часто выявляются его производные, составляя вместе с ТТХ ряд токсинов, состоящий из 27 соединений, два из которых являются «равновесными производными» ТТХ – 4-эпиТТХ и 4,9-ангидроТТХ (между ТТХ, 4-эпиТТХ и 4,9-ангидроТТХ возможны обратимые превращения) (Yotsu-Yamashita et al., 1999; Vane et al., 2014; Puilingi et al., 2015; Turner et al., 2017). До сих пор остается невыясненной причина присутствия «неравновесных производных» ТТХ (образование которых вследствие самопроизвольного превращения невозможно) в ТТХ-содержащих организмах. Согласно Йотсу-Ямашита с соавторами, производные ТТХ являются интермедиатами в реакциях метаболических путей. Так, 5-деоксиТТХ и 11-деоксиТТХ могут являться промежуточными соединениями в реакции окисления 5,6,11-тридеоксиТТХ до ТТХ, при этом сам ТТХ в ходе метаболических процессов может окисляться до 11-норТТХ-6(R)-ол (Yotsu-Yamashita et al., 2013). Однако переход между «неравновесными производными» в животных невозможен (Kono et al., 2008b), из чего следует, что, вероятно, реакции трансформации/биосинтеза токсинов ряда ТТХ протекают в микроорганизмах, продуцирующих токсины (Yotsu-Yamashita et al., 2013), а животные получают их по трофическим путям или в результате симбиоза. Следовательно, можно говорить о том, что схема миграции ТТХ в морских организмах, предложенная Ногучи (Noguchi et al., 2006a) (рис. 2), может быть справедлива в том числе и для производных ТТХ.

1.1.3 Функции

Существует несколько предположений относительно функций ТТХ и его производных в накапливающих их организмах: предполагают, что токсины выполняют защитную, коммуникативную функции и выступают в качестве орудия нападения. Несмотря на то, что натуралистических наблюдений использования токсинов ряда ТТХ животными собрано не много, данные о локализации ТТХ у животных стали основой для предположения биологического и физиологического значения токсина. На данный момент большинство исследований сосредоточено на тканевом и клеточном распределении ТТХ у животных, и лишь небольшой процент направлен на выявление функционирования ТТХ-содержащих структур.

В подавляющем количестве исследований возможное использование токсинов ряда ТТХ в качестве защиты от хищников было предположено на основании локализации токсинов в кожных покровах ТТХ-содержащих животных – рыб фугу (Kodama et al., 1985, 1986; Tanu et al., 2002; Mahmud et al., 2003a), гастропод (Hwang et al., 1990; Hwang et al., 1992), синекольчатых осьминогов (Noguchi, 1973; Noguchi et al., 2008; Williams et al., 2009). Немногочисленные физиологические эксперименты могут служить подтверждением этого предположения. Так, было обнаружено, что некоторые виды рыб рода *Takifugu* в ответ на стимуляцию электрическим током вырабатывают секрет, содержащий большие количества ТТХ, сопровождая это раздуванием тела, что является защитной реакцией в ответ на нападение (Kodama et al., 1985). ТТХ и его производные также нередко обнаруживаются в секрете, собираемом с поверхности некоторых животных, например, личинок (Itoi et al., 2014) и

взрослых особей некоторых видов рыб фугу (Nuñez-Vázquez, et al., 2000), плоских червей *Planocera multitentaculata* (Miyazawa et al., 1987). Несмотря на то, что классические исследования защитной функции токсинов ряда ТТХ для животных были сосредоточены на роли токсинов в отпугивании хищников, недавние исследования саламандр показывают, что токсины этого ряда могут также обеспечить защиту от паразитов и инфекционных заболеваний (Johnson et al., 2018).

Выявлено, что по меньшей мере несколько видов животных могут использовать токсины для обездвиживания жертвы в процессе охоты. Один из видов плоских червей использует ТТХ и его производные для иммобилизации добычи: локализация ТТХ и 11-норТТХ-6(S)-ол в тканях червя, близких к ротовой полости, а также уменьшение концентрации токсинов после заглатывания пищи указывает на то, что ТТХ был введен в жертву во время атаки (Ritson-Williams et al., 2006).

Существует предположение, что некоторые виды могут использовать ТТХ и его производные в качестве переносчика информации. Так, исследования роли ТТХ и 5,6,11-тридеоксиТТХ у рыб фугу *Takifugu niphobles* и *Takifugu alboplumbeus* показали, что токсины распознаются ими как феромоны (Matsumura, 1995; Noguchi et al., 2022). Другое исследование выявило, что рыбы фугу *Takifugu rubripes* отдавали предпочтение рациону, богатому ТТХ-содержащими объектами (Saito et al., 2000). Такое же поведение было отмечено у многих ТТХ-содержащих гастропод (*Polinices didyma*, *Natica lineata*, *N. vitellus*, *Zeuxis sufflatus*, *Niotha clathrata*, *Oliva miniacea*, *O. mustelina* и *O. hirasei*), которые выбирали

преимущественно ТТХ-содержащие объекты питания, в то время как нетоксичные виды их избегали (Hwang et al., 2004).

1.2 ТТХ и его производные у разных типов животных

ТТХ и его производные были обнаружены у множества животных, включая морских и наземных, таких как рыбы, осьминоги, брюхоногие моллюски, морские звезды, крабы, плоские черви, немертины а также лягушки и тритоны. Основными регионами обитания морских ТТХ-содержащих видов являются побережья стран Восточной и Южной Азии, в основном, Японии, Таиланда и Китая. Однако начиная с 2003 года исследования все чаще сообщают об обнаружении ТТХ-содержащих видов у восточного побережья Средиземного моря вследствие его инвазии через Суэцкий канал; это явление получило название «лессепсианской миграции» (Akyol et al., 2006; Bentur et al., 2008; Katikou et al., 2009; Gerssen et al., 2018). Географическое распространение большинства наземных животных, аккумулирующих ТТХ, ограничивается некоторыми регионами стран северной и южной Америки (Pires et al., 2002; Mebs et al., 2012), Японии (Tsuruda et al., 2002; Kudo et al., 2012) и ограниченными территориями Германии (Yotsu-Yamashita et al., 2007b).

1.2.1. Диапазоны содержания

Количество ТТХ и его производных сильно варьирует как между, так и внутри видов, и даже индивидуально у особей с течением времени и вследствие смены сезонов. Подавляющее количество исследований вариации концентраций токсинов было проведено на видах животных, употребляемых в пищу человеком и являющихся причиной отравлений. Стоит отметить, что часто в исследованиях

такого рода не приведены концентрации отдельных производных ТТХ, а указывается содержание исключительно ТТХ, или общая токсичность, выраженная в мышинных единицах (МЕ), одна МЕ — это наименьшее количество вещества, вызывающие гибель мыши массой 20 г через 30 мин после инъекции, равное 0,178 мкг для ТТХ (Chen, Chou, 1998), и представленная в эквиваленте массы ТТХ.

Рыбы фугу относятся к числу наиболее изученных ТТХ-содержащих животных, опережая других представителей токсин-содержащего сообщества как по количеству токсичных видов, так и по количеству работ, посвященных их изучению. К родам рыб фугу, представители которых, как сообщалось, способны накапливать ТТХ, относятся *Takifugu*, *Arothron*, *Tetraodon*, *Chelonodon*, *Fugu*, *Sphoeroides* и *Lagocephalus* (Bane et al., 2014; Park et al., 2021). Подавляющая часть исследований предоставляет данные о содержании ТТХ и его производных в отдельных, самых токсичных, органах рыб – гонадах, печени, коже, кишечнике, мышцах. При этом, печень и гонады обычно имеют самое высокое содержание ТТХ, за ними следуют кишечник и кожа (Rambla-Alegre et al., 2017).

Так, наиболее токсичные органы рыб фугу *Lagocephalus sceleratus*, гонады, содержали ТТХ в диапазоне 0,19–8248,51 мкг/г, печень – от концентрации ниже предела количественного определения (LoQ) до 1380,80 мкг/г (Rodríguez et al., 2012; Bane et al., 2016; Rambla-Alegre et al., 2017). Гонады *Fugu* (= *Takifugu*) *niphobles*, содержали от 0,3 до 84,0 ТТХ мкг/г, печень – от 1,3 до 9,9 мкг/г (Jang et al., 2010). Яичники *Lagocephalus lunaris* проявляли токсичность, эквивалентную 32,2 мкг ТТХ/г тела, токсичность печени этих же особей была эквивалентна 60,7 мкг ТТХ/г (Nagashima et al., 2011). Рыбы вида *Sphoeroides marmoratus* в гонадах

содержали 0,7–7,4 мкг ТТХ/г и от 765 нг ТТХ/г до 1,4 мкг ТТХ/г в печени (Pinto et al., 2019; Silva et al., 2019).

Еще одни известные обладатели ТТХ и его производных, синекольчатые осьминоги *Hapalochlaena lunulata*, проявляли тотальную токсичность, эквивалентную 23,5 мкг ТТХ/г тела особи (Asakawa et al., 2019), особи *Hapalochlaena fasciata* содержали от 106,7 до 127,0 мкг ТТХ/г (Wu et al., 2014). При этом, более позднее исследование продемонстрировало, что содержание токсина в теле особей этого вида может различаться на четыре порядка, что авторы связывают с возможным влиянием региональных, сезонных факторов и разной половой принадлежностью особей (Yamate et al., 2021). Содержание ТТХ у особей *Hapalochlaena maculosa* варьировало в пределах 3,6–15,5 мкг ТТХ на г тела (Yotsu-Yamashita et al., 2007a).

Высокие уровни ТТХ были обнаружены также у двустворчатых моллюсков, например, токсичность *Crassostrea gigas* была эквивалентна 253 нг ТТХ/г (Turner et al., 2017), токсичность *Mytilus galloprovincialis* варьировала от 86 до 413 нг ТТХ/г (Bordin et al., 2020), *Patinopecten yessoensis* – 8000 нг ТТХ/г (Kodama et al., 1993), *Paphies australis* – 800 нг ТТХ/г (McNabb et al., 2014). Среди гастропод, чрезвычайно высоким содержанием ТТХ выделялись следующие виды: *Nassarius glans*, содержащие до 2,1 мг/г (Yin et al., 2005), *Nassarius conoidalis* (*Niotha clathrata*) – до 0,2 мг/г (Hwang et al., 1992), *Pleurobranchaea maculata* – до 1,4 мг/г (Wood et al., 2012), *Charonia lampas* – до 1,3 мг/г (Rodriguez et al., 2008).

Несмотря на то что, местом обитания подавляющей части животных-накопителей токсинов ряда ТТХ является морская среда, большое количество

работ посвящено изучению токсинов ряда ТТХ у саламандр: токсины рода ТТХ обнаружены у представителей 10 родов семейства Salamandridae: *Ambystoma*, *Cynops*, *Ichthyosaura*, *Laotriton*, *Lissotriton*, *Notophthalmus*, *Pachytriton*, *Paramesotriton*, *Taricha*, *Triturus* (Wakely et al., 1966; Brodie et al., 1974; Yotsu et al., 1990; Yotsu-Yamashita et al., 2007b, 2017). Так же, как и у морских животных, у саламандр наблюдается вариация концентраций ТТХ и его производных в широком диапазоне значений как в рамках одного вида, так и между разными видами. К наиболее токсичным видам относится *T. granulosa*, содержание токсинов в коже у которого составляет от $7,0 \pm 4,0$ до $1752,0 \pm 110,0$ мкг/г кожи в зависимости от местообитания (Hanifin et al., 1999). Среди популяций саламандр другого вида, *N. viridescens*, также наблюдалась высокая индивидуальная изменчивость уровней токсина: концентрации ТТХ колебались от нуля до 69,0 мкг/г тела (Yotsu-Yamashita et al., 2012; Spicer et al., 2018). К высокотоксичным видам также относится *Cynops orientalis*, содержащий в среднем $36,3 \pm 21,5$ мкг ТТХ/г тела (Yotsu-Yamashita et al., 2017). У видов *Pachytriton labiatus*, *Laotriton laoensis*, а также, нескольких видов из рода *Paramesotriton*, содержание токсинов на 1-2 порядка меньше (Yotsu-Yamashita et al., 2017).

Помимо саламандр, к наземным позвоночным, способных к аккумуляции токсинов рода ТТХ также относятся некоторые представители бесхвостых земноводных (Anura). Так, было выявлено, что представители рода *Atelopus* обладают токсичностью вследствие содержания токсинов ряда ТТХ в их коже. В зависимости от вида, содержание токсинов в пересчете на концентрацию варьировалось в пределах от 9,9 до 754,7 мкг ТТХ/г тела (Kim et al., 1975; Mebs, Schmidt, 1989; Yotsu-Yamashita, Tateki, 2010; Mebs et al., 2018). Самым токсичным

органом древесных лягушек *Polypedates* sp. также являлась кожа, токсичность которой была эквивалентной $<0,4 - 164,3$ мкг ТТХ/г ткани (Tanu et al., 2001). Токсины ряда ТТХ вида *Brachycephalus ephippium* были выявлены не только в коже (37,4 мкг ТТХ/г), но также печени (20,9 мкг ТТХ/г) и яичниках (13,7 мкг ТТХ/г) (Pires et al., 2002). Тотальная концентрация токсинов ряда ТТХ у *Brachycephalus pernix* составила 75,9 мкг ТТХ/г тела (Pires et al., 2005).

1.2.2 Токсин-содержащие структуры

Эктодермальные структуры

В 1986 году в ходе изучения экскреции ТТХ под действием внешнего раздражителя у рыб фугу *Takifugu pardalis*, *T. poecilonotus*, *T. vermiculare radiatum*, *T. vermiculare porphyreum* и *T. niphobles* было предположено, что ТТХ-секретирующими структурами являются кожные железы (Kodama et al., 1986). Позже, локализация токсина у рыб фугу была изучена с помощью иммуногистохимических методов: так, было показано, что у некоторых видов, например, *T. vermicularis* и *Chelonodon patoca* (Mahmud et al., 2003a), ТТХ содержится в сукциформных клетках (одиночных железах кожных покровов рыб). У других видов ТТХ был обнаружен и в сукциформных, и базальных (низкодифференцированных) клетках кожных покровов; к таким видам относятся *Tetraodon nigroviridis* (Mahmud et al., 2003b), *Tetraodon steindachneri* (Tanu et al., 2002) и *Yongeichthys criniger* (Tatsuno et al., 2013). Вид *T. nigroviridis* был также исследован методом электронной микроскопии, в результате чего была выявлена локализация ТТХ в лизосомах базальных клеток (Mahmud et al., 2003b). У вида *T. alboplumbeus* ТТХ локализовался в многоклеточных железах кожи, продуцирующих мукоидный секрет (Itoi et al., 2012).

Содержание ТТХ в кожных покровах было продемонстрировано для некоторых моллюсков, включая осьминогов. Так, количественный анализ токсина в разных тканях синекольчатых осьминогов *Hapaloclaena flaviata* и *H. lunulata* выявил, что мантия обоих видов содержит высокие концентрации ТТХ (Williams, Caldwell, 2009). Более подробное изучение микрораспределения ТТХ в теле осьминогов методом иммуногистохимии показало его локализацию под эпидермисом и в кровеносной системе, проходящей через кожные покровы (Williams et al., 2012).

Используя комбинацию жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией в сочетании с иммуногистохимией было продемонстрировано, что двустворчатые моллюски *P. australis* содержат наибольшую концентрацию ТТХ в сифоне, где токсин локализован во внешнем и внутреннем эпителии (Biessy et al., 2018).

Исследование распределения токсинов рода ТТХ у в организме тритонов нескольких видов показало преимущественную локализацию токсинов в клетках желез покровного эпителия. У *Cynops pyrrhogaster* ТТХ локализуется в гранулярных железистых клетках, входящих в состав гранулярных и смешанных желез (Tsuruda, et al., 2002b; Mebs et al., 2021). У видов *T. granulosa* и *Notophthalmus viridescens* сильная ТТХ-позитивная реакция была обнаружена в клетках, входящих в состав гранулярных желез, а также, положительная слабая реакция на ТТХ наблюдалась в мукоидных клетках покровного эпителия (Mebs et al., 2010; Mailho-Fontana et al., 2019).

Единственными структурами земноводных *Atelopus hoogmoedi*, содержащими ТТХ, являлись гранулярные железы и эпителиальные клетки кожи, что было показано иммуногистохимическими методами (Mebs et al., 2018).

Пищеварительная система

Количественный анализ содержания ТТХ у нескольких рыб из рода *Lagocerphalus* выявил, что наибольшая его концентрация содержится в желудочно-кишечном тракте (Katikou et al., 2009; Thuy et al., 2020). Изучение клеточной локализации ТТХ методом иммуноцитохимии у рыб из рода *Takifugu*, а также *C. patoca* выявило его содержание в цитоплазме гепатоцитов (Mahmud et al., 2003a; Itoi et al., 2012; Okita et al., 2013; Gao et al., 2020; Sato et al., 2021).

С помощью хроматографических методов показано, что у синекольчатых осьминогов *Napalochlaena fasciata* и *N. lunulata* наибольшей концентрацией ТТХ обладают пищеварительные железы, где, с помощью иммуногистохимии была выявлена локализация токсина в клетках, выстилающих секреторные каналы пищеварительной железы (Williams et al., 2012).

Гастроподы *Pleurobranchaea maculata* также были изучены с помощью хроматографических и иммуногистохимических методов, в результате чего ТТХ в наибольших концентрация был обнаружен в пищеварительной железе (Wood et al., 2012; Salvitti et al., 2015). Исследование двустворчатых моллюсков *P. australis* с применением этой же комбинации методов показало локализацию ТТХ в клетках эпителия кишечника и прямой кишки в небольших количествах (Biessy et al., 2018).

Локализация ТТХ в пищеварительной системе тритонов было показано иммуногистохимическими методами – ТТХ был обнаружен в эпителии кишечника вида *N. viridescens* (Mebs et al., 2010; Mebs et al., 2012).

1.3 ТТХ и его производные у немертин

1.3.1. Диапазоны содержания

В 1988 г. у видов *Lineus fuscoviridis* Takakura, 1898 и *Tubulanus punctatus* Takakura, 1898 впервые был обнаружен ТТХ (Miyazawa et al., 1988). Позже, в разное время, ТТХ, а также его производные были обнаружены у немертин из 13 родов, являющихся представителями всех трех классов (Göransson et al., 2019). В таблице 1 представлены актуальные данные содержания токсинов ряда у немертин. В большинстве перечисленных исследований для анализа были использованы методологические подходы, не дающие возможность оценить концентрацию токсинов.

Таблица 1 – Токсины ряда ТТХ у немертин.

Вид	Суммарная концентрация ТТХ и его производных, нг/г	Литературный источник
Палеонемертины		
<i>Cephalothrix rufifrons</i>	+	Carroll et al., 2003
<i>Cephalothrix simula</i>	8575,0–4555020,0	Ali et al., 1990; Turner et al., 2018; Vlasenko et al., 2018; Vlasenko, Magarlamov, 2020, 2023

<i>Cephalothrix</i> sp.	+	Tanu et al., 2004b
<i>Tubulanus punctatus</i>	1,1–96120,0	Vlasenko et al., 2018; Miyazawa et al., 1988
Пилидиофора		
<i>Dushia atra</i>	+	Campbell, Schwartz, 2008
<i>Micrura verrilli</i>	+	
<i>Lineus fuscoviridis</i>	2670,0–89530,0	Miyazawa et al., 1988
<i>Lineus torquatus</i> (= <i>Kulikovia torquata</i>)	+	Asakawa et al., 2013
<i>Lineus ruber</i>	+	Carroll et al., 2003
<i>Lineus sanguineus</i>	+	
<i>Lineus viridis</i>	+	
<i>Riseriellus occultus</i>	+	
<i>Kulikovia alborostrata</i>	<0,6	Asakawa et al., 2013 Vlasenko et al., 2018
<i>Kulikovia manchenkoi</i>	4,7	Vlasenko et al., 2018
<i>Yininemertes pratensis</i>	+	Kwon et al., 2017
Гоплонемертины		
<i>Amphiporus lactifloreus</i>	+	Carroll et al., 2003
<i>Amphiporus</i> sp.	+	Asakawa et al., 2013
<i>Malacobdella japonica</i>	+	
<i>Nipponnemertes punctatula</i>	+	
<i>Quasitetrastemma stimpsoni</i>	<0,6	Vlasenko et al., 2018

<i>Collarenemertes bimaculata</i>	<0,6	
-----------------------------------	------	--

Примечание: «+» – был проведен только качественный анализ.

1.3.2 Токсин-содержащие структуры

Эктодермальные структуры

Эпидермис немертин представляет собой столбчатый однослойный эпителий. Основу эпителия составляют ресничные клетки, между которыми располагаются одноклеточные железы. В ряде работ внутри эпителия были выявлены интерстициальные, не имеющие контактов с внешней средой, клетки, роль которых неочевидна (Pedersen, 1968; Gibson, 1982). Эпителиоциты расположены на слое экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) (Bürger, 1895; Human, 1951). У многих видов эпидермис выглядит многорядным, поскольку ядра эпидермальных и железистых клеток расположены на разных уровнях (Turbeville, 1991). Выделяют три типа эпителия немертин: палеонемертиновый, гетеронемертиновый и гоппонемертиновый. Палеонемертиновый эпителий является многорядным из-за сильно утолщенного эпидермиса, в котором сильно расширенные тела железистых клеток доминируют в базальной области (Turbeville, Ruppert, 1983; Norenburg, 1985). Гетеронемертиновый эпителий также является многорядным, и отличается от предыдущего типа наличием новообразования, представляющего собой слой погруженных железистых клеток эпидермального типа в соединительную ткань, называемого кутисом (Norenburg, 1985; Schwartz, Norenburg, 2005). В контексте морфологии немертин термин «кутис» был введен Бюргером (Bürger, 1895, 1897–1907) и используется уже на протяжении более 120 лет многими авторами (Coe, 1905; Chernyshev et al., 2018; Hookabe, Kajihara, 2020). Для гоппонемертинового типа эпителия характерно

наличие зоны вакуолевидных, чашеобразных структур между эпидермисом и базальной пластинкой (Pedersen, 1968; Berg, 1972; Norenburg, 1982).

Покров немертин содержит большое количество разнообразных железистых клеток. Среди желез по форме и содержанию секреторных гранул выделяют основных три типа: 1) серозные, 2) мукоидные, и 3) бациллярные (= гранулярные). Мукоидные клетки обычно имеют бокаловидную форму и содержат связанные с мембраной секреторные гранулы однородной хлопьевидной субструктуры с переменной электронной плотностью. Мукоидные клетки палео- и гоппонемертин преимущественно эпидермальные, у гетеронемертин – кутисные (Turbeville, 1991). У гетеро- и гоппонемертин также были описаны серозные клетки, расположенные в эпидермисе и характеризующиеся однородной электронно-плотной массой секреторного материала, (Norenburg, 1985). Бациллярные клетки содержат однородные по размеру и форме гранулы, которые могут иметь форму палочек, сфер или спиралей (Norenburg, 1985). Бациллярные клетки встречаются во всех отрядах немертин: у гетеронемертин (пилидофора) эти железы расположены в кутисе, у палеонемертин и гоппоненертин – в эпидермисе (Norenburg, 1985).

