

На правах рукописи

ВЛАСЕНКО АННА ЕВГЕНЬЕВНА

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

1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ВЛАДИВОСТОК – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
«Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»
Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук **Магарламов Тимур Юсифович**

Официальные оппоненты:

Зайцева Ольга Викторовна, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Зоологический институт Российской академии наук, зав. лабораторией эволюционной морфологии

Плехова Наталья Геннадьевна, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, зав. междисциплинарным научно-исследовательским центром

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится 30 сентября 2025 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета 24.1.191.01 (Д 005.008.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.

Факс: (423)2310-900, e-mail: nscmb@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук: <http://www.imb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovet-d-005-008-01/69-vlasenko-anna-evgenevna>

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Ващенко

М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Тетродотоксин (ТТХ) – нейротоксин бактериального происхождения, обнаруженный во множестве таксономически далеких друг от друга организмах (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).

Одной из самых интригующих задач для исследователей всего мира 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.

К малоизученным ТТХ-содержащим животным относятся немертины (Nemertea) – тип преимущественно хищных морских червей, включающий более 1300 видов, которые подразделяются на три основных класса – пилидиофора, палео- и гоппонемертины (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 ряда ТТХ, и пути накопления токсинов, как и их физиологическая роль 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. Первые эксперименты, демонстрирующие участие ТТХ в поведенческих стратегиях животных, показали, что токсин выделяется во внешнюю среду покровами кожи саламандр в ответ на раздражение и играет защитную функцию (Shimizu, Kobayashi, 1983). Впоследствии была выявлена ТТХ-позитивная метка в двух типах железистых клеток покровного эпителия саламандр (Tsuruda et al., 2002; Mebs et al., 2010). Иммуногистохимическое изучение структур рыб фугу, задействованных в экскреции ТТХ в ответ на внешние раздражители (Kodama et al., 1985; Saito et al., 1985), показало, что токсин, как правило, локализуется в железистых клетках (Ikeda et al., 2009; Sato et al., 2021). Экскреция ТТХ в ответ на внешнее раздражение была показана также для гастропод (Hwang

et al., 1990, 1992). На основании этого, а также, локализации токсина в нейтральных муциновых клетках и базальной мембране эпителия мантии (Salvitti et al., 2015), 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*) (Ali et al., 1990; Vlasenko, Magarlamov, 2020) в ответ на раздражение. В 2021 году была проведена обширная работа по изучению ТТХ-содержащих структур *C. simula* (Malykin et al., 2021). Хотя авторы и не изучали сам процесс экскреции токсина и поступление его в слизь, окутывающего животное, но предположили, что ТТХ-позитивные гранулярные клетки III типа, мукоидные и серозные клетки экскретируют токсины ряда ТТХ в слизь. Не была показана и способность ТТХ-позитивных структур к восстановлению содержания токсинов после их экскреции (Malykin et al., 2021). В 2016 году было изучено распределение ТТХ в интегументе низкотоксичных немертин *Kulikovia alborostrata* (= *Lineus alborostratus*), принадлежащих к гетеронемертинам (класс Pilidiorhiza), в ходе которого ТТХ был выявлен в субэпидермальных бациллярных железистых клетках первого типа и 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 железистых 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 вариабельности