К эктодермальным структурам немертин также относят секреторный эпителий хобота. Хобот – характерный только для немертин аппарат, представляющий собой цилиндрическое выпячивание стенки тела и служащий для захвата добычи в процессе охоты. Внешняя поверхность хобота, контактирующая с окружающей средой после его выворачивания, покрыта однослойным многорядным эпителием (= секреторный эпителий). В составе секреторного эпителия выявляется три типа клеток: 1) поддерживающие клетки,

2) железистые клетки и 3) сенсорные клетки. Среди желез обособленно выделяют псевдокнид-содержащие клетки, секреторные гранулы которых содержат свернутую полую трубку, способную выстреливать, на подобие нематоцист кишечнополостных (Turbeville, 1991; Magarlamov et al., 2021). Предполагается, что благодаря псевдокнидам осуществляется функция адгезии хобота к жертве и/или введение токсичного секрета внутрь жертвы (Jennings, Gibson, 1969; Чернышев, 2011).

В 2004 г. Тану и соавторы были первыми, кто описал ТТХ-положительные клетки немертин (Tanu et al., 2004b). При помощи иммуногистохимии авторы выявили, что на срезе стенки тела палеонемертины *C. simula* (в статье – *Cephalothrix* sp.) ТТХ наиболее плотно локализовался в везикулах, содержащихся апикально в железистых (согласно авторам – бациллярных) клетках эпидермиса. ТТХ также был обнаружен в ЭЦМ (согласно авторам – в базальной пластинке). Судя по положению, везикулы, содержащие ТТХ в апикальной части железистых клеток в эпидермисе, скорее всего, могут экскретироваться путем экзоцитоза в ответ на внешние раздражители. Причина плотной локализации ТТХ в ЭЦМ остается неясной, но она может быть связана с транспортом ТТХ из внутренних органов в эпидермальные клетки. Кроме того, ТТХ был обнаружен в железистых клетках эпителия хобота и в эндотелии ринхоцеля (Tanu et al., 2004b). Более подробно локализация ТТХ была изучена в работе 2021 года, где было выявлено основные места накопления ТТХ у *C. simula* – серозные клетки и гранулярные клетки III типа эпидермиса, мукоидные клетки головных желез и железистые клетки II типа железистого эпителия хобота (Malykin et al., 2021). Также, ТТХ был визуализирован в серозных клетках интегумента палеонемертины *Tubulanus polymorphus* (Campbell, Schwartz, 2008).

Среди представителей класса пилидиофор было исследовано только три вида гетеронемертин. Как было отмечено ранее, покровы гетеронемертин состоят из ресничного эпидермиса и особого, характерного только для этого класса немертин, соединительно-тканного слоя – кутиса. Иммуногистохимическими методами ТТХ был визуализирован в бациллярных железистых клетках кутиса и серозных железистых клетках эпидермиса гетеронемертин *Dushia atra* и *Micrura verrilli* (Campbell, Schwartz, 2008). Более детальные исследования на другом виде гетеронемертин, *K. alborostrata*, показали, что токсин содержался только в одном типе железистых клеток интегумента (обозначенные как бациллярные клетки I типа кутиса) и в двух типах железистых клеток секреторного эпителия хобота (обозначенные как слизистые и псевдокнид-содержащие клетки) (Magarlamov et al., 2016).

Предполагают, что секреция токсинов железистыми клетками, расположенными в эпидермисе покровов тела, потенциально служит для отпугивания хищников, а их локализация в эпидермисе хобота играет роль в захвате жертвы (Malykin et al., 2021). К частичным доказательствам относят секрецию ТТХ и его производных покровами тела немертин, которая была показана ранее в эксперименте с механической стимуляцией выброса слизи особью *C. linearis* (= *C. simula*) (Ali et al., 1990). Тем не менее, общей концепции путей поступления, накопления и использования ТТХ и его производных сформулировано не было вследствие недостатка ключевых данных, демонстрирующих процессы в теле немертин, протекающие с участием токсинов.

Пищеварительная система

В пределах типа *Nemertea* наблюдается высокая вариация строения пищеварительной системы. Можно выделить общие для всех немертин структуры – рот, ротовая (буккальная) полость, передняя кишка (foregut), кишечник и анус (Jennings, 1969; Gibson, 1972; Чернышев, 2011). Буккальная полость немертин покрыта столбчатыми реснитчатыми клетками и многочисленными железистыми клетками (Norenburg, 1993; Schwartz, Norenburg, 2005). Для некоторых видов немертин с помощью электронной микроскопии было описано высокое разнообразие железистых клеток, содержимое которых можно отнести к двум типам: серозному и слизистому (Jennings, 1969). За ртом следует передняя кишка, являющаяся передним отделом пищеварительной системы. Стенка передней кишки, умеренно извитая и выстланная ресничными клетками, часто имеет схожий с буккальной полостью клеточный состав (Anadon et al., 1974; Norenburg, 1993; Schwartz, Norenburg, 2005). Кишечник – наиболее длинный отдел пищеварительного тракта. Эпителий стенки кишечника состоит из одного слоя клеток, располагающихся на тонкой базальной мембране. Клеточный состав представлен в основном вакуолизированными ресничными столбчатыми клетками и железистыми клетками (Jennings, 1969; Gibson, 1972; Schwartz, Norenburg, 2005).

Анализ локализации ТТХ в пищеварительной системе *Cephalothrix* sp. показал наличие токсина в везикулах, распределенных по стенке кишечника и локализованных преимущественно базально в эпителиальных клетках кишечника, особенно вокруг кровеносных сосудов и стенки ринхоцеля (Tanu et al., 2004). Похожие результаты были получены на немертинах *C. simula*, а также уточнена

внутриклеточная локализация токсина: ТТХ был обнаружен в фагосомах и цитоплазме энтероцитов (Malykin et al., 2021). В 2024 году исследование содержания ТТХ в органах нападения немертин этого же вида показало наличие ТТХ-позитивных базальных низкодифференцированных и железистых клеток в буккальной полости (Malykin et al., 2024). Гетеронемертины *D. atra* и *M. verrilli*, как было показано, также содержат ТТХ-позитивные клетки в эпителии кишечника (Campbell, Schwartz, 2008).

Необходимо отметить, что несмотря на подробные данные о тканевом содержании ТТХ и его производных у некоторых видов немертин, экспериментов, доказывающих поступление и целенаправленное использование токсинов в поведенческих стратегиях животных не было проведено, что оставляет вопрос об их накоплении и функциях открытым.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Сбор материала

Немертины *Kulikovia alborostrata* (Takakura, 1898) были собраны в ризоидах бурых водорослей *Saccharina* sp. в бухте Спокойная (42.7090N, 133.1809E) (Японское море) в июле-августе 2018-2023 г (рис. 3). Червей содержали в аэрируемых аквариумах с проточной морской водой ($t=17\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Рисунок 3 – фотография *Kulikovia alborostrata*.

2.2 Отбор слизи

Для сбора секрета каждую особь *K. alborostrata* помещали на чашку Петри со стерильной морской водой объемом 1 мл и воздействовали кратковременным (2 с) импульсом электрического тока напряжением 12 вольт. Выделенный секрет

собирали в пробирки объемом 15 мл, помещали на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ для дальнейших исследований.

2.3 Приготовление экстрактов для выявления токсинов ряда ТТХ методом ВЭЖХ-МС/МС

Для приготовления экстрактов немертин к образцам добавляли 0,1% раствор уксусной кислоты на 70% метаноле в объемном соотношении 1:10, в случае экстрагирования секрета – в соотношении 1:3. 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). Полученный гомогенат центрифугировали ($14000 \times g$, 10 мин, 4°C), супернатант отбিরали, выпаривали досуха в роторном испарителе (Labconco, США) в течение 4 ч при 60°C . Полученный осадок растворяли в 0,1% водном растворе уксусной кислоты из расчета 1 мл/г гомогената немертины, фильтровали через центрифужные концентраторы Vivaspin turbo 4 (отсечение по молекулярной массе 3 кДа (Sartorius, Германия)). Полученные образцы замораживали при -20°C для дальнейших исследований.

2.4 Высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС)

Определение содержания ТТХ и его производных в исследуемых экстрактах осуществляли при помощи ВЭЖХ-МС/МС. 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 (ShimadzuEuropa, 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. Применяли следующие мобильные фазы для бинарного градиентного элюирования: 5 мМ аммония и 8 мМ муравьиной кислоты в растворе ацетонитрил: вода (94:6) (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 была установлена предколонка SeQuant ZIC-HILIC (20 × 2,1 мм, 5 мкм) (Merck, Германия). Через 4,4 мин кран переключали и промывали предколонку обратным током изопропанола (4,4-9 мин) и воды (9-15 мин) со скоростью потока 0,3 мл/мин. Через 16 мин кран переключали обратно.

Масс-спектрометр работал в режиме сканирования (m/z 200-1000) и мониторинга множественных реакций (MRM). Параметры источника ионов: температура интерфейса – 380°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. В качестве внешнего стандарта использовали экстракт *C. simula*, содержащий ТТХ в известной концентрации, а также его производные. Критерием обнаружения токсинов являлось соотношение сигнал/шум > 3 пика по основному MRM-переходу, относительная интенсивность пика вспомогательного иона > 4%,

порядок выхода токсинов согласно данным Бане с соавторами (Bane et al., 2014) (табл. 2).

Таблица 2 – MRM-переходы (мониторинг множественных реакций) и время удерживания тетродотоксина (ТТХ) и его производных, обнаруженных в экстрактах немертин.

Анализируемое вещество	Время удерживания, мин	MRM-переходы*	Энергия столкновения, eV
ТТХ	14,56–15,07	320,10>302,10	-25
		320,10>162,10	-41
4-эпиТТХ	12,62–12,90	320,10>302,10	-25
		320,10>162,10	-41
11-норТТХ-6(S)-ол	12,53–13,16	290,10>272,10	-25
		290,10>162,10	-41
11-норТТХ-6(R)-ол	10,68–10,84	290,10>272,10	-25
		290,10>162,10	-41
4,9-ангидроТТХ	10,63–10,99	302,10>256,10	-25
		302,10>162,10	-41
5-деоксиТТХ	8,41–8,68	304,10>286,10	-25
		304,10>176,10	-41
11-деоксиТТХ	9,53–10,43	304,10>286,10	-25
		304,10>176,10	-41
5,6,11-тридеоксиТТХ	5,08–5,58	272,10>254,10	-25
		272,10>162,10	-41
11-оксоТТХ	16,85	336,10>318,10	-38
		336,10>300,10	-38
		336,10>282,10	-38
		336,10>162,10	-38
1-гидрокси-8-эпи-5,6,11-тридеоксиТТХ	6,42	288,10>162,10	-43

4,9-ангидро-8-эпи-5,6,11-тридеоксиТТХ	5,08	254,10>162,10	-43
---------------------------------------	------	---------------	-----

* Согласно Vane et al., 2014.

Для обнаружения ТТХ и 35 его производных в исследуемых образцах немертин использовали значения параметров (массы молекулярных ионов, MRM-переходы и энергии столкновения (eV)) описанных в работах Вале (Vale et al., 2008), Кудо с соавторами (Kudo et al., 2012b), Бане 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 eV обнаруженных токсинов немертин приведены в таблице 3.

Расчет концентрации производных ТТХ в анализируемых экстрактах проводили относительно площади пика ТТХ по иону 320,1 с использованием калибровочной кривой согласно методике Чен (Chen et al., 2011). Полученные значения концентраций использовали для расчета концентраций токсинов в образцах тела немертин относительно их массы (нг/г).

В оптимизированных условиях ВЭЖХ-МС/МС была проведена проверка линейности метода, расчет степени извлечения, предела детекции (LoD), LoQ. Валидацию метода проводили 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%, LoD равен 0,2 нг/мл, LoQ равен 0,6 нг/мл, относительное стандартное отклонение составляло 4,5-14,6%.

2.5 Изучение локализации ТТХ и его производных в теле *K. alborostrata*

Для изучения локализации токсинов в теле *K. alborostrata* было использовано 28 особей. Каждая особь *K. alborostrata* была поделена на 6 фрагментов: хобот, прецеребральный, ротовой, передний, средний и задний отделы тела (рис. 4). Одинаковые фрагменты тела 25 особей объединяли, затем использовали для приготовления экстракта по методике, описанной в п. 2.3, экстракт помещали на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ для дальнейших исследований. Фрагменты трех особей были использованы для иммуногистохимических и морфологических исследований.

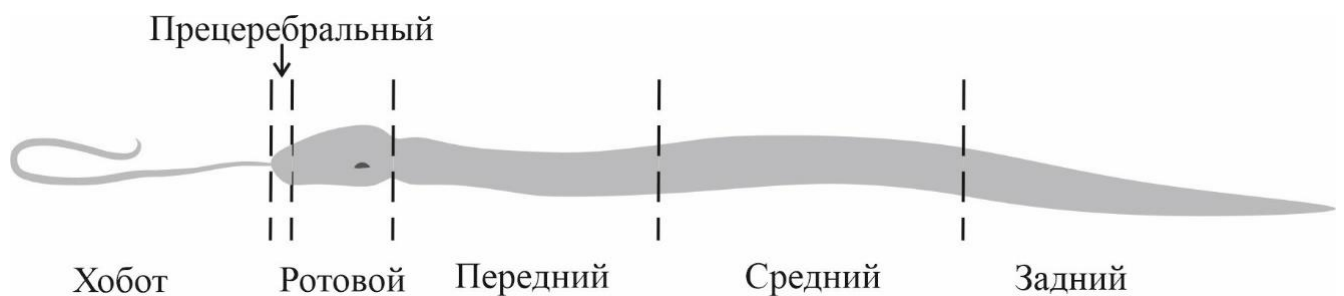


Рисунок 4 – Схема деления *Kulikovia alborostrata* на отделы тела для выделения тетродотоксина и его производных.

2.6 Световая микроскопия

Фиксацию немертин производили с помощью 2,5% раствора глутаральдегида на 0,2М какодилатном буфере (КБ) с добавлением 0,2М хлорида натрия в течение 1 ч с последующей промывкой в КБ. Постфиксацию осуществляли с помощью 1% раствора OsO_4 в течение 1 ч. После, материал отмывали в КБ, обезвоживали в этиловом спирте и ацетоне и заливали в смесь эпоксидных смол эпона и аралдита (EMS, USA).

Полутонкие (толщиной 0,7 мкм) срезы были получены на ультрамикротоме Leica UC6 (Leica Microsystems, Германия). При изучении морфологической организации полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим (Sigma, USA). Анализ полутонких препаратов производили на микроскопе Olympus IX83 (Japan).

2.7 Флуоресцентная микроскопия

Кусочки тела немертин фиксировали в 4% параформальдегиде на фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH 7,4) в течение 1 ч, промывали раствором ФСБ. Фиксированный материал обезвоживали в смеси этилового спирта и ацетона и заключали в водорастворимую смолу LR White. Полутонкие (0,7 мкм) срезы изготавливали на ультрамикротоме Leica UC6 и переносили на предметные стекла. Срезы инкубировали в 1% растворе Тритона-х100 на ФСБ в течение 1 ч, промывали в ФСБ с 0,05% Tween-20 (ФСБ-Т), затем помещали в блокирующий раствор 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) на ФСБ на 1 ч при 4°C, после чего промывали ФСБ-Т. Срезы инкубировали с первичными антителами кролика против ТТХ (Genetex, Ирвин, Калифорния, США) (разведение 1:25) в течение двух сут при 4°C, затем проводили отмывку в ФСБ-Т и добавляли смесь вторичных антител осла к иммуноглобулинам кролика Alexa 647 (Invitrogen, США) (разведение 1:1000). Вторичные антитела выдерживали в течение ночи при 4°C. Затем срезы промывали ФСБ-Т, заключали в Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich) и анализировали на ZEISS Axio Imager A2 со светодиодным источником света ZEISS Colibri 7 (Carl Zeiss, Штутгарт, Германия). В качестве отрицательного контроля использовали 1% раствор БСА в ФСБ вместо раствора первичных антител, при этом, положительную реакцию не наблюдали ни на одном из

исследованных срезов. Положительный контроль был проведен на тканях *C. simula*, для которого ТТХ-положительные клетки были описаны ранее Тану с соавторами (Tanu et al., 2004) и Малыкиным с соавторами (Malykin et al., 2021). Для подтверждения специфичности окрашивания проводили отрицательный контроль на тканях *Kulikovia manchenkoi* по методике Сато с соавторами (Sato et al., 2021): образцы инкубировали в растворе антител против ТТХ, предварительно проинкубированных с экстрактом *C. simula*, содержащим избыточное количество ТТХ (1000 нг/мл) в течение 2 ч при комнатной температуре, и далее обрабатывали в соответствии с методикой, описанной выше. В результате наблюдали снижение интенсивности окрашивания у всех исследованных образцов (рис. 5).

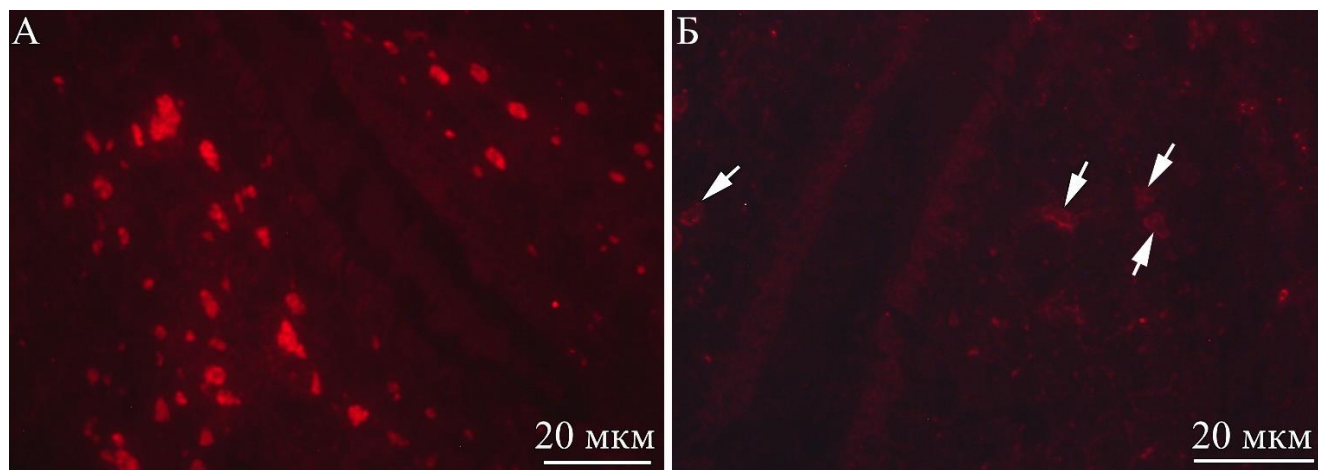


Рисунок 5 – Микрофотографии поперечных срезов пищеварительного тракта особей *Kulikovia manchenkoi*, полученные методом флуоресцентной микроскопии. Красный цвет обозначает ТТХ-положительную реакцию при маркировании антителами против ТТХ. (А) – эпителий кишечника с ТТХ-положительными железистыми клетками. (Б) – эпителий кишечника контрольного образца, обработанный антителами против ТТХ, предварительно проинкубированными с избыточными количествами ТТХ. Стрелки указывают на ТТХ-положительные клетки с пониженной интенсивностью окрашивания.

Полученные изображения анализировали с помощью программного обеспечения ZEN 3.0, и обрабатывали в Adobe Photoshop 2019 (Adobe, Сан-Хосе, Калифорния, США) для настройки контрастности и яркости, и создания цифровых подписей. Интенсивность иммуногистохимического окрашивания рассчитывали по среднему значению пикселя в окрашенном поле с использованием Adobe Photoshop 2019. Интенсивность окрашивания мышц хобота определяли как слабую, интенсивность гранул g9 кишечника определяли как высокую.

2.8 Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)

Кусочки тела немертин фиксировали в 4% параформальдегиде на ФСБ, pH 7,4 в течение 1,5 ч, промывали раствором ФСБ, помещали в 20% раствор сахарозы и инкубировали в течение ч при температуре +4°C. После этого образцы помещали в раствор Leica OCT cryocompound tissue freezing medium (Leica, Германия) и изготавливали криосрезы толщиной 10 мкм с помощью микротомы Thermo HM 560 (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные криосрезы промывали в 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% БСА на ФСБ на 1 сут при температуре +4°C. Для выявления ТТХ и его производных использовали раствор первичных антител к ТТХ (Genetex, США) в разведении 1:25. Для детектирования структур цитоскелета использовали антитела к ацитилированному α -тубулину (Genetex, США) в разведении 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 козы к иммуноглобулинам мыши Alexa 488 (Invitrogen,

США) (разведение 1:500) и вторичных антител козы к иммуноглобулинам мыши Alexa 647 (Invitrogen, США) (разведение 1:500), инкубировали в течение 1 сут при +4°C. Препараты заключали в поливиниловый спирт (Mowiol 4-88) (Sigma-Aldrich, США) и анализировали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM-780 (Carl Zeiss, Германия).

Как неиммунная кроличья сыворотка, так и ФСБ с 10% БСА были использованы вместо раствора первичных антител против ТТХ в качестве отрицательного контроля, при этом, положительную реакцию не наблюдали ни в одном из исследованных срезов.

2.9 Электронная иммуногистохимия

Внутриклеточную локализацию ТТХ и его производных исследовали с помощью электронного микроскопа с использованием иммуноферментных методов (иммуноэлектронная микроскопия). Немертин анестезировали 7% раствором хлорида магния, разделяли на фрагменты, фиксировали 4% формальдегидом в ФСБ в течение 1 ч и промывали в ФСБ в течение 2 ч. Затем материал обезвоживали в этиловом спирте и ацетоне и заливали в водорастворимую смолу LR White. Ультратонкие (60–70 нм) срезы изготавливали в ультрамикротоме Leica UC6 и переносили на золотые бленды (EMS, США), покрытые формварной (0,25%) (EMS, США) пленкой. Срезы инкубировали в течение 30 мин в блокирующем растворе, состоящем из 10% БСА и 10% нормальной сыворотки козы в ФСБ. Для выявления ТТХ срезы инкубировали в растворе первичных антител против ТТХ (поликлональные, кроличьи, в разведении 1:25, Abnova, Тайвань) в ФСБ с 10% БСА. Материал выдерживали в

первичных антителах при 4°C в течение 24 ч, затем промывали в фосфатном буфере в течение 24 ч при 4°C и инкубировали в течение 24 ч при температуре 4°C в анти-кроличьими иммуноглобулинами G (IgG) козы, конъюгированными с золотыми частицами (Sigma, США), разведенными в соотношении 1:50 в ФСБ с 1% БСА. Срезы промывали в PBS в течение 6 ч и окрашивали 1% раствором уранилацетата. Материал исследовали с использованием просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия).

Как неиммунная кроличья сыворотка, так и ФСБ с 10% БСА были использованы вместо раствора первичных антител против ТТХ в качестве отрицательного контроля, при этом, положительная реакция не наблюдалась во всех исследованных срезах.

2.10 Эксперимент по изучению изменения содержания ТТХ и его производных в теле и слизи *K. alborostrata* в течение 7 мес

Для исследования изменения концентрации ТТХ и его производных в секрете немертин *K. alborostrata* семнадцать особей содержали в аэрируемых аквариумах с фильтрованной морской водой ($t=12^{\circ}\text{C}$) без подкормки, воду в аквариумах меняли раз в неделю. Далее животных подвергали стимуляции для выработки секрета, в 1 и 3 сут, через 30 сут и через 7 мес содержания (рис. 6). После отбора секрета на 7 мес тело использовали для последующего выделения ТТХ и его производных (п. 2.3), экстракты тела и секрета анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС (п. 2.4).

2.11 Эксперимент по исследованию локализации ТТХ и его производных методом иммуногистохимии до и после секреции

Для исследования локализации ТТХ и его производных в теле *K. alborostrata* методом иммуногистохимии было взято 4 особи, 2 из которых подвергали стимуляции электрическим током (экспериментальные животные), другие 2 особи не стимулировали (интактные животные). Далее червей анестезировали 7% MgCl₂, отделяли фрагменты тела из района передней кишки, исследовали методом КЛСМ, как описано в п. 2.8.

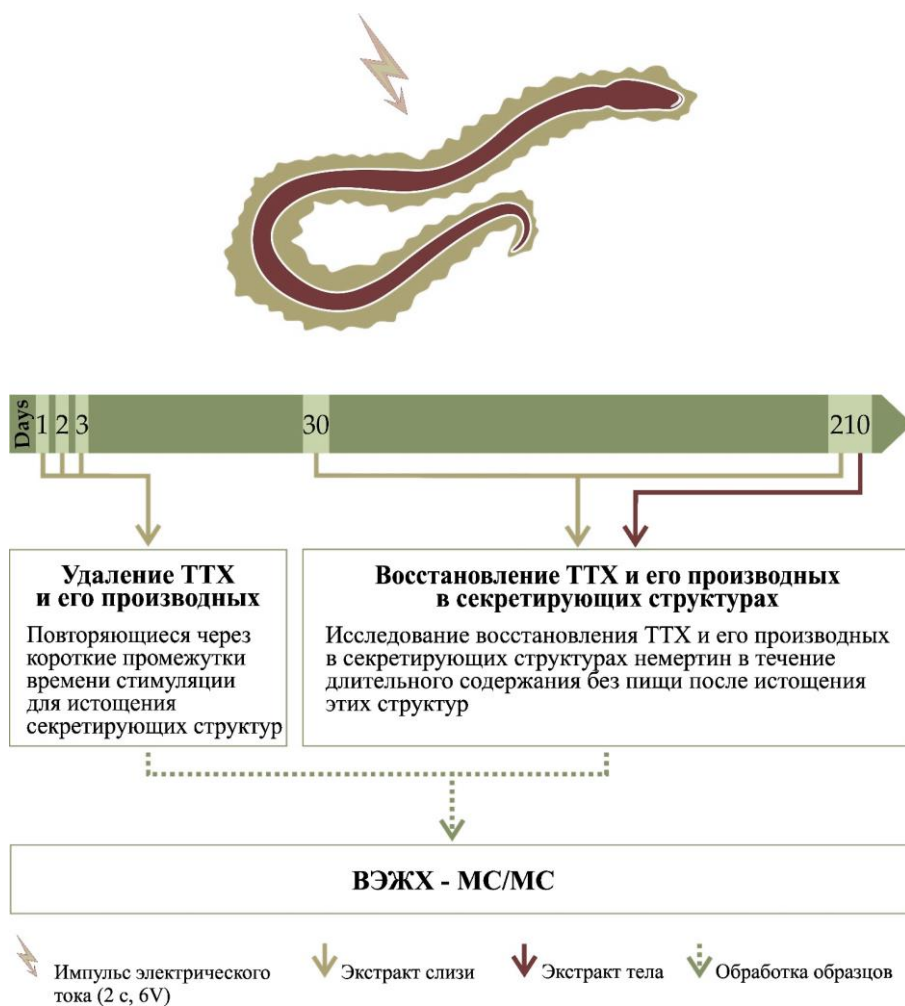


Рисунок 6 – Схема эксперимента по изучению изменения содержания ТТХ и его производных в теле и слизи *Kulikovia alborostrata* в течение 7 мес.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Внутривидовая вариация концентраций ТТХ и его производных у особей *K. alborostrata*

Экстракты 36 особей *K. alborostrata* содержали от одного до шести токсинов ряда ТТХ (рис. 7, табл. 3) с суммарной концентрацией 0,35–8,11 нг/г массы тела немертины. Наиболее представленным токсином был 5,6,11-тридеоксиТТХ ($71,98 \pm 31,67\%$), за ним следовали ТТХ ($16,28 \pm 26,64\%$), 5-деоксиТТХ ($5,01 \pm 11,22\%$) и 11-норТТХ-6(S)-ол ($5,16 \pm 9,67\%$).

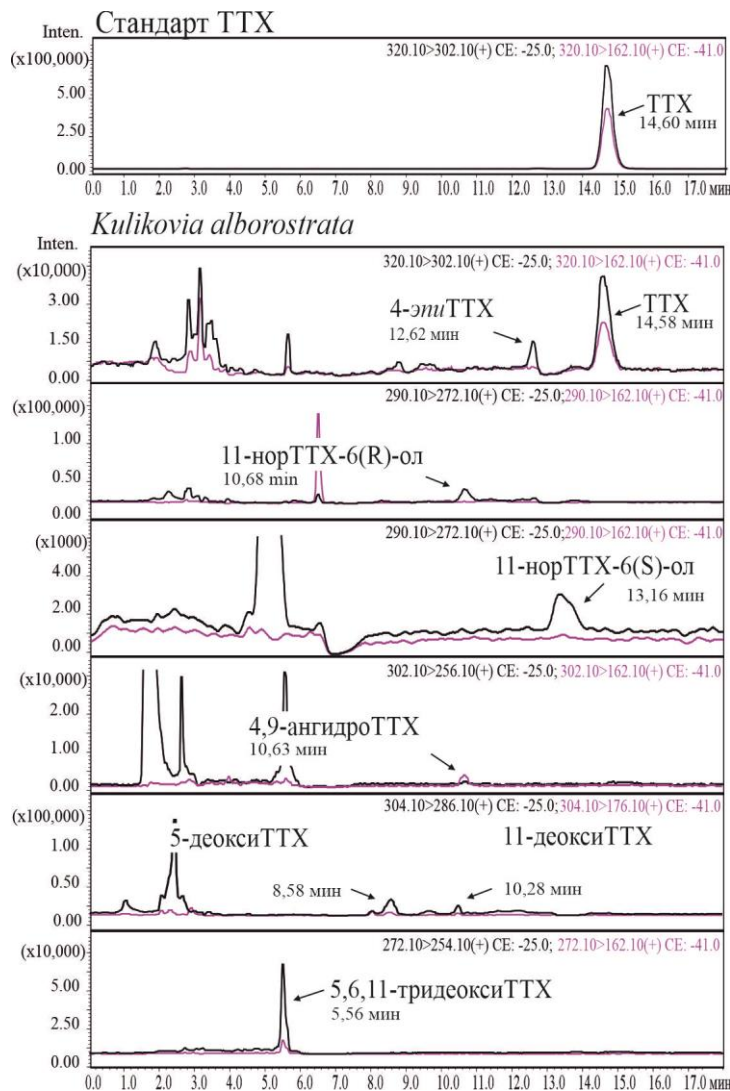


Рисунок 7 – Хроматограммы экстрактов *Kulikovia alborostrata*, полученные методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией.

3.2 Распределение ТТХ и его производных в теле *K. alborostrata*

Изучение ТТХ и его производных в различных участках тела (рис. 4) *K. alborostrata* показало, что 5,6,11-тридеоксиТТХ является единственным токсином у изученных особей, концентрация которого превышала LoQ (рис. 8). В нескольких участках тела обоих видов ТТХ и 5-деоксиТТХ были обнаружены в концентрациях ниже LoQ. В таблице 4 представлен только 5,6,11-тридеоксиТТХ.

Для количественного определения токсинов использовали объединенные образцы одних и тех же участков тканей 25 экземпляров *K. alborostrata*, поскольку средняя масса особей *K. alborostrata* составила $0,19 \pm 0,13$ г и размеры отдельных фрагментов были недостаточными для оценки содержания токсина. Масса объединенных образцов представлена в таблице 4.

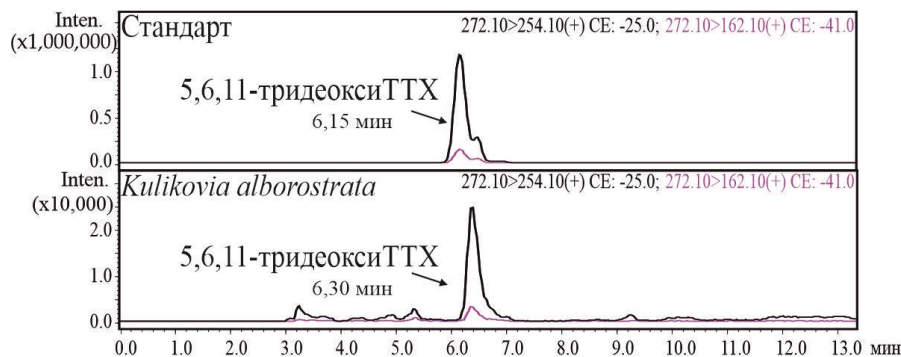


Рисунок 8 – Хроматограммы экстрактов *Kulikovia alborostrata*, полученные методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией.

Таблица 3 – Концентрации тетродотоксина (ТТХ) и его производных у *Kulikovia alborostrata*.

Образец, №	Токсины, нг/г								Сумма
	ТТХ	4-эпиТТХ	11-норТТХ-6(S)-ол	11-норТТХ-6(R)-ол	4,9-ангидроТТХ	11-деоксиТТХ	5-деоксиТТХ	5,6,11-тридеоксиТТХ	
1	2,42	0,54	0,30	-	-	-	0,65	3,03	6,94
2	3,32	0,25	-	-	0,2	0,27	0,40	2,35	6,79
3	1,57	0,49	0,35	-	-	-	0,37	5,33	8,11
4	-	-	0,71	-	-	-	-	2,30	3,01
5	1,69	0,69	0,61	-	-	-	0,98	-	3,97
6	0,21	-	-	-	-	-	0,07	0,91	1,19
7	-	-	-	-	-	-	-	0,71	0,71
8	-	-	-	-	-	-	-	0,63	0,63

26	0,22	-	-	-	-	-	-	0,32	0,54
27	0,62	-	-	-	-	-	-	-	0,62
28	-	-	-	-	-	-	-	1,35	1,35
29	-	-	-	-	-	-	-	0,74	0,74
30	0,64	-	-	-	-	-	-	-	0,64
31	-	-	-	-	-	-	-	0,76	0,76
32	0,47	-	-	-	-	-	-	0,27	0,74
33	0,23	-	-	-	-	-	-	0,88	1,11
34	-	-	-	-	-	-	-	1,16	1,16
35	-	-	-	-	-	-	-	1,46	1,46
36	-	-	-	-	-	-	-	0,42	0,42

Примечание: «←» – концентрация ниже LoD.

Таблица 4 – Концентрации 5,6,11-тридеоксиТТХ в экстрактах разных отделов тела *Kulikovia alborostrata*.

Отдел тела	Масса, г	5,6,11-тридеоксиТТХ	
		нг/г	нг
Хобот	0,39	0,91	0,36
Прецеребральный	0,04	5,52	0,20
Ротовой	0,26	5,51	1,43
Передний	0,98	3,19	3,13
Средний	1,10	2,59	2,84
Задний	0,75	1,84	1,38

3.3 ТТХ-содержащие структуры *K. alborostrata* и их морфологические особенности

Первые данные о распределении ТТХ в органах и тканях *K. alborostrata* были получены Магарламовым и коллегами (Magarlamov et al, 2016). Авторы выявили ТТХ-позитивные клетки только в кутисе и в секреторном эпителии хобота *K. alborostrata*. В кутисе метка была выявлена одном типе кутисных желез (именуемые авторами как «бациллярные клетки I типа»), а в хоботе – в псевдокнид-содержащих и мукоидных железистых клетках.

В текущем исследовании нами было продолжено изучение клеточного состава секреторного эпителия *K. alborostrata*, была предложена новая классификация железистых клеток немертин (рис. 9 А, Б, табл. 5). При помощи флуоресцентной микроскопии с поликлональными антителами против ТТХ, способными связывать также производные ТТХ (Sato et al., 2019; Vlasenko, Magarlamov, 2020), были выявлены ТТХ-содержащие структуры в шести отделах тела *K. alborostrata*: секреторном эпителии хобота и прецеребральном отделе,

секреторном эпителии кожных покровов и эпителии пищеварительной системы ротового, переднего, среднего и заднего отдела (рис. 9 А, Б, табл. 5). Была получена количественная характеристика встречаемости ТТХ-позитивных структур (табл. 6). Были проведены цитофизиологические эксперименты, имитирующие защитные реакции, возникающие у немертин при угрозе нападения.

Таблица 5 – Характеристика железистых клеток интегумента, пищеварительной системы и хобота *Kulikovia alborostrata*.

Тип клеток	Морфологическое описание	Окрашивание метиленовым синим	Локализация	ТТХ-позитивное окрашивание
se	Одна крупная секреторная гранула занимает весь объем клетки	Голубой	Эпидермис	–
gc1	Мелкие секреторные гранулы округлой формы	Сине-фиолетовый	Кутис	Слабое
gc2	Крупные секреторные гранулы вытянутой овальной формы	Сине-зеленый	Кутис	–
gc3	Мелкие секреторные гранулы округлой формы	Сине-зеленый	Кутис	–
gc4	Крупные сферические секреторные гранулы	Синий	Кутис	Сильное
g1	Мелкие секреторные гранулы округлой формы	Голубой	Буккальная полость, передняя кишка	–

g2	Крупные секреторные гранулы округлой формы	Синий	Буккальная полость, передняя кишка	–
g3	Крупные секреторные гранулы округлой формы	Темно-синий	Буккальная полость	–
g4	Секреторные гранулы округлой или овальной формы	Синий	Передняя кишка	–
g5	Секреторные гранулы округлой или овальной формы	Фиолетово-синий	Передняя кишка	–
g6	Секреторные гранулы округлой формы	Фиолетовый	Передняя кишка	–
g7	Крупные сферические секреторные гранулы с гетерогенным содержимым	Светло-фиолетовый	Передняя кишка	Сильное
g8	Крупные секреторные гранулы округлой формы	Сине-фиолетовый	Кишечник	Слабое
g9	Крупные секреторные гранулы округлой формы	Сине-фиолетовый	Кишечник	Сильное
gp1	Псевдокниды	Голубой	Хобот	–
gp2	Крупные секреторные гранулы бациллярной формы	Фиолетовый или светло-фиолетовый	Хобот	–
gp3	Крупные сферические секреторные гранулы	Синий или голубой	Хобот	–
gp4	Мелкие секреторные гранулы округлой формы	Темно-синий	Хобот	Сильное
gp5	Секреторные гранулы округлой формы с гетерогенным содержимым	Синий	Хобот	–

Примечание: «–» – не обнаружено.

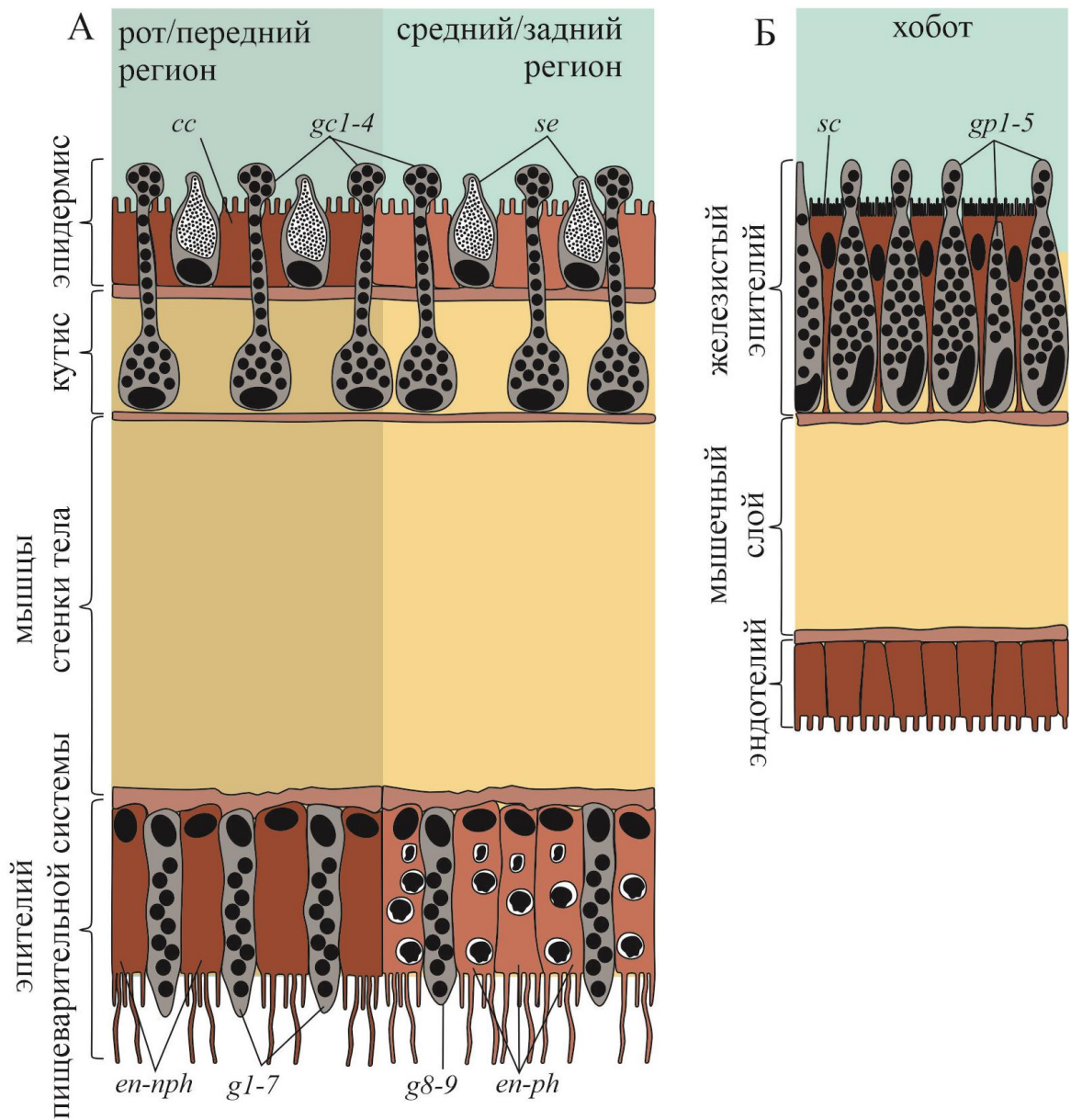


Рисунок 9 – Схематические изображения, иллюстрирующие секреторный эпителий *Kulikovia alborostrata*. (А) Секреторный эпителий интегумента и пищеварительной системы. (Б) Секреторный эпителий хобота. Буквенные обозначения: *cc* — ресничные клетки; *en-nph* — энтероциты нефагоцитирующие; *en-ph* — энтероциты фагоцитирующие; *g1-9*, железистые клетки пищеварительной системы 1–9 типов; *gc1-4* — железистые клетки кожи 1–4 типов; *gp1-5*, железистые клетки хобота 1–5 типов; *sc* — опорные клетки; *se* — серозная клетка.

Таблица 6 – Характеристика встречаемости ТТХ-положительных железистых клеток интегумента, пищеварительной системы и хобота *Kulikovia alborostrata*.

Тип клеток	Занимаемая площадь в эпителии*, %	Количество на 100 мкм ² ткани
gc1	21,6 ± 5,1	11 ± 6
gc4	7,8 ± 2,6	1 ± 5
g7	5,4 ± 3,5	3 ± 2
g8	12,0 ± 4,7	5 ± 5
g9	9,1 ± 4,3	4 ± 4
gp4	3,7 ± 1,3	2 ± 2

*Доля от общей площади железистых клеток соответствующего органа.

3.3.1 ТТХ-содержащие структуры пищеварительной системы

Пищеварительная система *K. alborostrata* состоит из ротового отверстия, ведущего в буккальную полость, передней кишки, кишечника и ануса (Jennings, Gibson, 1969; Gibson, 1972; Gibson, 1982; Чернышев, 2011). Был исследован эпителий буккальной полости, передней кишки, кишечника средних и задних отделов тела *K. alborostrata*. И буккальная полость, и эпителий передней кишки состояли из нефагоцитирующих энтероцитов и нескольких типов железистых клеток; кишечник состоял из фагоцитирующих энтероцитов и нескольких типов железистых клеток. На протяжении всего кишечного эпителия выделялось 9 типов железистых клеток. В эпителии буккальной полости присутствовало три типа железистых клеток (g1, g2 и g3), в передней кишке – шесть типов железистых клеток (g1, g2, g4 – g7) (рис. 10 А, Б), два типа железистых клеток в кишечнике (g8 и g9) (рис. 10 Г; табл. 5).

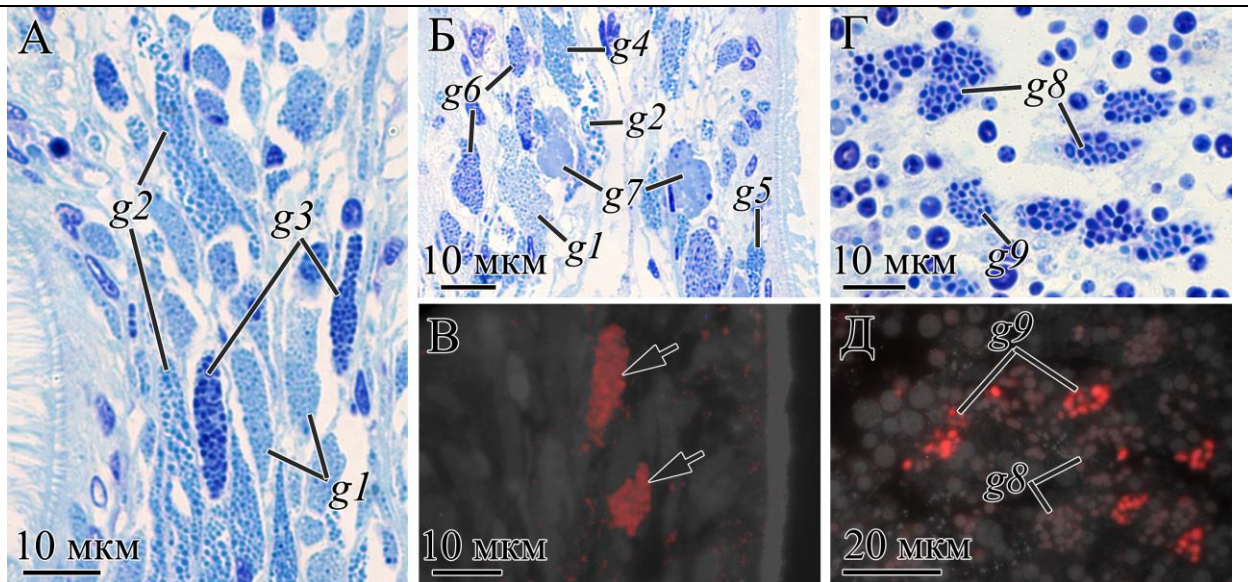


Рисунок 10 – Световые (А, Б, Г) и иммунофлуоресцентные (В, Д) микрофотографии поперечных срезов пищеварительного тракта *Kulikovia alborostrata*. Красный цвет обозначает ТТХ-положительную реакцию при маркировании антителами против ТТХ. (А) Эпителий буккальной полости. (Б) Эпителий передней кишки. (В) Дистальная часть эпителия передней кишки с ТТХ-положительными железистыми клетками g7 (обозначены стрелками). (Г) Кишечный эпителий средней области тела. (Д) Кишечный эпителий с ТТХ-положительными железистыми клетками. Буквенные обозначения: g1–g9, железистые клетки пищеварительной системы 1–9 типов.

Первый тип (g1) содержал небольшие округлые гранулы диаметром около 0,35 мкм. После окрашивания метиленовым синим гранулы приобретали голубой цвет. Этот клеточный тип являлся многочисленным в эпителии как буккальной полости, так и передней кишки. Второй тип (g2) железистых клеток содержал крупные округлые гранулы диаметром около 0,8 мкм, которые окрашивались метиленовым синим в синий цвет. Этот клеточный тип встречался умеренно как в буккальной полости, так и в передней кишке. Третий тип (g3) железистых клеток содержал крупные округлые гранулы диаметром около 0,8 мкм, которые окрашивались метиленовым синим в темно-синий цвет. G3 встречался редко и только в буккальной полости. Четвертый тип (g4) железистых клеток содержал округлые или овальные гранулы диаметром около 0,5 мкм. При окрашивании

метиленовым синим гранулы приобретали синий цвет. Этот клеточный тип обнаруживался только в передней кишке и встречался умеренно. Пятый клеточный тип (g5) содержал округлые или овальные гранулы диаметром около 0,6 мкм. При окрашивании метиленовым синим гранулы имели фиолетово-синий цвет. Этот клеточный тип обнаруживался только в передней кишке и встречался редко. Шестой тип (g6) железистых клеток содержал округлые гранулы в диаметре около 0,5 мкм, которые окрашивались метиленовым синим в фиолетовый цвет. Этот клеточный тип являлся многочисленным и встречался только в передней кишке. Седьмой тип (g7) железистых клеток содержал крупные округлые гранулы с гетерогенным содержанием диаметром около 0,8 мкм. Этот клеточный тип окрашивался метиленовым синим в светло-фиолетовый цвет. G7 встречался редко, только в передней кишке. Восьмой тип (g8) железистых клеток содержал крупные округлые гранулы диаметром около 1,5 мкм, которые окрашивались метиленовым синим в сине-фиолетовый цвет. Этот клеточный тип являлся многочисленным и встречался только в кишечном эпителии среднего и заднего отделов тела *K. alborostrata*. Девятый тип (g9) железистых клеток содержал округлые гранулы диаметром около 1 мкм, которые окрашивались метиленовым синим в сине-фиолетовый цвет. Этот клеточный тип встречался умеренно и только в кишечном эпителии среднего и заднего отделов.

Секреторные гранулы g7 (рис. 10 В) и g9 (рис. 10 Д) имели интенсивное свечение при маркировании антителами против ТТХ (табл. 5). Секреторные гранулы g8 (рис. 10 Д) имели слабое свечение (табл. 5). Представленность ТТХ-позитивных клеток кишечника несильно различалась между типами клеток. Занимаемая ими площадь в эпителии кишечника была приблизительно одинакова – от $5,4 \pm 3,5\%$ (g7) до $12,0 \pm 4,7\%$ (g8) (табл. 6).

Методом КЛСМ с использованием антител против ТТХ было выявлено наличие ТТХ-положительных частиц в цитоплазме фагоцитирующих энтероцитов кишечника (рис. 11 А). Частицы имели сферическую форму; их диаметр варьировал от 10 до 30 нм. Наибольшая концентрация ТТХ-позитивных частиц

наблюдалась в базальной части кишечного эпителия. Методом электронной иммуногистохимии было показано, что только фагосомы энтероцитов метились на ТТХ (рис. 11 Б). Эти ТТХ-меченные фагосомы имели крупные размеры, а их содержимое было представлено гетерогенным материалом.

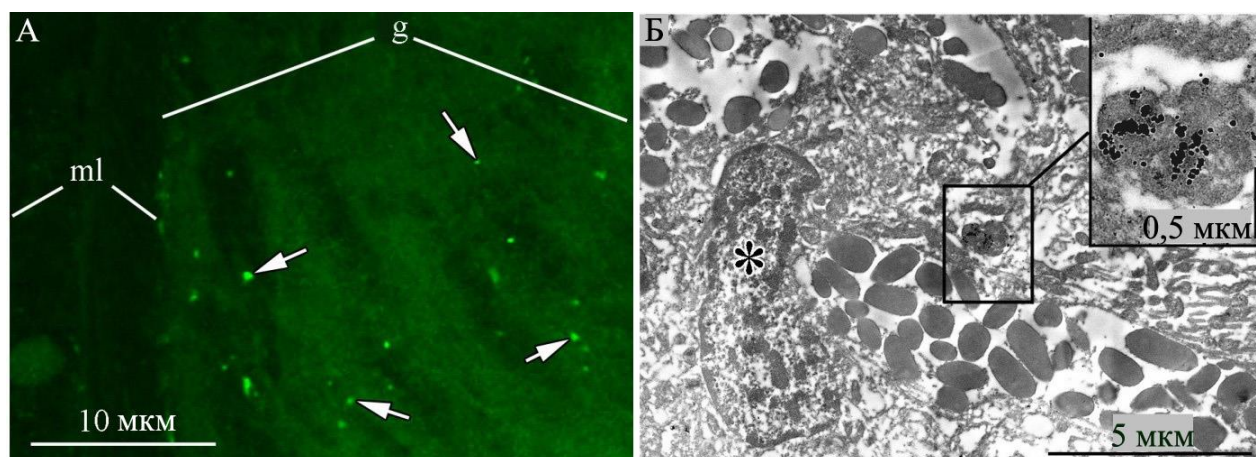


Рисунок 11 – Микрофотографии (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (А) и иммуноэлектронная микроскопия (Б)) поперечных срезов тела немертины *Kulikovia alborostrata*, окрашенных антителами против ТТХ. (А) Кишечный эпителий с ТТХ-положительными гранулами (стрелки). (Б) Энтероцит (звездочка) с ТТХ-положительной фагосомой в базальной части клетки. Вставка показывает фагосому при большем увеличении. Обозначения: *g* – кишечник, *ml* – мышечный слой.

3.3.2 ТТХ-содержащие структуры интегумента

Тип организации кожного покрова *K. alborostrata* является классическим «гетеронемертиновым» (Norenburg, 1985), в строении которого можно выделить эпидермис, прилегающий к ЭЦМ и кутис. Толщина эпидермиса и ЭЦМ была одинаковой по всему телу немертины и составляла 40-45 мкм и 8-10 мкм соответственно, а толщина кутиса уменьшалась от прецеребрального отдела тела к заднему от 320 до 20 мкм. Эпидермис представляет собой столбчатый многорядный ресниччатый эпителий, в составе которого выделяются ресничные и серозные клетки. Кутис включает мускулатуру кутиса, нервные волокна и субэпидермальные (кутисные) железистые клетки. Тела субэпидермальных

железистых клеток крупные, неправильной формы, и состоят из расширенного тела, переходящего в узкую шейку, которая ближе к апикальной поверхности эпителия расширяется, формируя выпячивание (папиллу), через которую происходит выделение секрета во внешнюю среду (рис. 12 В). Среди железистых клеток кутиса *K. alborostrata* было выявлено 4 типа (gc1–gc4). Все типы железистых клеток были равномерно распределены в кутисе от головного к хвостовому концу гетеронемертины.

Наибольшую популяцию клеток эпидермиса *K. alborostrata* представляют ресничные клетки. Ресничные клетки имеют характерную воронковидную форму: их апикальная часть расширена, а базальная – значительно заужена и переходит в ножку, с помощью которой клетка крепится к ЭЦМ. В центральной части клетки содержится крупное вытянутое ядро. Апикальная часть ресничных клеток несет многочисленные реснички и микроворсинки. Серозные клетки эпидермиса равномерно распределены между ресничными клетками, не формируя скоплений. Форма серозных клеток варьирует от овальной до вытянутой ланцетовидной. Ядро округлой формы располагается в основании базальной части клетки. Большую часть серозной клетки занимает крупная секреторная гранула. При окрашивании метиленовым синим секрет имеет светло голубой цвет.

Тип 1 железистых клеток кутиса (gc1) являлся преобладающим клеточным типом в кожных покровах *K. alborostrata*. Секрет gc1 был представлен гранулами овальной или округлой формы с диаметром около 0,5 мкм. При окрашивании метиленовым синим секреторные гранулы приобретали ярко-синий или сине-фиолетовый цвет. Железистые клетки кутиса 2 типа (gc2) содержали крупные гранулы овальной формы 0,4 мкм в диаметре и до 1 мкм в длину. При окрашивании метиленовым синим секреторные гранулы имели сине-зеленый цвет. Этот клеточный тип встречался умеренно. Железистые клетки кутиса 3 типа (gc3) содержали мелкие округлые гранулы диаметром около 0,3 мкм. При окрашивании метиленовым синим секреторные гранулы этого типа имели сине-зеленый цвет. Gc3 в кожных покровах *K. alborostrata* встречался редко.

Железистые клетки кутиса 4 типа (gc4) содержали крупные сферические гранулы до 1,5 мкм в диаметре. При окрашивании метиленовым синим секреторные гранулы этого клеточного типа имели синий цвет. G4 в кожных покровах *K. alborostrata* встречался редко.

Согласно иммуногистохимическим исследованиям, в интегументе ТТХ был локализован в нескольких типах железистых клеток кутиса. Высокоинтенсивное мечение ТТХ наблюдалось в секреторных гранулах gc4: ТТХ-положительные секреторные гранулы заполняли как тела, так и шейки клеток (рис. 12 В). Клетки этого типа занимали $7,8 \pm 2,6\%$ от площади покровного эпителия (табл. 6). Слабое мечение ТТХ было обнаружено в секреторных гранулах gc1; ТТХ-положительные секреторные гранулы были обнаружены только в телах клеток, в выводных протоках ТТХ-позитивные гранулы отсутствовали (рис. 12 Г). ТТХ-положительные gc1 были обнаружены в прецеребральной области и регионе ротовой полости, и занимаемая ими суммарная площадь составляла $21,6 \pm 5,1\%$ от площади покровного эпителия (табл. 6); те же клетки, локализованные в остальных областях тела, не были ТТХ-положительными.

В эксперименте по исследованию локализации ТТХ до и после секреции в теле *K. alborostrata* методом иммуногистохимии было выявлено, что в норме токсин локализуется в субэпидермальных железистых клетках (рис. 4 А, А1); на поверхности эпидермиса находятся одиночные скопления токсин-содержащего секрета сферической или каплеобразной формы (рис. 4 Б). В экспериментальных образцах немертин, подвергаемых стимуляции электрическим током, большое количество ТТХ-позитивных гранул обнаруживали в шейках субэпидермальных желез в эпидермисе (рис. 13 В, В1). На поверхности эпидермиса присутствовало множество скоплений ТТХ-позитивного секрета (рис. 13 Г).

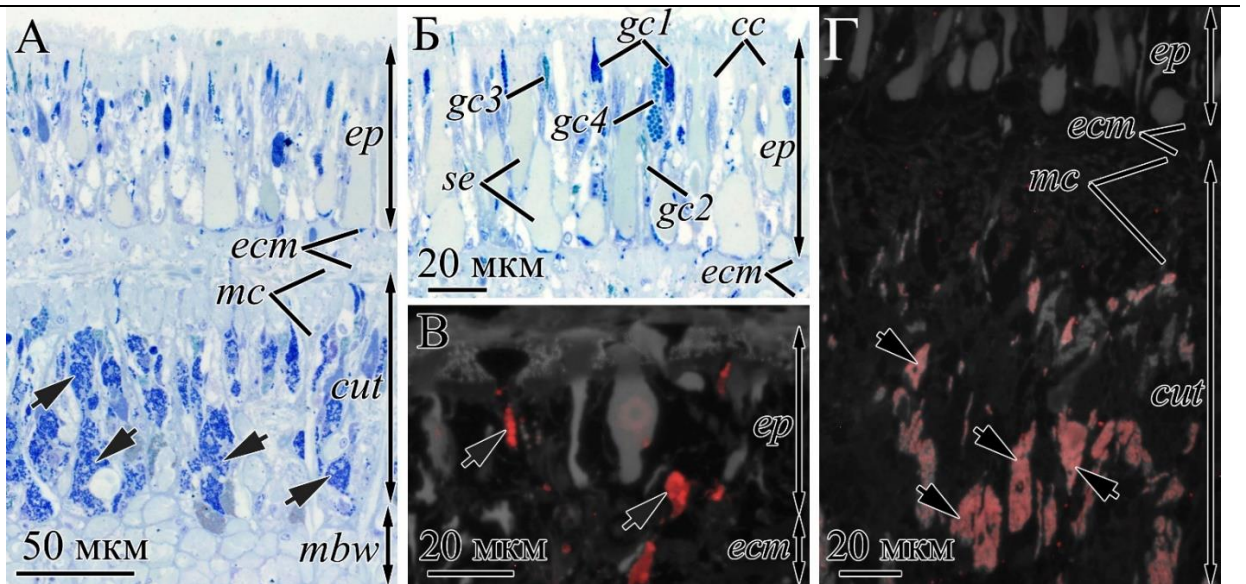


Рисунок 12 – Световые (А, Б) и иммунофлюоресцентные (В, Г) микрофотографии поперечных срезов покровов *Kulikovia alborostrata*. Красный цвет обозначает ТТХ-положительную реакцию при маркировании антителами против ТТХ. (А) Панорамный вид интегумента. (Б) Панорамный вид эпидермиса. (В) ТТХ-положительные цитоплазматические отростки железистых клеток кутиса gc4 (стрелки). (Г) Покровный эпителий прецеребральной области с ТТХ-положительными клетками, телами железистых клеток кутиса gc1 (стрелки). Буквенные обозначения: cc — ресничные клетки; cut, кутис; ect, экстрацеллюлярный матрикс; ep, эпидермис; gc1 – gc4 – железистые клетки кожи 1–4 типов; mbw, мускулатура стенки тела; mc – мускулатура кутиса; se – серозная клетка.

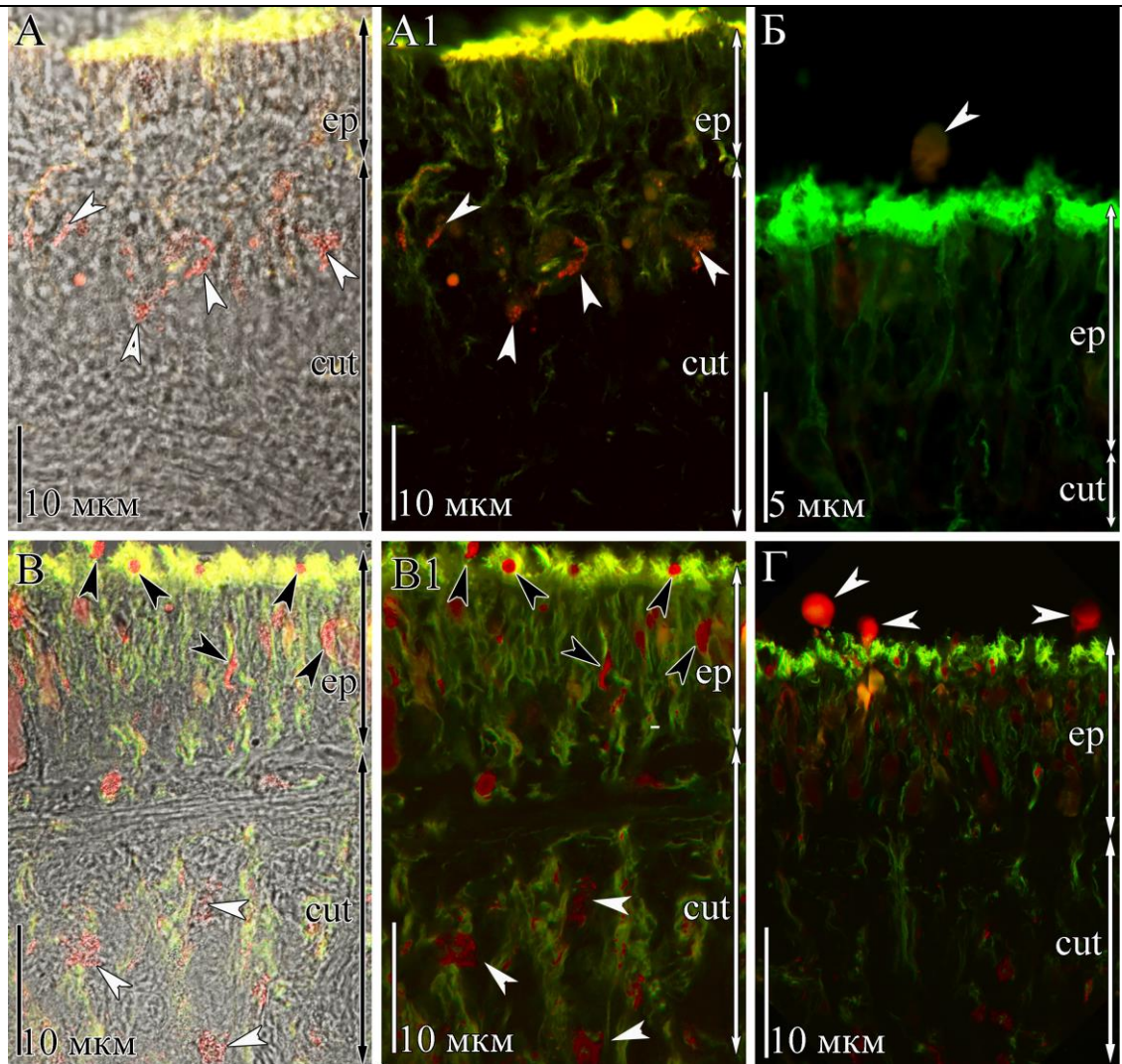


Рисунок 13 – Микрофотографии поперечных срезов стенки тела интактных (А, А1, Б) и подвергнутых стимуляции электрическим током (В, В1, Г) особей *Kulikovia alborostrata*, полученные методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ). Микрофотографии А, В получены с использованием проходящего света. Красный цвет обозначает ТТХ-позитивную реакцию, зеленый – окрашивание на тубулин. А, А1 – ТТХ-позитивные субэпидермальные железистые клетки (стрелки) в кутисе. Б – ТТХ-положительная секреторная гранула на поверхности эпидермиса (стрелка). В, В1 – ТТХ-позитивные субэпидермальные железистые клетки (белые стрелки) в кутисе. ТТХ-позитивные протоки железистых клеток в эпидермисе (черные стрелки). Г – ТТХ-положительная секреторная гранула на поверхности эпидермиса (стрелки). Буквенные обозначения: *cut*, кутис; *ep*, эпидермис.

3.3.3 ТТХ-содержащие структуры хобота

Хобот *K. alborostrata* состоит из эндотелия, трех мышечных слоев и секреторного эпителия. Секреторный эпителий хобота состоит из железистых, опорных и сенсорных клеток. Среди железистых клеток выделяют пять типов (gp1–gp5).

Первый клеточный тип эпителия хобота (gp1) содержал псевдокниды, представленные в виде палочкообразных гранул диаметром около 0,7 мкм и длиной до 7 мкм (рис. 14 А, Б). При окрашивании метиленовым синим псевдокниды приобретали голубой цвет. Рядом с псевдокнид-содержащими клетками располагались железистые клетки второго типа (gp2), содержащие гранулы бациллярной формы диаметром около 2 мкм и длиной до 6 мкм с гомогенным содержимым (рис. 14 А). Этот клеточный тип окрашивался метиленовым синим в темно-фиолетовый или светло-розовый цвет. Третий тип железистых клеток эпителия хобота (gp3) содержал гранулы округлой формы диаметром около 1,5 мкм с гомогенным содержимым (рис. 14 А). При окрашивании метиленовым синим этот клеточный тип окрашивался в голубой цвет. Четвертый тип железистых клеток эпителия хобота (gp4) содержал крупные сферические гранулы диаметром около 0,6 мкм с гомогенным содержимым (рис. 14 Б). При окрашивании метиленовым синим цвет гранул варьировал от фиолетового до голубого. Пятый тип железистых клеток эпителия хобота (gp5) содержал небольшие гранулы округлой формы диаметром 2 мкм с гетерогенным содержимым (рис. 14 А). Секреторные гранулы этого типа при окрашивании метиленовым синим приобретали голубой цвет на периферии гранул и синий цвет в центре.

Иммуногистохимические исследования показали интенсивное мечение ТТХ в секреторных гранулах gp4 (рис. 14 В), являющихся малопредставленными, и занимающих $3,7 \pm 1,3\%$ от площади секреторного эпителия (табл. 6). Слабую ТТХ-позитивную метку имеют эндотелий и мускулатура хобота.

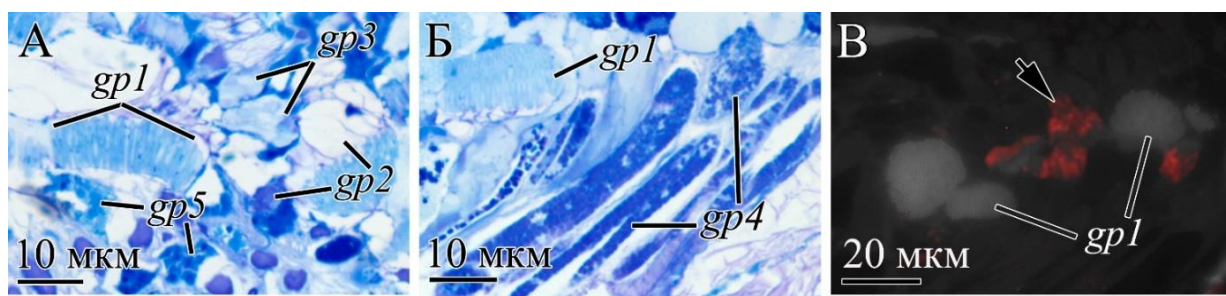


Рисунок 14 – Световые (А, Б) и иммунофлуоресцентная (В) микрофотографии поперечных срезов хобота *Kulikovia alborostrata*. Красный цвет обозначает ТТХ-положительную реакцию при маркировании антителами против ТТХ. (А, Б) Проксимальная область секреторного эпителия хобота. (В) Секреторный эпителий гребня хобота с ТТХ-положительными железистыми клетками gp4 (стрелка). Буквенные обозначения: gp1–gp5, железистые клетки хобота 1–5 типов.

3.4 Эксперимент по изучению изменения содержания ТТХ и его производных методом ВЭЖХ–МС/МС в теле и слизи *K. alborostrata* в условиях длительного содержания без доступа пищи

Был проведен анализ изменения концентрации токсинов ряда ТТХ в секрете 17 особей, вырабатываемом в ответ на раздражение при повторяющихся через короткие промежутки времени стимуляции, а также после длительного содержания немертин без доступа пищи (рис. 6). Содержание ТТХ и его производных в секрете и теле немертин *K. alborostrata* было исследовано методом ВЭЖХ-МС/МС. В результате в образцах обоих типов было обнаружено два токсина – ТТХ и 5,6,11-тридеоксиТТХ (рис. 15).

Для полного изъятия выделяемых токсинов из кожных покровов производили трехкратную стимуляцию животных с забором секрета – одна стимуляция в 1 сут. В 1 сут из 17 особей ТТХ и 5,6,11-тридеоксиТТХ были обнаружены в секрете 6 особей, на 2 сут – у 13 особей, а на 3 сут – у четырех; при этом, концентрации ТТХ в исследованных образцах в 1 и 3 сут не превышали LoQ, который составлял 0,6 нг/мл образца, на 2 сут концентрация ТТХ превышала

LoQ только у трех особей и составляла $0,07 \pm 0,18$ нг/г (табл. 7). Количество немертин с концентрацией 5,6,11-тридеоксиТТХ выше LoQ увеличивалось на 2 сут стимуляции и падала на 3 сут, при этом, средняя концентрация этого токсина составляла $0,13 \pm 0,32$, $0,77 \pm 1,33$ и $0,08 \pm 0,22$ нг/г на 1, 2 и 3 сут соответственно (табл. 7). Немертин содержали 30 сут без доступа пищи, после чего измерение концентраций ТТХ и его производных в секрете показало возрастание количества особей, экскретирующих токсины, при этом, только у одной особи концентрация ТТХ превышала LoQ. В 6 образцах концентрация 5,6,11-тридеоксиТТХ не превышала LoQ, среднее значение концентраций для всех особей составляло $0,16 \pm 0,20$ нг/г. Еще через 6 мес все 17 особей из эксперимента показали присутствие ТТХ в экстретируемой слизи, концентрация выше LOQ была только у одной особи; 5,6,11-тридеоксиТТХ не был обнаружен. После взятия секрета в последней точке (7 мес) тела всех исследуемых особей были проанализированы на наличие токсинов. Было выявлено, что экстракты тел исследуемых немертин содержали только ТТХ; у 11 особей концентрация токсина не превышала значения LOQ, у 6 особей концентрация токсина составляла от 0,22 до 0,85 нг/г.

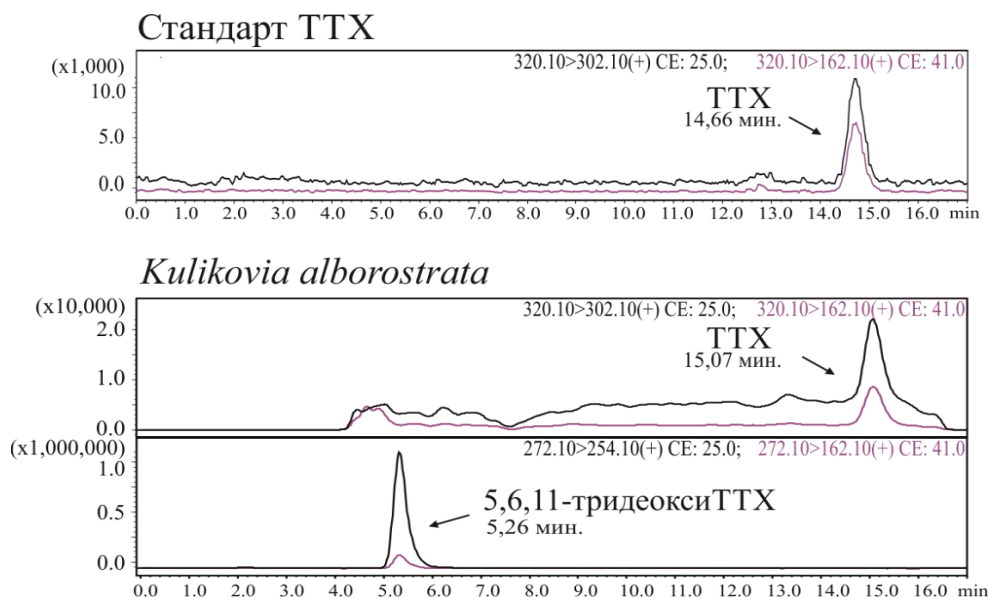


Рисунок 15 – Хроматограммы экстрактов *Kulikovia alborostrata*, полученные методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией.

Особь, показавшие наличие ТТХ, со слизью суммарно за все 7 мес экскретировали $32,71 \pm 44,10\%$ от общего количества содержащегося в черве ТТХ; в случае 5,6,11-тридеоксиТТХ, все содержащие его особи выпускали с секретом 100% токсина уже при стимуляции на 30 сут.

Таблица 7 – Концентрации тетродотоксина (ТТХ) и 5,6,11-тридеоксиТТХ в экстрактах секрета и тела *Kulikovia alborostrata*.

Образец, №	Токсины, нг/г													
	1 сут		2 сут		3 сут		30 сут		7 мес		Тело		Сумма	
	ТТХ	5,6,11-тридеоксиТТХ	ТТХ	5,6,11-тридеоксиТТХ	ТТХ	5,6,11-тридеоксиТТХ	ТТХ	5,6,11-тридеокситх	ТТХ	5,6,11-тридеокситх	ТТХ	5,6,11-тридеокситх	ТТХ	5,6,11-тридеокситх
1	+	1,25	0,63	3,52	-	-	+	-	+	-	+	-	0,63	4,77
2	+	0,15	0,21	1,83	-	-	+	+	+	-	+	-	0,21	1,98
3	+	0,44	+	0,30	-	-	-	+	+	-	+	-	+	0,74
4	-	-	0,41	4,55	-	-	0,22	-	+	-	0,85	-	1,48	4,55
5	+	-	+	0,18	-	-	-	0,15	+	-	0,22	-	0,22	0,32
6	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	0,62	-	0,62	+
7	+	-	+	0,89	-	-	-	0,46	+	-	+	-	+	1,35
8	-	-	+	0,48	+	-	-	0,26	+	-	+	-	+	0,74
9	-	-	+	-	-	-	-	+	0,12	-	0,51	-	0,64	+
10	-	-	-	0,48	-	-	+	0,28	+	-	+	-	+	0,76
11	-	-	+	-	-	-	-	0,27	+	-	0,47	-	0,47	0,27
12	-	-	+	0,44	-	0,15	+	0,29	+	-	0,23	-	0,23	0,88

13	-	0,42	-	-	-	0,34	+	0,41	+	-	+	-	+	1,16
14	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
15	-	-	-	-	+	0,84	+	0,62	+	-	+	-	+	1,46
16	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
17	-	-	+	0,42	-	-	-	+	+	-	+	-	+	0,42

Примечание: «-» – концентрация ниже LoD, «+» – концентрация ниже LoQ.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Содержание ТТХ и его производных у особей *K. alborostrata*

Оценка вариации содержания ТТХ и его производных на 36 особях *K. alborostrata* методом ВЭЖХ-МС/МС показала различия суммарной концентрации токсинов между особями на 1–2 порядка (Vlasenko, Magarlamov, 2023). Высокая степень различия концентраций токсинов ряда ТТХ между особями, принадлежащих к одному виду, характерна для многих ТТХ-содержащих типов животных. Так, у самых знаменитых обладателей токсинов этого ряда, рыб фугу (семейство Tetraodontidae), был показан большой разброс в их содержании – токсичность одних и тех же органов рыб вида *L. lunaris*, включая наиболее токсичные органы – яичники и печень – варьирует как внутри популяции, так и между популяциями, обитающих в разных регионах. Яичники особей, выловленных у берегов Таиланда, проявляли токсичность, эквивалентную 4,12 мкг ТТХ/г тела (Chulanetra et al., 2011), Японии – 5,16–322,18 мкг ТТХ/г тела (Nagashima et al., 2011), Камбоджи – < 0,36–42,36 мкг ТТХ/г тела (Ngy et al., 2008). Токсичность печени этих же особей была эквивалентна 0,74, 0,89–60,7 и <0,36–45,75 мкг ТТХ/г тела соответственно. Широкий диапазон концентрации ТТХ и его производных для представителей одного вида также был выявлен у тритонов: в коже особей *T. granulosa* из популяций, обитающих в США, штате Орегон, средняя концентрация токсинов ряда ТТХ составляла 1,02–1,99 мг/г кожи, в штате Вашингтон – 0,01–0,41 мг/г кожи (Hanifin et al., 1999). Вероятно, причина неоднородности содержания токсинов у исследованных видов, в том числе и исследованной нами *K. alborostrata*, может крыться в экологических аспектах жизнедеятельности животных.

4.2 Поступление ТТХ и его производных в тело *K. alborostrata*

В контексте исследований экологических аспектов, влияющих на аккумуляцию токсинов ряда ТТХ в животных, важной характеристикой является

качественный состав содержащихся в них токсинов. Так как превращения токсинов ряда ТТХ с образованием их производных невозможны (за исключением обратимых превращений ТТХ в 4-эпиТТХ и 4,9-ангидроТТХ) в многоклеточных организмах (Kono et al., 2008b), соотношение содержащихся у них токсинов может зависеть от качественного состава токсинов в их источниках. Подтверждением может служить схожесть профиля токсинов ряда ТТХ у животных одного вида, обитающих в одном ареале, что объясняется одинаковым для них рационом и/или спектром бактерий, характерных для местности. Так, изучение состава ТТХ и его производных рыбы фугу *Arothron nigropunctatus* из Окинавы (Японии) и Соломоновых островов показало сходство профилей токсинов ряда ТТХ между особями, собранными в одной местности: в образцах из Окинавы превалировал 4,9-ангидро-5,6,11-тридеоксиТТХ, за которым следовали 5,6,11-тридеоксиТТХ и ТТХ, а в образцах с Соломоновых островов самым представленным был ТТХ, за которым следовали 4,9-ангидроТТХ и 5,6,11-тридеоксиТТХ (Puilingi et al., 2015). У особей рыб фугу *L. sceleratus*, собранных у берегов Северного Ливана, доля 4,9-ангидроТТХ, преобладающего токсина в мышцах и коже, составляла $92,46 \pm 0,14$ и $96,37 \pm 0,33\%$ соответственно ($n = 3$) (Hassoun et al., 2022). При этом, особи этого же вида, выловленные у побережья Греции, содержали восемь производных ТТХ, наибольшая доля приходилась на 5,6,11-тридеоксиТТХ ($54,69 \pm 44,77\%$ в мышцах и $58,42 \pm 46,03\%$ в коже) ($n=6$) (Rodríguez et al., 2012). Сходства в содержании производных ТТХ в рамках популяции также наблюдали у краснопятнистого тритона *Notophthalmus viridescens*: у особей из штатов Пенсильвания, Вирджиния и Нью-Йорк основным токсином был ТТХ, а у особей из Нью-Гемпшира, США, основным токсином был 6-эпиТТХ (Yotsu-Yamashita et al., 2012). В пользу предположения о влиянии экологических особенностей обитания на спектр токсинов ряда ТТХ может говорить специфичность большей части токсинов этого ряда для наземных и морских животных – из более чем 35 известных токсинов ряда ТТХ общими для этих типов животных являются только 12 токсинов, остальные токсины обнаруживаются отдельно или в морских, или в наземных

животных. Так, содержание 6-эпиТТХ было достоверно показано только у тритонов (Yotsu-Yamashita et al., 2012; Sato et al., 2021) и лягушек (Pires et al., 2005). Еще один случай строгой специфичности токсинов был обнаружен при исследовании жаб, показавших содержание другого производного ТТХ – чирикитоксина, не обнаруженного у других животных (Yotsu-Yamashita et al., 2010). Также у морских организмов был выделен ряд производных ТТХ, ни одно из которых не было выявлено у наземных организмов, включая 5,6,11-тридеоксиТТХ (Ueyama et al., 2018). В настоящем исследовании показано, что у 36 особей *K. alborostrata* наиболее представленным токсином являлся 5,6,11-тридеоксиТТХ ($68,19 \pm 34,84\%$), на втором месте – ТТХ ($15,42 \pm 26,17\%$), вне зависимости от количества выявляемых производных, суммарно на эти два токсина приходилось $83,61 \pm 27,26\%$; третье место по занимаемой доле делили 11-норТТХ-6(S)-ол и 5-деоксиТТХ ($8,59 \pm 13,71$ и $8,85 \pm 11,38\%$ соответственно) (рис. 16) (Vlasenko, Magarlamov, 2023). Низкая вариабельность состава основных токсинов может быть результатом общего источника ТТХ и его производных у немертин этого вида, включая их собственные микробиомы и/или диетические предпочтения.

Согласно общепринятому мнению, источником ТТХ и его производных в накапливающих их организмах могут быть как ТТХ-синтезирующие бактерии, так и объекты питания, содержащие токсин (Noguchi et al., 2006a). В пользу первого предположения может говорить тот факт, что бактерии-продуценты ТТХ были выделены из ряда ТТХ-содержащих организмов: рыб фугу, осьминогов, морских звезд, мечехвостов, брюхоногих и двустворчатых моллюсков (Magarlamov et al., 2017). Также ранее сообщалось об обнаружении продуцентов ТТХ у ряда видов немертин (Carroll et al., 2003), включая *C. simula*, собранного у берегов Приморского края (Magarlamov et al., 2014; Melnikova et al., 2019). Тем не менее, отмечается, что количество токсинов ряда ТТХ, обнаруженные в бактериальной культуре продуцентов, кажутся слишком низкими, чтобы объяснить относительно большие количества токсинов, обнаруживаемые в животных-хозяевах (Lago et al., 2015).

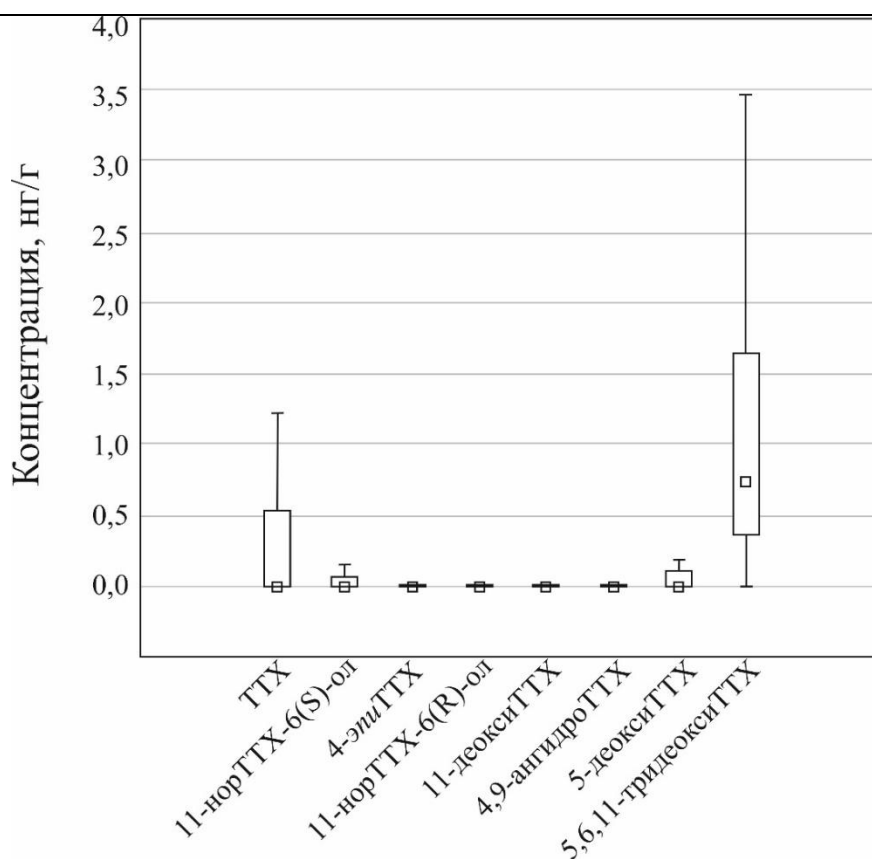


Рисунок 16 – Диаграмма размаха, представляющая медианные концентрации ТТХ и его производных *Kulikovia alborostrata* ($n = 36$). Нижняя и верхняя границы прямоугольника обозначают 25 и 75 процентиля соответственно; нижние и верхние отрезки отражают изменчивость вне этих процентилей; знак квадрата обозначает медианное значение.

Вторым распространенным предположением относительно источника токсинов ряда ТТХ в животных является их получение с объектами питания. Одним из подтверждений возможности аккумуляции токсинов по трофическим цепям являются исследования соотношения производных токсинов в некоторых хищниках и их предполагаемых жертвах. Так, в исследовании Ито и соавторов было выявлено, что на соотношение ТТХ и 5,6,11-тридеоксиТТХ в рыбе фугу *Chelonodon patoca* и ядовитом бычке *Yongeichthys criniger* оказывало влияние соотношение этих токсинов в их потенциальной добыче – плоском черве *Planocera multitentaculata* (Ito et al., 2022). Также было описано кормление осьминогов *Octopus vulgaris* моллюсками, содержащими паралитические токсины моллюсков (paralytic shellfish toxins (PSTs)), еще одну группу низкомолекулярных

гуанидиновых токсинов, после чего в осьминогах преобладали те же токсины, что и в жертвах (Lopes et al., 2014). Дополнительным подтверждением поступления токсинов ряда ТТХ в организм накапливающих их животных с пищей служат результаты экспериментов по кормлению животных ТТХ-содержащими объектами. Так, в работе Ногучи с соавторами (Noguchi et al., 2004, 2006b) показано, что рыбы фугу без доступа токсичной пищи становились нетоксичными; при этом, нетоксичные рыбы фугу начинали накапливать токсин после перехода на ТТХ-содержащую диету (Matsui et al., 1981; Yamamori et al., 2004; Honda et al., 2005; Kono et al., 2008a). Результаты работы указывают на поступление токсинов ряда ТТХ в тело рыб фугу посредством трофических путей. Дальнейшее перемещение ТТХ было изучено методом иммуногистохимии; было предположено, что ТТХ захватывается энтероцитами, переносится через базальную мембрану и накапливается в мышечном слое кишечника (Gao et al., 2020).

Приведенные исследования описывают возможные пути накопления для отдельных видов животных, но не позволяют экстраполировать данные на все ТТХ-аккумулирующие виды. Для того, чтобы выявить источник токсинов для *K. alborostrata*, проводился эксперимент, заключающийся в длительном содержании немертин в условиях отсутствия питания, в ходе которого проводились стимуляции секреции слизи, приводящие к выбросу ТТХ и его производных. В результате эксперимента нами было показано, что 5,6,11-тридеоксиТТХ после контрольной стимуляции (три стимуляции с перерывом в 1 сут) за 30 сут полностью мигрировал из стенки тела в секреторирующие клетки и утрачивался с выбросом секрета, о чем говорит тот факт, что через 7 мес после начала эксперимента он не был обнаружен ни в секрете, ни в теле (Vlasenko et al., 2021). Поскольку ранее была показана невозможность протекания внутриорганизменных реакций конверсии токсинов ряда ТТХ (Kono et al., 2008b), это является аргументом в пользу версии их поступления в тело немертин из внешних источников. Окончательное подтверждение было получено путем

изучения пищеварительной системы немуртин *K. alborostrata* с помощью метода КЛСМ, показавшим ТТХ-положительные гранулы в кишечном эпителии (рис. 11 А). При помощи иммуноэлектронной микроскопии было показано, что токсины ряда ТТХ локализовались в фагосомах энтероцитов, в которых не было обнаружено остатков бактерий, что подтверждает получение токсинов от объектов питания (рис. 11 Б). Потенциальные жертвы немуртин, в свою очередь, предположительно, получают ТТХ и его производные с пищей или от симбиотических бактерий-продуцентов токсинов ряда ТТХ. Обобщенная схема предположительного пути аккумуляции ТТХ и его производных в теле *K. alborostrata* представлена на рисунке 17.

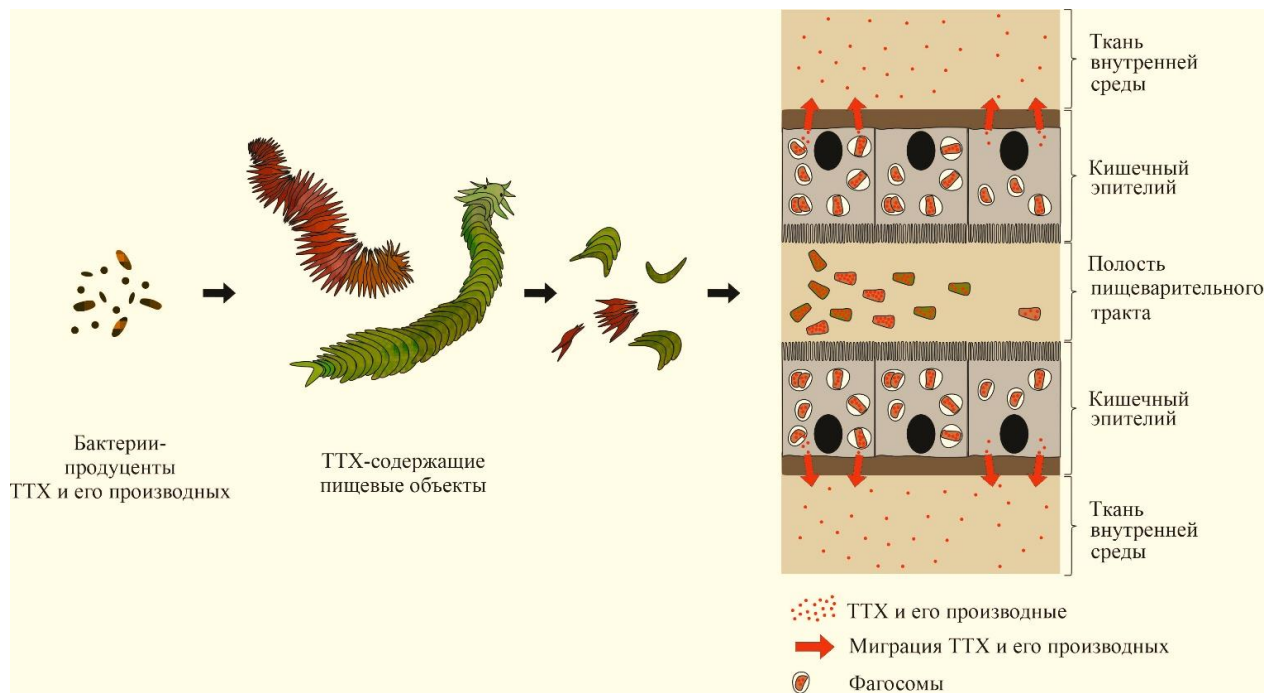


Рисунок 17 – Схема поступления ТТХ и его производных от пищевых объектов в тело *Kulikovia alborostrata* посредством фагоцитарной активности энтероцитов.

Дальнейшее распространение ТТХ и его производных по телу немуртин в железистые клетки как эпителия, так и эндотелия, вероятно, говорит о содержании к этим клеткам компонента, специфично связывающего токсины этого ряда, а также о наличии специфического механизма переноса ТТХ и его производных. Существование такого механизма переноса токсинов было показано

на токсичных и условно токсичных рыбах фугу в эксперименте *in vitro* путем инкубирования срезов тканей печени рыб в растворе ТТХ (Matsumoto et al., 2007; Nagashima et al., 2018). Было выявлено, что ТТХ переносится через клеточную мембрану клеток печени рыб фугу с помощью системы активного натрий-зависимого транспорта веществ (Matsumoto et al., 2007). У некоторых ТТХ-содержащих животных были обнаружены белки-переносчики, специфически связывающие токсины ряда ТТХ и доставляющие их в органы-мишени (Yotsu-Yamashita et al., 2001; Hwang et al., 2007; Lin et al., 2015). Кроме того, показано, что белок рыбы фугу, связывающий сакситоксин и ТТХ (Pufferfish Saxitoxin and Tetrodotoxin Binding Protein (PSTBP)), имеет разную степень связывания различных токсинов ряда ТТХ и имеет сродство к 5,6,11-тридеоксиТТХ, являющемуся одним из наиболее представленных у исследованных здесь *K. alborostrata*, выше по сравнению с другими протестированными производными (Yotsu-Yamashita et al., 2018).

4.3 Распределение ТТХ и его производных в клетках и тканях

K. alborostrata

Исследование локализации ТТХ и его производных в разных участках тела *K. alborostrata* с использованием микроскопии и хроматографического анализа продемонстрировало неравномерное распределение токсинов в организме (рис. 18). Была выявлена высокая концентрация 5,6,11-тридеоксиТТХ в прецеребральной и ротовой областях *K. alborostrata*, что, вероятно, может быть связано с неравномерным распределением ТТХ-положительных клеток gc1: несмотря на то, что этот клеточный тип являлся преобладающим клеточным типом в кожных покровах *K. alborostrata* и был распределен равномерно на протяжении всего тела, его ТТХ-положительное окрашивание наблюдалось только в ротовой и прецеребральной области (Vlasenko et al., 2024). Интересно, что *K. manchenkoi*, близкородственный с *K. alborostrata* вид, имел отличное распределение токсинов ряда ТТХ в теле: согласно ВЭЖХ-МС/МС, концентрация токсинов в прецеребральном и ротовом регионе была приблизительно одинакова,

но возрастала от ротового региона к заднему региону тела (Vlasenko et al., 2024). Различия в распределении токсинов в теле согласуются с данными локализации, полученными методом иммуногистохимии. Так, клетки gc1 не были ТТХ-положительными у *K. manchenkoi*, а в пищеварительной системе было обнаружено четыре ТТХ-положительных типа клеток – g5, g6, g8, g10. При этом, два из них, g8 и g10, проявляли наибольшую интенсивность при окрашивании антителами против ТТХ и располагались преимущественно в среднем и заднем регионах тела (Vlasenko et al., 2024), что, по всей видимости, и было причиной высокой концентрации токсинов ряда ТТХ в этих регионах.

В исследовании распределения ТТХ у *K. alborostrata* (= *L. alborostratus*), проведенном в 2016 году, указывалось, что единственными ТТХ-положительными клетками интегумента являлись бациллярные клетки I типа кутиса. В хоботе было обнаружено два типа ТТХ-положительных железистых клеток секреторного эпителия (обозначенные как слизистые и псевдокнид-содержащие клетки) (Magarlamov et al., 2016). В текущей работе ТТХ-положительная метка была обнаружена в этих же клетках интегумента, обозначенных по нововведенной номенклатуре как gc4 (Vlasenko et al., 2024). Дополнительно нами было обнаружено, что еще один тип клеток кутиса является ТТХ-положительным (gc1), что в работе 2016 года обнаружено не было. Также в настоящей работе в хоботе был описан один тип железистых ТТХ-положительных клеток (gp4), при этом, содержание ТТХ в псевдокнид-содержащих клетках хобота, описанное в 2016 году, не подтвердилось. Стоит отметить, что в работе 2016 года ТТХ в псевдокнид-содержащих клетках был обнаружен только при помощи метода электронной микроскопии, КЛСМ же метод не выявил содержания ТТХ (Magarlamov et al., 2016).

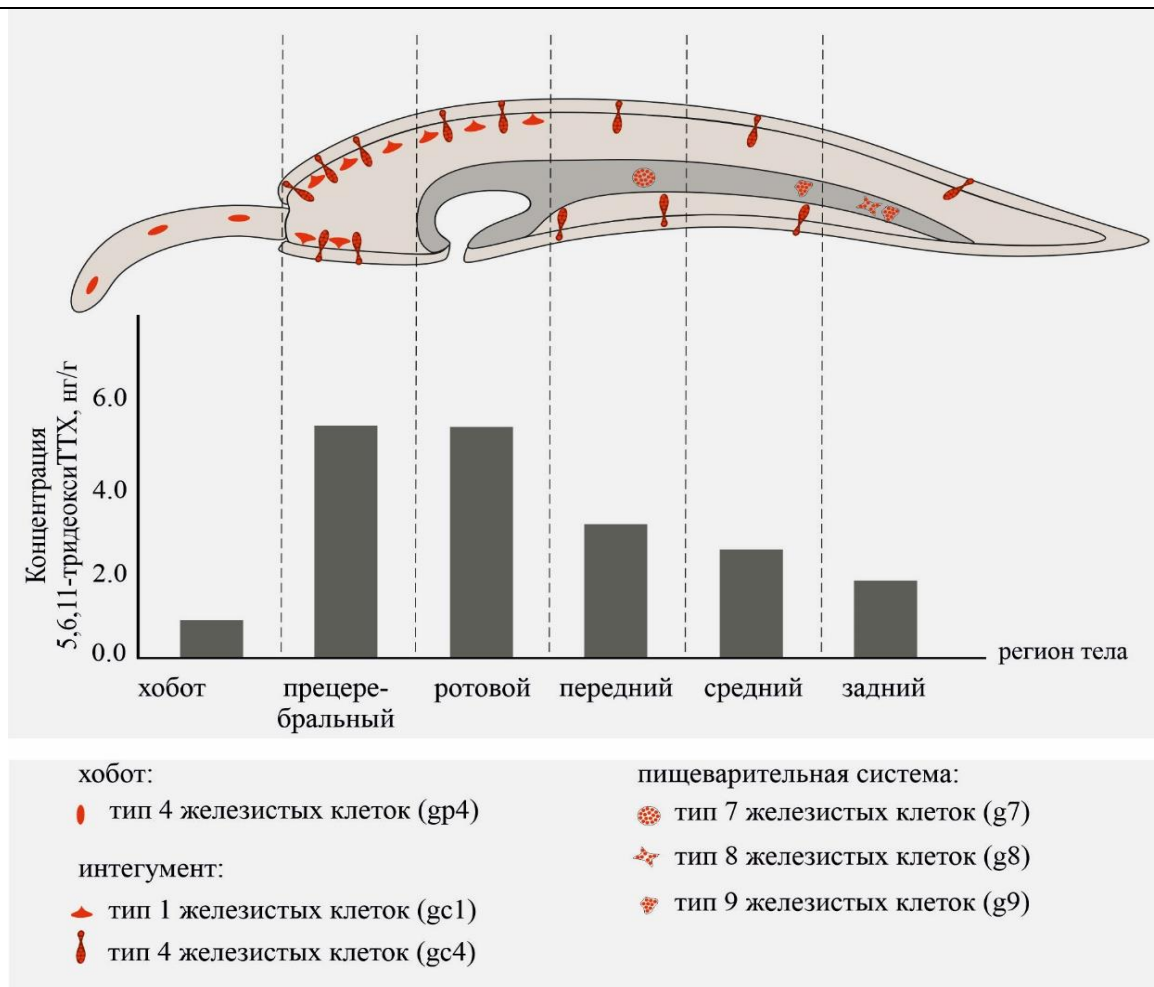


Рисунок 18 – Распределение 5,6,11-тридеоксиТТХ согласно данным ВЭЖХ-МС/МС в различных отделах тела *Kulikovia alborostrata*, а также локализация ТТХ-позитивных клеток, выявленных методом иммуногистохимического анализа.

Содержание токсинов ряда ТТХ в железистых клетках кишечника показано в настоящем исследовании впервые, железистые клетки пищеварительного тракта ранее не были выявлены у других ТТХ-содержащих организмов. В пищеварительной системе *K. alborostrata* выявлено три ТТХ-положительных типа железистых клеток, равномерно распределенных в эпителии кишечника переднего, среднего и заднего региона тела – g7, g8 и g9 (рис. 18) (Vlasenko et al., 2024). В исследовании *K. alborostrata* 2016 года иммуногистохимически был описан только регион «foregut», что соответствует переднему региону тела в нашем исследовании, поэтому, описываемые здесь ТТХ-позитивные железистые

клетки кишечника обнаружены не были (Magarlamov et al., 2016). Ранее единственным известным ТТХ-положительным типом клеток пищеварительной системы немертин были энтероциты, участвующие в захвате токсинов (Tanu et al., 2004; Campbell, Schwartz, 2008; Malykin et al., 2021). Стоит отметить, что железистые клетки (не ТТХ-положительные) в пищеварительной системе ранее были обнаружены только в районе буккальной полости, являющейся эктодермальным образованием (Malykin et al., 2024), наличие же железистых клеток в кишечнике (энтодермальной структуре) было показано впервые, что указывает на протекание процессов пищеварения на протяжении всего пищеварительного тракта, а не только в передних отделах, как считалось ранее.

4.4 Функционирование структур, содержащих ТТХ и его производные у *K. alborostrata*

В настоящей работе показано, что в орудии охоты немертин, хоботе, ТТХ-позитивные клетки расположены в «эпителиальном гребне» секреторного эпителия (рис. 14). При выворачивании хобота секреторный эпителий распределяется по его наружной поверхности, а клетки эпителиального гребня, в виде узкой полоски, распределяются вдоль, предположительно дорзальной стороны, хобота, что обеспечивает их контакт с добычей во время охоты. Таким образом, можно предположить, что ТТХ-позитивные железистые клетки хобота играют роль в иммобилизации жертвы. Существует несколько предположений относительно механизма доставки ТТХ и его производных в тело жертвы в процессе охоты. Согласно первому, внедрение токсина осуществляется с помощью псевдокнид – структур с внутренней полой нитевидной трубкой (сердцевиной) (Bürger, 1895; Martin, 1914; Gontcharoff, 1957; Nyman, 1959; Ling, 1971), которые, как полагают, проникают через покровы жертвы, выпуская токсин в ее тело (Jennings and Gibson, 1969; Bürger, 1895; Ling, 1971). Согласно второму предположению, проникновение ТТХ в ткани жертвы и его распространение обеспечивается действием на них ферментов и порообразующих токсинов

белковой природы, являющихся компонентами токсичной смеси, секретлируемой хоботом (Whitelaw et al., 2016).

Если токсины, локализующиеся в клетках хобота немертин, используются немертинами для нападения, то токсины интегумента, предположительно, выполняют оборонительную функцию. В текущем исследовании для того, чтобы смоделировать процесс реализации механизмов защиты у немертин, нами была проведена стимуляция особей электрическим током, после чего происходило обильное выделение вязкой слизи на поверхность их тела (Vlasenko et al., 2021). У *K. alborostrata* количество экскретируемых токсинов ряда ТТХ находилось в диапазоне от концентраций ниже LoQ до 5,45 нг/г, что в среднем соответствует $51,45 \pm 40,11\%$ от общей суммы содержащихся в особи токсинов (табл. 7). Изучение локализации токсинов ряда ТТХ в норме и после стимуляции у *K. alborostrata* показало, что в состоянии покоя секрет, окружающий немертину, содержит некоторое количество ТТХ и его производных, а при возникновении внешнего стимула происходит активный выход секрета из тел ТТХ-содержащих железистых клеток кутиса во внешнюю среду (рис. 19). На основании того, что иммуногистохимическое окрашивание у клеток *gs4* выявило окрашивание ТТХ в выводных протоках и папилле, а у *gs1* – только теле клеток, можно сделать вывод о том, что у ТТХ-содержащих немертин токсин-содержащие железистые клетки кутиса именно типа *gs4* экскретируют токсины ряда ТТХ непрерывно, формируя постоянный фон содержания компонентов секрета в слизи, но при этом, моментально реагируют на внешние стимулы, что приводит к целенаправленному выбросу секрета, и, как следствие, мгновенному возрастанию концентрации токсинов в окружающей немертину среде (рис. 19). В то же время несмотря на то, что *gs1* являются местами локализации ТТХ и его производных, экскреция токсинов для них не показана.

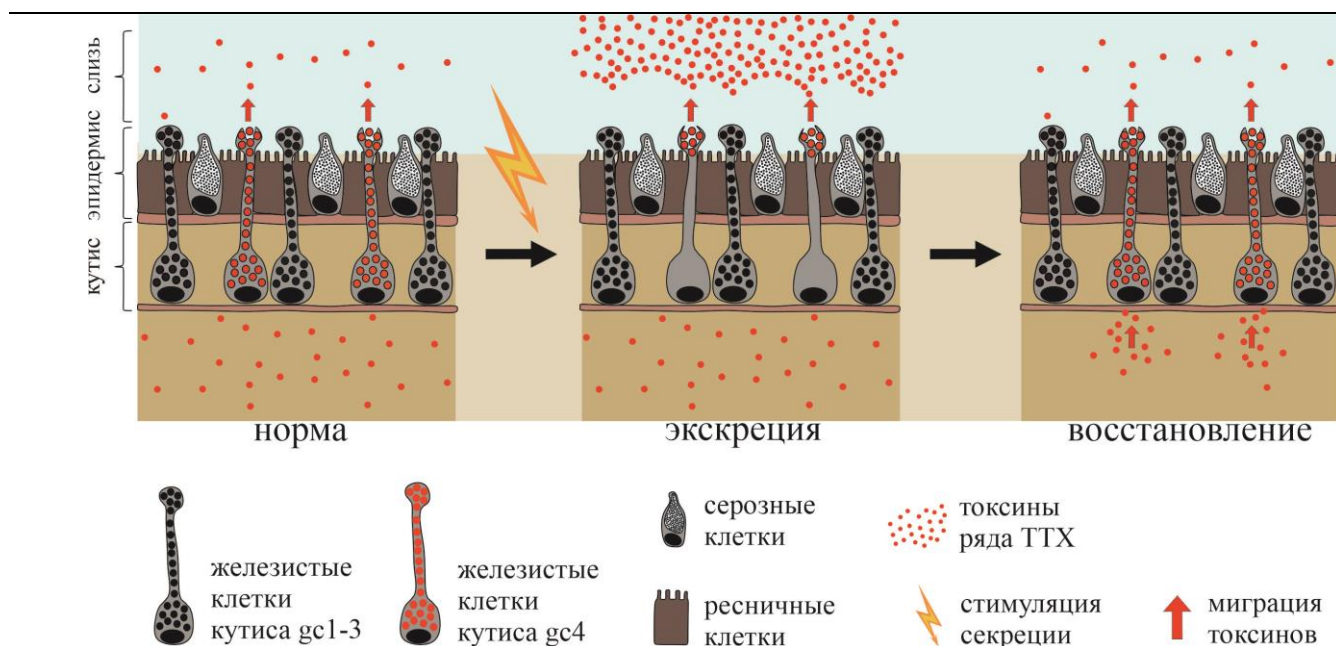


Рисунок 19 – Схематичное изображение экскреции тетродотоксина (ТТХ) и его производных из железистых клеток покровов немертин в норме и при стимуляции, и их последующего восстановления.

C. simula, для которого также была описана экскреция токсинов ряда ТТХ (Vlasenko, Magarlamov, 2020), имеет другой тип интегумента, для которого характерно эпителиальное расположение железистых клеток (Norenburg, 1985). Покровы *C. simula* представлены однослойным однорядным эпителием, лежащим на ЭЦМ, и включают один тип ресничных клеток и четыре типа железистых клеток (один тип серозных клеток и три типа гранулярных клеток). В работе Малыкина (Malykin et al., 2021) была продемонстрирована локализация ТТХ в серозных клетках и гранулярных клетках III типа эпидермиса, а также в мукоидных клетках головных желез. Головные железы – группа желез, расположенных в прецеребральной области тела немертины и открывающихся во внешнюю среду одним или несколькими протоками, через которые проходит секрет, формирующий внешний слизистый слой на поверхности покровов немертины (Чернышев, 2011; Malykin et al., 2021). Утверждается, что обнаруженные ТТХ-позитивные гранулярные клетки III типа эпидермиса и мукоидные клетки головной железы экскретируют токсины ряда ТТХ во внешнюю среду непрерывно; напротив, серозные клетки эпидермиса, являющиеся

наиболее распространенным типом эпидермальных желез *C. simula*, мгновенно экскретируют содержимое во внешнюю среду в условиях стресса (Norenburg, 1985), быстро повышая концентрацию токсинов в окружающей немертиную слизи (Malykin et al., 2021). Сравнение морфологии интегумента и локализации токсинов ряда ТТХ в клетках *C. simula* и *K. alborostrata* дает основание для предположения разных характеров процессов, приводящих к выбросу токсинов у обоих видов: принципиальная разница состоит в типах клеток, поддерживающих постоянный фон токсинов в слизи за счет непрерывной экскреции (у *C. simula* – железистые клетки эпидермиса и мукоидные клетки головной железы, у *K. alborostrata* – железистые клетки кутиса), и типах клеток, ответственных за «экстренный» выброс относительно больших количеств токсинов ряда ТТХ (у *C. simula* – серозные клетки, у *K. alborostrata* – те же железистые клетки кутиса, экскретирующие непрерывно, но переходящие в «экстренный» режим в результате стимуляции).

Существование механизма целенаправленного переноса и секреции токсинов должно поддерживаться процессом восстановления концентрации токсинов в секреторирующих структурах для повторной экскреции. При исследовании динамики содержания ТТХ и его производных в секреторирующих структурах *K. alborostrata* через анализ концентрации токсинов с помощью ВЭЖХ-МС/МС в слизи, было выявлено снижение концентрации токсинов к третьему дню стимуляций секреции. Таким образом, повторяющиеся через небольшие временные интервалы стимуляции ТТХ-содержащих животных приводят к быстрой потере токсинов ряда ТТХ в слизи, секреторируемой кожными железами. После этого, через 30 сут содержания немертин в отсутствии доступа пищи, ТТХ восстанавливался в секреторирующих структурах у 35% популяции, а еще через 6 мес – у 100%. При этом, анализ тела после последнего отбора секрета показал содержание ТТХ у исследуемых особей $67,29 \pm 44,10\%$ от суммы ТТХ в секрете и теле. Результат указывает на то, что местом хранения токсинов является стенка тела, откуда токсин переносится в секреторные гранулы железистых

клеток эпидермиса и выбрасывается вместе со слизью в окружающую среду в ответ на раздражение, что может являться механизмом защиты немертин от нападения хищников.

Одним из результатов настоящего исследования стало выявление в пищеварительной системе *K. alborostrata* ТТХ-позитивных железистых клеток, впервые обнаруженных и описанных здесь не только для немертин, но и для всех ТТХ-содержащих животных (Vlasenko et al., 2024). Роль токсинов ряда ТТХ в железистых клетках пищеварительной системы немертин, особенно заднего отдела, представляется неоднозначной, поскольку в литературных источниках нет информации о содержании токсинов в подобных клетках. Несколько исследований показали, что токсины ряда ТТХ могут помочь защитить животных от паразитарных инфекций, в том числе кишечных (Calhoun et al., 2017; Johnson et al., 2018). Подобный вывод в отношении немертин можно будет сделать только после проведения ряда исследований. В работе 2024 года впервые была рассмотрена взаимосвязь количества ТТХ, поступающего в организм с пищей, со структурой бактериального сообщества кишечника животных в условиях разных значений солености окружающей среды на примере ювенильных особей *T. rubripes*. Выявлено, что поглощение ТТХ с пищей может формировать микробиоту кишечника и способствовать ее изменению для противостояния стрессовым условиям (Wassel et al., 2024). Результат описанного исследования наводит на мысль о возможной связи токсинов ряда ТТХ в железистых клетках пищеварительной системы немертин, обнаруженных в проведенном нами исследовании, с их микробиомом. Тем не менее, для достоверного выявления функции секретируемых в кишечник токсинов у немертин требует проведения множественных экспериментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были изучены поступление, аккумуляция и экскреция ТТХ и его производных у низкотоксичной немертины *K. alborostrata* и установлена организация структур, обеспечивающих протекание перечисленных процессов.

Оценка вариации содержания ТТХ и его производных на 36 особях *K. alborostrata* методом ВЭЖХ-МС/МС показала различия суммарной концентрации токсинов между особями на 1–2 порядка. Выявлено сходство качественного состава ТТХ и его производных для всех особей, что может свидетельствовать о едином источнике токсинов. В ходе эксперимента по длительному содержанию немертин *K. alborostrata* в условиях отсутствия питания было показано, что один из токсинов ряда ТТХ за 30 сут полностью мигрировал из стенки тела в секреторирующие клетки и утрачивался с выбросом секрета, что является подтверждением их поступления в тело немертин с объектами питания. Выдвинутое предположение было подтверждено обнаружением ТТХ-положительной метки в фагосомах энтероцитов кишечного эпителия *K. alborostrata*. Установлено, что концентрация токсинов является наибольшей в прецеребральном и ротовом отделе тела *K. alborostrata*, где клетки кутиса gc1 имеют ТТХ-позитивную реакцию. Впервые выявлена ТТХ-положительная реакция в железистых клетках пищеварительной системы животных. Изучены локализация и концентрация токсинов ряда ТТХ в слизи во время ее выброса в ответ на раздражение покровов тела. Сделан вывод о том, что у ТТХ-содержащих немертин токсин-содержащие железы реагируют на внешние стимулы путем выброса ТТХ-содержащего секрета из железистых клеток кожных покровов.

Полученные в ходе работы результаты являются первыми данными о путях миграции ТТХ и его производных в теле немертин от поступления до выделения во внешнюю среду. Получены данные о функционировании токсин-содержащих структур, предположена физиологическая роль токсинов у немертин. Результаты работы расширяют знания о накоплении, аккумуляции и функциях ТТХ и его

производных у немуртин как одного из участников цепи передачи токсинов ряда ТТХ в биосистеме.

ВЫВОДЫ

1. Впервые для представителей типа немертин в кишечнике *K. alborostrata* обнаружены ТТХ-позитивные железистые клетки; из 9 описанных типов железистых клеток пищеварительного тракта, три типа клеток (g7, g8, g9) содержат ТТХ-иммунопозитивные секреторные гранулы. В кожных покровах было идентифицировано 4 типа железистых клеток, ТТХ-положительными являлись gc1 и gc4. В хоботе было выделено пять типов железистых клеток, мечение ТТХ было обнаружено в клетках gp4.
2. Концентрация токсинов ряда ТТХ в теле немертины *K. alborostrata* имеет отчетливый росто-каудальный градиент; наибольшая концентрация токсинов ряда ТТХ и высокая плотность ТТХ-позитивных gc1 клеток кутиса локализована в прецеребральном и ротовом отделах тела. Плотность ТТХ-позитивных клеток постепенно убывает к заднему отделу тела, где расположены малопредставленные клетки кутиса gc4 и клетки кишечника g7, g8 и g9.
3. Локализация токсинов ряда ТТХ в фагосомах энтероцитов и их утрата в ходе длительного голодания свидетельствует о поступлении токсинов в тело немертин с пищей и об отсутствии механизмов эндогенного синтеза токсинов. Сходство качественного состава ТТХ и его производных между особями *K. alborostrata* свидетельствует о едином для них источнике токсинов.
4. Фоновое содержание токсинов ряда ТТХ в слизи обеспечивается их экскрецией клетками кутиса gc4, электростимуляция активирует выход секрета из тел клеток и нарастание концентрации токсина в слизи. Восстановление уровня токсина в покровных структурах обеспечивается его транспортом из более глубоко расположенных тканей организма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чернышев А.В. Сравнительная морфология, систематика и филогения немертин. Владивосток: Дальнаука, 2011. С.132–133.
2. Abal P., Louzao M.C., Antelo A., Alvarez M., Cagide E., Vilariño N., Vieytes M. R., Botana L. 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.
3. Akyol O., Ünal V., Ceyhan T. Occurrence of two Lessepsian migrant fish, *Oxyurichthys petersi* (Gobiidae) and *Upeneus pori* (Mullidae), from the Aegean Sea // *Cybius: International Journal of Ichthyology*. 2006. Vol. 30, № 4. P. 389-390.
4. 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. DOI: 10.1016/0041-0101(90)90147-y.
5. Anadón, N. Aportaciones a la estructura y ultraestructura de los heteronemertinos // *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Biológica)*. 1974. Vol. 72. P. 75–100.
6. 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. DOI: 10.1016/s0041-0101(99)00172-5.
7. 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. DOI: 10.3390/toxins5020376.
8. 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.

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

10. 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.

11. Bentur Y., Ashkar J., Lurie Y., Levy Y., Azzam Z. S., Litmanovich M., Golik M., Gurevych B., Golani D., Eisenman A. Lessepsian migration and tetrodotoxin poisoning due to *Lagocephalus sceleratus* in the eastern Mediterranean // *Toxicon*. 2008. Vol. 52, № 8. P. 964–968. DOI: 10.1016/j.toxicon.2008.10.001.

12. Berg G. Studies on *Nipponnemertes* Friedrich (Nemertini, Hoplonemertini) // *Zoologica Scripta*. 1972. Vol. 1. P. 211–225.

13. 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: 10.3390/toxins10070282.

14. Bordin P., Dall'Ara S., Tartaglione L., Antonelli P., Calfapietra A., Varriale F., Guiatti D., Milandri A., Dell'Aversano C., Arcangeli G., Barco L. First occurrence of tetrodotoxins in bivalve mollusks from Northern Adriatic Sea (Italy) // *Food Control*. 2021. Vol. 120. Article No. 107510. DOI: 10.1016/j.foodcont.2020.107510.

15. Brodie E.D.Jr., Hensel J.L.J., Johnson J.A. Toxicity of the urodele amphibians *Taricha*, *Notophthalmus*, *Cynops* and *Paramesotriton* (Salamandridae) // *Copeia*. 1974. Vol. 1974, № 2. P. 506–511. DOI: 10.2307/1442542.

-
16. Bürger O. Nemertini (Schnurwürmer) // Klassen und Ordnungen des Tier-Reichs. C.F. Winter'sche Verlagshandlung. 1897-1907. Vol. 4.
 17. Bürger O. (1985) Die Nemertinen des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeres-Abschnitte. In: Fauna und Flora des Golfes von Neapel. Vol. 22.
 18. Calhoun D.M., Bucciarelli G.M., Kats L.B., Zimmer R.K., Johnson P.T.J. Noxious newts and their natural enemies: Experimental effects of tetrodotoxin exposure on trematode parasites and aquatic macroinvertebrates // *Toxicon*. 2017. Vol. 137. P. 120–127. DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.07.021.
 19. 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.
 20. Cardall B.L., Brodie E.D.Jr, Brodie E.D.3rd, Hanifin C.T. Secretion and regeneration of tetrodotoxin in the rough-skin newt (*Taricha granulosa*) // *Toxicon*. 2004. Vol. 44, № 8. P. 933–938. DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.09.006.
 21. 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. DOI: 10.1016/S0022-0981(02)00595-6.
 22. Chen C., Chou H. Detection of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography in lined-moon shell and puffer fish // *Acta Zoologica Taiwanica*. 1998. Vol. 9, № 1. P. 41–48.
 23. Chen X.W., Liu H.X., Jin Y.B., Li S.F., Bi X., Chung S., Zhang S.S., Jiang Y.Y. Separation, identification and quantification of tetrodotoxin and its analogs by LC-MS without calibration of individual analogs // *Toxicon*. 2011. Vol. 57, № 6. P. 938–943. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.03.011.
 24. Cheng C.A., Hwang D.F., Tsai Y.H., Chen H.C., Jeng S.S., Noguchi T., Ohwada K., Hasimoto K. Microflora and tetrodotoxin-producing bacteria in a gastropod, *Niotha*

clathrate // Food and chemical toxicology. 1995. Vol. 33, № 11. P. 929–934. DOI: 10.1016/0278-6915(95)00061-6.

25. Chernyshev A.V, Polyakova N.E., Turanov S.V. Taxonomy and phylogeny of *Lineus torquatus* and *allies* (Nemertea, Lineidae) with descriptions of a new genus and a new cryptic species // Systematics and Biodiversity. 2018. Vol. 16, № 1. P. 55–68. DOI: 10.1080/14772000.2017.1317672.

26. Chulanetra M., Sookrung N., Srimanote P., Indrawattana N., Thanongsaksrikul J., Sakolvaree Y., Chongsa-Nguan M., Kurazono H., Chaicumpa W. Toxic marine puffer fish in Thailand seas and tetrodotoxin they contained // Toxins. 2011. Vol. 3, № 10. P. 1249–1262. DOI: 10.3390/toxins3101249.

27. Coe W.R. Nemerteans of the west and northwest coasts of America // Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College. 1905. Vol. 47. P. 1–318.

28. Delfino G., Brizzi R., Alvarez B.B., Kracke-Berndorff R. Serous cutaneous glands in *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae): secretory patterns during ontogenesis // Tissue & cell. 1998. Vol. 30, № 1. P. 30–40. DOI: 10.1016/s0040-8166(98)80004-9.

29. 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.

30. Fukuda A., Tani A. Records of puffer poisonings report 3 // Nippon Igaku Oyobi Kenko Hoken. 1941. Vol. 3528. P. 7–13.

31. 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. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.11.014.

32. Gerssen A., Bovee T.H.F., Klijnsstra M.D., Poelman M., Portier L., Hoogenboom R.L.A.P. First Report on the occurrence of tetrodotoxins in bivalve mollusks in the

Netherlands // *Toxins*. 2018. Vol. 10, № 11. Article No. 450. DOI: 10.3390/toxins10110450.

33. Gibson R. The physiology of digestion in nemertean worms // *Boi. Zool. E Biol. Marinha, N. S.* 1972. Vol. 29. P. 55–64.

34. Gibson R.N. *Nemertea // Synopsis and classification of living organisms*. 1982. Vol. 1. P. 823–846.

35. Gontcharoff M. Étude des rhabdites de la trompe de *Lineus ruber* (Némertien) au microscope électronique // *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*. 1957. Vol. 244. P. 1539–1541.

36. 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.

37. Hanifin C.T., Yotsu-Yamashita M., Yasumoto T., Brodie E.D.3rd, Brodie E.D.Jr. Toxicity of dangerous prey: variation of tetrodotoxin levels within and among populations of the newt *Taricha granulosa* // *J. Chem. Ecol.* 1999. Vol. 25, № 9. P. 2161–2175. DOI: 10.1023/A:1021049125805.

38. 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.

39. Honda S., Arakawa O., Takatani T., Tachibana K., Yagi M., Tanigawa A., Noguchi T. Toxication of cultured puffer fish *Takifugu rubripes* by feeding on tetrodotoxin-containing diet // *Nippon Suisan Gakkaishi*. 2005. Vol. 71, № 5. P. 815–820. DOI: 10.2331/suisan.71.815.

40. Hookabe N, Kajihara H. Taxonomic reappraisal of *Lineus longifissus* Auct. (Nemertea: Pilidiophora) from Japan for the first time in 122 years // *Zoological Science*. 2020. Vol. 37, № 5. P. 467-475. DOI: 10.2108/zs200001.

-
41. 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. P. 327–332. DOI: 10.1007/BF00391147.
 42. Hwang D.-F., Cxueh C.H., Deng S.S. Tetrodotoxin secretion from the lined moon shell *Natica lineata* in response to external stimulation // *Toxicon*. 1990. Vol. 28, № 10. P. 1133–1136. DOI: 10.1016/0041-0101(90)90113-1.
 43. Hwang D.-F., Lin L.-C., Jeng S.-S. Occurrence of tetrodotoxin-related toxins in the gastropod mollusk *Niotha clathrata* from Taiwan // *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1992a. Vol. 58, № 1. P. 63–67. DOI: 10.1016/0041-0101(92)90434-7.
 44. Hwang D.-F., Lin L.-C., Jeng S.-S. Variation and secretion of toxins in gastropod mollusc *Niotha clathrate* // *Toxicon*. 1992b. Vol. 30, № 10. P. 1189–1194. DOI: 10.1016/0041-0101(92)90434-7.
 45. Hwang P.-A., Noguchi T., Hwang D.-F. Neurotoxin tetrodotoxin as attractant for toxic snails // *Fisheries science*. 2004. Vol. 70. P. 1106–1112. DOI: 10.1111/j.1444-2906.2004.00911.x.
 46. Hwang P.-A., Tsai Y.-H., Lin H.-P., Hwang D.-F. Tetrodotoxin-binding proteins isolated from five species of toxic gastropods // *Food Chemistry*. 2007. Vol. 103. P. 1153–1158. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.10.021.
 47. Hyman L.H. The invertebrates. Vol. II: Platyhelminthes and Rhynchocoela // *The Acoelomate Bilateria*. New York: McGraw-Hill, 1951.
 48. Hyman L.H. The invertebrates: smaller coelomate groups. Chaetognatha, Hemichordata, Pogonophora, Phoronida, Ectoprocta, Brachiopoda, Sipunculida // *The Coelomate Bilateria*. Vol. V. New York: McGraw-Hill, 1959.
 49. Ikeda K., Murakami Y., Emoto Y., Ngy L., Taniyama S., Yagi M., Takatani T., Arakawa O. Transfer profile of intramuscularly administered tetrodotoxin to non-toxic

cultured specimens of the pufferfish *Takifugu rubripes* // *Toxicon*. 2009. Vol. 53, № 1. P. 99–103. DOI: 10.1016/j.toxicon.2008.10.018.

50. Ito M., Furukawa R., Yasukawa S., Sato M., Oyama H., Okabe T., Suo R., Sugita H., Takatani T., Arakawa O., Adachi M., Nishikawa T., Itoi S. Local differences in the toxin amount and composition of tetrodotoxin and related compounds in pufferfish (*Chelonodon patoca*) and toxic goby (*Yongeichthys criniger*) juveniles // *Toxins*. 2022. Vol. 14, № 2. Article No 150. DOI: 10.3390/toxins14020150.

51. 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. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.07.006.

52. 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.

53. Itoi S., Kozaki A., Komori K., Tsunashima T., Noguchi S., Kawane M., Sugita H. Toxic *Takifugu pardalis* eggs found in *Takifugu niphobles* gut: Implications for TTX accumulation in the pufferfish // *Toxicon*. 2015. Vol. 108. P. 141–146. DOI: 10.1016/j.toxicon.2015.10.009.

54. Itoi S., Ueda H., Yamada R., Takei M., Sato T., Oshikiri S., Wajima Y., Ogata R., Oyama H., Shitto T., Okuhara K., Tsunashima T., Sawayama E., Sugita H. Including planocercid flatworms in the diet effectively toxifies the pufferfish, *Takifugu niphobles* // *Scientific reports*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 12302. DOI: 10.1038/s41598-018-30696-z.

55. 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.

56. Jal S., Khora S.S. An overview on the origin and production of tetrodotoxin, a potent neurotoxin // *Journal of Applied Microbiology*. 2015. Vol. 119. P. 907–916. DOI: 10.1111/jam.12896.

57. Jang J.-H., Lee J., Yotsu-Yamashita M. LC/MS analysis of tetrodotoxin and its deoxy analogs in the marine puffer fish *Fugu niphobles* from the southern coast of Korea, and in the brackishwater puffer fishes *Tetraodon nigroviridis* and *Tetraodon biocellatus* from southeast asia // *Marine Drugs*. 2010. Vol. 8. P. 1049–1058. DOI: 10.3390/md8041049.

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

59. Jennings J.B., Gibson R. Observations on the nutrition of seven species of Rhynchocoelan worms // *The Biological Bulletin*. 1969. Vol. 136, № 3. P. 405–433.

60. Johnson P.T.J., Calhoun D.M., Stokes A.N., Susbilla C.B., McDevitt-Galles T., Briggs C.J., Hoverman J.T., Tkach V.V., de Roode J.C. Of poisons and parasites-the defensive role of tetrodotoxin against infections in newts // *The Journal of animal ecology*. 2018. Vol. 87, № 4. P. 1192–1204. DOI: 10.1111/1365-2656.12816.

61. Kajihara H., Chernyshev A.V., Sun S.-C., Sundberg P., Crandall F.B. Checklist of nemertean genera and species published between 1995 and 2007 // *Species Diversity*. 2008. Vol. 13, № 4. P. 245-274. DOI: 10.12782/specdiv.13.245.

62. 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. DOI: 10.2108/zsj.30.985.

63. Katikou P., Georgantelis D., Sinouris N., Petsi A., Fotaras T. First report on toxicity assessment of the Lessepsian migrant pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from European waters (Aegean Sea, Greece) // Toxicon. 2009. Vol. 54, № 1. P. 50–55. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.03.012.

64. Khor S., Wood S.A., Salvitti L., Taylor D.I., Adamson J., McNabb P., Cary S.C. Investigating diet as the source of tetrodotoxin in *Pleurobranchaea maculate* // Marine Drugs. 2014. Vol. 12, № 1. P. 1-16. DOI: 10.3390/md12010001.

65. Kim Y.H., Brown G.B., Mosher H.S. Tetrodotoxin: occurrence in Atelopid frogs of Costa Rica // Science. 1975. Vol. 189. P. 151–152. DOI: 10.1126/science.1138374.

66. Kodama M., Ogata T., Sato S. External secretion of tetrodotoxin from puffer fishes stimulated by electric shock // Marine Biology. 1985. Vol. 87. P. 199–202.

67. Kodama M., Sato S., Ogata T. *Alexandrium tamarense* as a source of tetrodotoxin in the scallop *Patinopecten yessoensis*. In: Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea: Proceedings of the Fifth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. New York: Elsevier, New York, 1993. P. 401–406.

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. Kono M., Matsui T., Furukawa K., Yotsu-Yamashita M., Yamamori K. Accumulation of tetrodotoxin and 4,9-anhydrotetrodotoxin in cultured juvenile kusafugu *Fugu niphobles* by dietary administration of natural toxic komonfugu *Fugu poecilonotus* liver // Toxicon. 2008a. Vol. 51, № 7. P. 1269–1273. DOI: 10.1016/j.toxicon.2008.02.017.

70. Kono M., Matsui T., Furukawa K., Takase T., Yamamori K., Kaneda H., Aoki D., Jang J.H., Yotsu-Yamashita M. Examination of transformation among tetrodotoxin and its analogs in the living cultured juvenile puffer fish, kusafugu, *Fugu niphobles* by

intramuscular administration // *Toxicon*. 2008b. Vol. 52, № 6. P. 714–720. DOI: 10.1016/j.toxicon.2008.08.002.

71. 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, № 3. P. 655–667. DOI: 10.3390/md10030655.

72. Kwon Y.S., Min S.K., Yeon S.J., Hwang J.H., Hong J.S., Shin H.S. Assessment of neuronal cell-based cytotoxicity of neurotoxins from an estuarine nemertean in the Han river estuary // *Journal of microbiology and biotechnology*. 2017. Vol. 27, № 4. P. 725–730. DOI: 10.4014/jmb.1611.11027.

73. Lago J., Rodríguez L.P., Blanco L., Vieites J.M., Cabado A.G. Tetrodotoxin, an extremely potent marine neurotoxin: distribution, toxicity, origin and therapeutical uses // *Marin Drugs*. 2015. Vol. 13, № 10. P. 6384–6406. DOI: 10.3390/md13106384.

74. Lee C.H., Ruben P.C. Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin // *Channels*. 2008. Vol. 2, № 6. P. 407–412. DOI: 10.4161/chan.2.6.7429.

75. Lin H., Zhang C., Liao J., Yang F., Zhong S., Jiang P., Chen X., Nagashima Y. Neutralizing effect of hemolymph from the shore crab, *Thalamita crenata*, on paralytic shellfish toxins // *Toxicon*. 2015. Vol. 99. P. 51–57. DOI: 10.1016/j.toxicon.2015.03.010.

76. Ling E.A. The proboscis apparatus of the nemertine *Lineus Ruber* // *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 1971. Vol. 262. № 840. P. 1–22.

77. Lopes V.M., Baptista M., Repolho T., Rosa R., Costa, P.R. Uptake, transfer and elimination kinetics of paralytic shellfish toxins in common octopus (*Octopus vulgaris*) // *Aquatic Toxicology*. 2014. Vol. 146. P. 205–211. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.11.011.

-
78. Lorentz M.N., Stokes A.N., Rößler D.C., Lötters S. Tetrodotoxin // *Current biology*. 2016. Vol. 26, № 19. P. 870–872. DOI: 10.1016/j.cub.2016.05.067.
79. Magarlamov T.Y., Beleneva I.A., Chernyshev A.V., Kuhlevsky A.D. Tetrodotoxin-producing *Bacillus* sp. from the ribbon worm (Nemertea) *Cephalothrix simula* (Iwata, 1952) // *Toxicon*. 2014. Vol. 85. P. 46–51. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.04.015.
80. 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. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.01.060.
81. 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.
82. Magarlamov T.Y., Turbeville J.M., Chernyshev A.V. Pseudocnidae of ribbon worms (Nemertea): ultrastructure, maturation, and functional morphology // *PeerJ*. 2021. Vol. 9. P. 1–51. DOI: 10.7717/peerj.10912.
83. 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*. 2003a. Vol. 41, № 1. P. 13–18. DOI: 10.1016/S0041-0101(02)00169-1.
84. 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*. 2003b. Vol. 41, № 5. P. 605–611. DOI: 10.1016/S0041-0101(03)00003-5.
85. Mailho-Fontana P.L., Jared C., Antoniazzi M.M., Sciani J.M., Pimenta D.C., Stokes A.N., Grant T., Brodie E.D.3rd, Brodie E.D.Jr. 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., Magarlamov T.Y. Tetrodotoxin and its analogues (TTXs) in the food-capture and defense organs of the palaeonemertean *Cephalothrix* cf. *simula* // Toxins (Basel). 2024. Vol. 16, № 43. P. 1–16. DOI: 10.3390/toxins16010043.

88. Martin C.H. A Note on the occurrence of nematocysts and similar structures in the various groups of the animal kingdom // Biologisches Zentralblatt. 1914. T. 34. P. 248–273.

89. Matsui T., Hamada S., Konos S. Difference in accumulation of puffer fish toxin and crystalline tetrodotoxin in the puffer fish, *Fugu rubripes rubripes* // Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 1981. Vol. 47, № 4. P. 535–537. DOI: 10.2331/suisan.47.535.

90. Matsumoto T., Nagashima Y., Kusuhara H., Sugiyama Y., Ishizaki S., Shimakura K., Shiomi K. Involvement of carrier-mediated transport system in uptake of tetrodotoxin into liver tissue slices of puffer fish *Takifugu rubripes* // Toxicon. 2007. Vol. 50, № 2. P. 173–179. DOI: 10.1016/j.toxicon.2007.03.004.

91. Matsumoto T., Kiriake A., Ishizaki S., Watabe S., Nagashima Y. Biliary excretion of tetrodotoxin in the cultured pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration // Toxicon. 2015. Vol. 93. P. 98–102. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.11.227.

92. Matsumura K. Tetrodotoxin as a pheromone // Nature. 1995. Vol. 378. P. 563–564. DOI: 10.1038/378563b0.

93. McNabb P.S., Taylor D.I., Ogilvie S.C., Wilkinson L., Anderson A., Hamon D,

Wood S.A., Peake B.M. First detection of tetrodotoxin in the bivalve *Paphies australis* by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry with and without precolumn reaction // Journal of AOAC INTERNATIONAL. 2014. Vol. 97, № 2. P. 325–333. DOI: 10.5740/jaoacint.SGEMcNabb.

94. Mebs D., Schmidt K. Occurrence of tetrodotoxin in the frog *Atelopus oxyrhynchus* // Toxicon. 1989. Vol. 27, № 7. P. 7–10. DOI: 10.1016/0041-0101(89)90049-4.

95. 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.

96. Mebs D., Yotsu-Yamashita M., Seitz H.M., Arakawa O. Tetrodotoxin does not protect red-spotted newts, *Notophthalmus viridescens*, from intestinal parasites // Toxicon. 2012. Vol. 60, № 1. P. 66–69. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.03.017.

97. Mebs D., Lorentz M., Yotsu-Yamashita M., Rößler D.C., Ernst R., Lötters S. Geographic range expansion of tetrodotoxin in amphibians - first record in *Atelopus hoogmoedi* from the Guiana Shield // Toxicon. 2018. Vol. 150. P. 175–179. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.05.011.

98. Mebs D., Yotsu-Yamashita M. Acquiring toxicity of a newt, *Cynops orientalis* // Toxicon. 2021. Vol. 198. P. 32–35. DOI: 10.1016/j.toxicon.2021.04.025.

99. Melnikova D.I., Vlasenko A.E., Magarlamov T.Y. Stable Tetrodotoxin Production by *Bacillus* sp. strain 1839 // Mar. Drugs. 2019. Vol. 17. № 704. P. 1–6. DOI: 10.3390/md17120704.

100. Miyazaki K., Suo R., Itoi S., Hirota J., Adachi M., Miyasaka T., Nishikawa T., Yokoyama T., Sato S., Takada K. 5, 6, 11-trideoxy tetrodotoxin attracts tiger puffer *Takifugu rubripes* // Toxicon. 2024. Vol. 237. Article No. 107539. DOI: 10.1016/j.toxicon.2023.107539.

-
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. Miyazawa K., Noguchi T. Distribution and origin of tetrodotoxin // *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*. 2001. Vol. 20, № 1. P. 11–33. DOI: 10.1081/TXR-100103081.
104. 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.
105. Nagashima Y., Ohta A., Yin X., Ishizaki S., Matsumoto T., Doi H., Ishibashi T. Difference in uptake of tetrodotoxin and saxitoxins into liver tissue slices among pufferfish, boxfish and porcupinefish // *Marine Drugs*. 2018. Vol. 16, № 1. Article No. 17. DOI: 10.3390/md16010017.
106. Narita 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* // *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1987. Vol. 53, № 4. P. 617-621, DOI: 10.2331/suisan.53.617.
107. Ngy L., Taniyama S., Shibano K., Yu C.F., Takatani T., Arakawa O. Distribution of tetrodotoxin in pufferfish collected from coastal waters of Sihanouk Ville, Cambodia // *Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 2008. Vol. 49, № 5. P. 361–365. DOI: 10.3358/shokueishi.49.361.

-
108. Noguchi T., Hashimoto Y. Isolation of tetrodotoxin from a goby *Gobius criniger* // *Toxicon*. 1973. Vol. 11, № 3. P. 305–307. DOI: 10.1016/0041-0101(73)90060-3.
109. Noguchi T., Arakawa O., Daigo K., Hashimoto K. Local differences in toxin composition of a xanthid crab *Atergatis floridus* inhabiting Ishigaki Island, Okinawa // *Toxicon*. 1986. Vol. 24, № 7. P. 705–711. DOI: 10.1016/0041-0101(86)90033-4.
110. Noguchi T., Ali A.E., Arakawa O., Miyazawa K., Kanoh S., Shida Y., Nishio S., Hashimoto K. Tetrodonic acid-like substance; a possible precursor of tetrodotoxin // *Toxicon*. 1991. Vol. 29, № 7. P. 845–855. DOI: 10.1016/0041-0101(91)90221-c.
111. Noguchi T., Ebesu J.S.M. Puffer poisoning: epidemiology and treatment // *Journal of Toxicology*. 2001. Vol. 20, № 1. P. 1–10.
112. Noguchi T., Takatani T., Arakawa O. Toxicity of puffer fish cultured in netcages // *Shokuhin eiseigaku zasshi*. Journal of the Food Hygienic Society of Japan. 2004. Vol. 45, № 3. P. 146–149. DOI: 10.3358/shokueishi.45.146.
113. Noguchi T., Arakawa O., Takatani T. TTX accumulation in pufferfish // *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2006a. Vol. 1, № 1. P. 145–152. DOI: 10.1016/j.cbd.2005.10.006.
114. Noguchi T., Arakawa O., Takatani T. Toxicity of pufferfish *Takifugu rubripes* cultured in netcages at sea or aquaria on land // *Comparative biochemistry and physiology*. 2006b. Vol. 1, № 1. P. 153–157. DOI: 10.1016/j.cbd.2005.11.003.
115. Noguchi T., Arakawa O. Tetrodotoxin – distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication // *Marine drugs*. 2008. Vol. 6, № 2. P. 220–242. DOI: 10.3390/md20080011.
116. Noguchi Y., Suzuki T., Matsutani K., Sakakibara R., Nakahigashi R., Adachi M., Nishikawa T., Abe, H. An almost nontoxic tetrodotoxin analog, 5,6,11-trideoxytetrodotoxin, as an odorant for the grass puffer // *Scientific reports*. 2022. Vol. 12, № 1. Article No. 15087. DOI: 10.1038/s41598-022-19355-6.

-
117. Norenburg J.L. Comparative morphology of the nemertine integument: Functional and phylogenetic interpretations. Ph.D. Diss. – Boston: Northeastern University, 1982.
118. Norenburg J.L. Structure of the nemertine integument with consideration of its ecological and phylogenetic significance // *American Zoologist*. 1985. Vol. 25. P. 37–51.
119. Norenburg J.L. *Riserius pugetensis* gen. n., sp. n. (Nemertina: Anopla), a new mesopsammic species, and comments on phylogenetics of some anoplan characters // *Hydrobiologia*. 1993. Vol. 266. P. 203–205. DOI: 10.1007/BF00013369.
120. 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.
121. Okabe T., Saito R., Yamamoto K., Watanabe R., Kaneko Y., Yanaoka M., Furukoshi S., Yasukawa S., Ito M., Oyama H., Suo R., Suzuki M., Takatani T., Arakawa O., Sugita H., Itoi S. The role of toxic planocercid flatworm larvae on tetrodotoxin accumulation in marine bivalves // *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands). 2021. Vol. 237. Article No. 105908. DOI:10.1016/j.aquatox.2021.105908.
122. Okita K., Yamazaki H., Sakiyama K., Yamane H., Niina S., Takatani T., Arakawa O., Sakakura Y. Puffer smells tetrodotoxin // *Ichthyological Research*. 2013. Vol. 60. P. 386–389. DOI: 10.1007/s10228-013-0353-z.
123. Park B.K., Jang W.J., Park K.-H., Lee H.-S., Lee W.-O., Choi K.-S., Lee J. Tetrodotoxin and its analogs: a review of analysis methods and levels in pufferfish // *Journal of Food Hygiene and Safety*. 2021. Vol. 36, № 2. P. 105–117.

-
124. Pedersen K.J.N. Some morphological and histochemical aspects of nemertean connective tissue // *Zeitschrift für Zellforsch.* 1968. Vol. 90. P. 570–595. DOI: 10.1007/BF00339505.
125. Pinto E.P., Rodrigues S.M., Gouveia N., Timóteo V., Costa P.R. Tetrodotoxin and saxitoxin in two native species of puffer fish, *Sphoeroides marmoratus* and *Lagocephalus lagocephalus*, from NE Atlantic Ocean (Madeira Island, Portugal) // *Marine environmental research.* 2019. Vol. 151. Article No. 104780. DOI:10.1016/j.marenvres.2019.104780.
126. Pires O.R.Jr, Sebben A., Schwartz E.F., Largura S.W., Bloch C.Jr, Morales R.A., Schwartz C.A. Occurrence of tetrodotoxin and its analogues in the Brazilian frog *Brachycephalus ephippium* (Anura: Brachycephalidae) // *Toxicon.* 2002. Vol. 40, № 6. P. 761–766. DOI: 10.1016/s0041-0101(01)00279-3.
127. Pires O.R.Jr, Sebben A., Schwartz E.F., Morales R.A., Bloch C.Jr, Schwartz C.A. Further report of the occurrence of tetrodotoxin and new analogues in the Anuran family Brachycephalidae // *Toxicon.* 2005. Vol. 45, №. 1. P. 73–79. DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.09.016.
128. 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.
129. Quay W.B. Integument and the environment: glandular composition, function, and evolution // *American Zoologist.* 1972. Vol. 108. P. 95–108.
130. Rambla-Alegre M., Reverté L., Del Río V., de la Iglesia P., Palacios O., Flores C., Caixach J., Campbell K., Elliott C. T., Izquierdo-Muñoz A., Campàs M., Diogène J. Evaluation of tetrodotoxins in puffer fish caught along the Mediterranean coast of Spain. Toxin profile of *Lagocephalus sceleratus* // *Environmental Research.* 2017. Vol. 158. P. 1–6. DOI: 10.1016/j.envres.2017.05.031.

-
131. Ritson-Williams R., Yotsu-Yamashita M., Paul V. J. Ecological functions of tetrodotoxin in a deadly polyclad flatworm // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006. Vol. 103, № 9. P. 3176–3179. DOI: 10.1073/pnas.0506093103.
132. Rodriguez P., Alfonso A., Vale C., Alfonso C., Vale P., Tellez A., Botana L.M. First toxicity report of tetrodotoxin and 5,6,11-trideoxyTTX in the trumpet shell *Charonia lampas lampas* in Europe // *Analytical Chemistry*. 2008. Vol. 80, № 14. P. 5622–5629. DOI: 10.1021/ac800769e.
133. Rodríguez P., Alfonso A., Otero P., Katikou P., Georgantelis D., Luis B.M. Liquid chromatography–mass spectrometry method to detect tetrodotoxin and its analogues in the puffer fish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from European waters // *Food Chemistry*. 2012. Vol. 132, № 2. P. 1103–1111. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.081.
134. 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.
135. Saito T. Tetrodotoxin attracts pufferfish (‘torafugu’, *Takifugu rubripes*). // *Bull. Inst. Ocean. Res. Dev. Tokai Univ.* 2000. Vol. 21. P. 489.
136. Sakakura Y., Takatani T. Administration of tetrodotoxin protects artificially raised juvenile tiger puffer *Takifugu rubripes* from predators // *Fisheries Science*. 2017. Vol. 83, № 2. P. 191–197. DOI: 10.1007/s12562-016-1046-0.
137. 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. DOI: 10.3390/md13020756.
138. Sato S., Takaishi S., Yasumoto K., Watabe S. Novel polyclonal antibody raised against tetrodotoxin using its haptenic antigen prepared from 4,9-anhydrotetrodotoxin

reacted with 1,2-ethanedithiol and further reacted with keyhole limpet hemocyanin // *Toxins*. 2019. Vol. 11, № 10. Article No. 551. DOI: 10.3390/toxins11100551.

139. 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.

140. 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, № 3. P. 528–543.

141. Shimizu Y., Masaru K. Apparent lack of tetrodotoxin biosynthesis in captured *Taricha torosa* and *Taricha granulosa*. // *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1983. Vol. 31, № 10. P. 3625-3631. DOI: 10.1248/CPB.31.3625.

142. 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, № 6. Article No. 306. DOI: 10.3390/toxins11060306.

143. Spicer M.M., Stokes A.N., Chapman T.L., Brodie E.D.Jr, Brodie E.D.3rd, Gall B.G. An investigation into tetrodotoxin (TTX) levels associated with the red dorsal spots in eastern newt (*Notophthalmus viridescens*) efts and adults // *Journal of toxicology*. 2018. Vol. 2018. Article No. 9196865. DOI: 10.1155/2018/9196865.

144. Sugita H., Ueda R., Noguchi T., Arakawa O., Hashimoto K., Deguchi Y. Identification of a tetrodotoxin-producing bacterium isolated from the xanthid crab *Atergatis floridus* // *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1987. Vol. 53, № 9. Article No. 1693. DOI: 10.2331/suisan.53.1693.

145. Tahara Y. Uber das tetrodongift // *Biochemistry*. 1910. Vol. 30. P. 255–275.

-
146. Tanu M.B., Mahmud Y., Tsuruda K., Arakawa O., Noguchi T. Occurrence of tetrodotoxin in the skin of a rhacophoridid frog *Polypedates* sp. from Bangladesh // *Toxicon*. 2001. Vol. 39, № 7. P. 937–941. DOI: 10.1016/s0041-0101(00)00231-2.
147. 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. DOI: 10.1016/s0041-0101(01)00179-9.
148. 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. DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.06.014.
149. 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. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.11.009.
150. Thuy L., Yamamoto S., Kawaura R., Takemura N, Yamaki K., Yasumoto K., Takada K., Watabe S., Sato S. Tissue distribution of tetrodotoxin and its analogs in *Lagocephalus pufferfish* collected in Vietnam // *Fisheries Science*. 2020. Vol. 86. P. 1101–1110. DOI: 10.1007/s12562-020-01460-y.
151. 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. DOI: 10.1016/s0041-0101(01)00198-2.
152. Turbeville J.M., Ruppert E.E. Epidermal muscles and peristaltic burrowing in *Carinoma tremaphoros* (Nemertini): correlates of effective burrowing without segmentation // *Zoomorphology*. 1983. Vol. 103. P. 103–120. DOI: 10.1007/BF00312241.

-
153. Turbeville J.M. Nemertinea // Microscopic anatomy of invertebrates. Vol. 3: Platyhelminthes and Nemertinea. N.Y.: Wiley-Liss, 1991. P. 285–328.
154. 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.
155. 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.
156. Ueyama N., Sugimoto K., Kudo Y., Onodera K.I., Cho Y., Konoki K., Nishikawa T., Yotsu-Yamashita M. Spiro bicyclic guanidino compounds from pufferfish: possible biosynthetic intermediates of tetrodotoxin in marine environments // Chemistry. 2018. Vol. 24, № 28. P. 7250–7258. DOI: 10.1002/chem.201801006.
157. Vaelli P.M., Theis K.R., Williams J.E., O'Connell L.A., Foster J.A., Eisthen H.L. The skin microbiome facilitates adaptive tetrodotoxin production in poisonous newts // eLife. 2020. Vol. 9. Article No. e53898. DOI: 10.7554/eLife.53898.
158. Vale P. Complex profiles of hydrophobic paralytic shellfish poisoning compounds in *Gymnodinium catenatum* identified by liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry // Journal of Chromatography A. 2008. Vol. 1195, № 1–2. P. 85–93. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.04.073.
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. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.11.006.
160. Vlasenko A.E., Kuznetsov V.G., Petrova I.Y., Magarlamov T.Y. Development of a polyclonal antibody-based indirect competitive ELISA for the determination of

tetrodotoxins in marine ribbon worms (NEMERTEA) and its comparison with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Toxicon*. 2020. Vol. 176. P. 30–33. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.01.009.

161. 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.

162. 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.

163. Vlasenko A.E., Magarlamov T.Y. Tetrodotoxins in ribbon worms *Cephalothrix cf. simula* and *Kulikovia alborostrata* from Peter the Great bay, Sea of Japan // *Toxins*. 2023. Vol. 15, № 1. Article No. 16. DOI: 10.3390/toxins15010016.

164. Vlasenko A.E., Pereverzeva A.O., Velansky P.V., Magarlamov T.Y. Tetrodotoxins in tissues and cells of different body regions of ribbon worms *Kulikovia alborostrata* and *K. manchenkoi* from Spokoynaya bay, Sea of Japan // *Toxins*. 2024. Vol. 16, № 4. Article No. 186. DOI: 10.3390/toxins16040186.

165. Wakely J.F., Fuhrman G.J., Fuhrman F.A., Fischer H.G., Mosher H.S. The occurrence of tetrodotoxin (tarichatoxin) in amphibia and the distribution of the toxin in the organs of newts (*Taricha*) // *Toxicon*. 1966. Vol. 3, № 3. P. 195–203. DOI: 10.1016/0041-0101(66)90021-3.

166. Wang J., Fan Y., Yao Z. Isolation of a *Lysinibacillus fusiformis* strain with tetrodotoxin-producing ability from puffer fish *Fugu obscurus* and the characterization of this strain // *Toxicon*. 2010. Vol. 56, № 4. P. 640–643.

-
167. Wassel M.A., Makabe-Kobayashi Y., Iqbal M.M., Takatani T., Sakakura Y., Hamasaki K. The impact of tetrodotoxin (TTX) on the gut microbiome in juvenile tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* // Scientific reports. 2024. Vol. 14, № 1. Article No. 16684. DOI: 10.1038/s41598-024-66112-y.
168. Whitelaw B.L., Strugnell J.M., Faou P., da Fonseca R.R., Hall N.E., Norman M., Finn J., Cooke I.R. Combined transcriptomic and proteomic analysis of the posterior salivary gland from the southern blue-ringed octopus and the southern sand octopus // Journal of proteome research. 2016. Vol. 15, № 9. P. 3284–3297. DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b00452.
169. Williams B.L., Caldwell R.L. Intra-organismal distribution of tetrodotoxin in two species of blue-ringed octopuses (*Hapalochlaena fasciata* and *H. lunulata*) // Toxicon. 2009. Vol. 54, № 3. P. 345–353.
170. Williams B.L., Stark M.R., Caldwell R.L. Microdistribution of tetrodotoxin in two species of blue-ringed octopuses (*Hapalochlaena lunulata* and *Hapalochlaena fasciata*) detected by fluorescent immunolabeling // Toxicon. 2012. Vol. 60, № 7. P. 1307–1313. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.08.015.
171. Wood S.A., Taylor D.I., McNabb P., Walker J., Adamson J., Cary S.C. Tetrodotoxin concentrations in *Pleurobranchaea maculata*: temporal, spatial and individual variability from New Zealand populations // Marine Drugs. 2012. Vol. 10, № 1. P. 163-176. DOI: 10.3390/md10010163.
172. Wu Y.J., Lin C.L., Chen C.H., Hsieh C.H., Jen H.C., Jian S.J., Hwang D.F. Toxin and species identification of toxic octopus implicated into food poisoning in Taiwan // Toxicon. 2014. Vol. 91. P. 96–102. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.09.009.
173. Wu Z., Yang Y., Xie L., Xia G., Hu J., Wang S., Zhang R. Toxicity and distribution of tetrodotoxin-producing bacteria in puffer fish *Fugu rubripes* collected from the Bohai Sea of China // Toxicon. 2005. Vol. 46, № 4. P. 471–476. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.06.002.

-
174. Yamamori K., Kono M., Furukawa K., Matsui T. The toxification of juvenile cultured kusafugu *Takifugu niphobles* by oral administration of crystalline tetrodotoxin // *Shokuhin eiseigaku zasshi*. Journal of the Food Hygienic Society of Japan. 2004. Vol. 45, № 2. P. 73–75. DOI: 10.3358/shokueishi.45.73.
175. Yamate Y., Takatani T., Takegaki T. Levels and distribution of tetrodotoxin in the blue-lined octopus *Hapalochlaena fasciata* in Japan, with special reference to within-body allocation // *Journal of Molluscan Studies*. 2021. Vol. 87, № 1. DOI: 10.1093/mollus/eyaa042.
176. Yang G., Xu J., Liang S., Ren D., Yan X., Bao B. A novel TTX-producing *Aeromonas* isolated from the ovary of *Takifugu obscurus* // *Toxicon*. 2010. Vol. 56, № 3. P. 324-329. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.03.019.
177. Yasumoto T., Nagai 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. P. 44–51. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1986.tb15560.x.
178. Yin H.L., Lin H.S., Huang C.C., Hwang D.F., Liu J.S., Chen W.H. Tetrodotoxination with *Nassauris glans*: a possibility of tetrodotoxin spreading in marine products near Pratas Island // *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005. Vol. 73, № 5. P. 985-990.
179. Yotsu M., Iorizzi I. M., Yasumotoi T. Distribution of tetrodotoxin, 6-epitetrodotoxin, and 11-deoxytetrodotoxin in newts // *Toxicon*. 1990. Vol. 28, № 2. C. 238–241. DOI: 10.1016/0041-0101(90)90419-8.
180. Yotsu-Yamashita M., Sugimoto A., Takai A., Yasumoto T. Effects of specific modifications of several hydroxyls of tetrodotoxin on its affinity to rat brain membrane // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1999. Vol. 289, № 3. P. 1688–1696.

-
181. 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, № 22. P. 5937–5946. DOI: 10.1046/j.0014-2956.2001.02547.x.
182. Yotsu-Yamashita M., Mebs D., Flachsenberger W. Distribution of tetrodotoxin in the body of the blue-ringed octopus (*Hapalochlaena maculosa*) // Toxicon. 2007a. Vol. 49, № 3. P. 410–412. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.10.008.
183. Yotsu-Yamashita M., Mebs D., Kwet A., Schneider M. Tetrodotoxin and its analogue 6-epitetrodotoxin in newts (*Triturus* spp.; Urodela, Salamandridae) from southern Germany // Toxicon. 2007b. Vol. 50, № 2. P. 306–309. DOI: 10.1016/j.toxicon.2007.03.019.
184. Yotsu-Yamashita M., Tateki E. First report on toxins in the Panamanian toads *Atelopus limosus*, *A. glyphus* and *A. certus* // Toxicon. 2010. Vol. 55, № 1. P. 153–156. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.07.003.
185. Yotsu-Yamashita M., Gilhen J., Russell R. W., Krysko K. L., Melaun C., Kurz A., Kaufenstein S., Kordis D., Mebs D. Variability of tetrodotoxin and of its analogues in the red-spotted newt, *Notophthalmus viridescens* (Amphibia: Urodela: Salamandridae) // Toxicon. 2012. Vol. 59, № 2. P. 257–264. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.12.004.
186. Yotsu-Yamashita M., Abe Y., Kudo Y., Ritson-Williams R., Paul V.J., Konoki K., Cho Y., Adachi M., Imazu T., Nishikawa T. First Identification of 5,11-dideoxytetrodotoxin in marine animals, and characterization of major fragment ions of tetrodotoxin and its analogs by high resolution ESI-MS/MS // Marine Drugs. 2013. Vol. 11, № 8. P. 2799–2813. DOI: 10.3390/md11082799.
187. Yotsu-Yamashita M., Toennes S.W., Mebs D. Tetrodotoxin in Asian newts (Salamandridae) // Toxicon. 2017. Vol. 134. P. 14–17. DOI:

10.1016/j.toxicon.2017.05.014.

188. Yotsu-Yamashita M., Nagaoka Y., Muramoto K., Cho Y., Konoki K. Pufferfish saxitoxin and tetrodotoxin binding protein (PSTBP) analogues in the blood plasma of the pufferfish *Arothron nigropunctatus*, *A. hispidus*, *A. manilensis*, and *Chelonodon patoca* // *Marine drugs*. 2018. Vol. 16, № 7. Article No. 224. DOI: 10.3390/md16070224.
189. Yu C.-F., Yu H.-F. P., Chan P.-L., Yan Q., Wong P.-K. Two novel species of tetrodotoxin-producing bacteria isolated from toxic marine puffer fishes // *Toxicon*. 2004. Vol. 44, № 6. P. 641–647. DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.07.021.
190. Yuan Y., Guan F., Yu C., Chen Z., Zhang J. Isolation and toxigenic characteristics of a tetrodotoxin producing bacteria // *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2022. Vol. 22. Article No. 1. DOI: 10.4194/TRJFAS19531.
191. Zhang X., Zong J., Chen S., Li M., Lu Y., Wang R., Xu, H. accumulation and elimination of tetrodotoxin in the pufferfish *Takifugu obscurus* by dietary administration of the wild toxic gastropod *Nassarius semiplicata* // *Toxins*. 2020. Vol. 12, № 5. Article No. 278. DOI: 10.3390/toxins12050278.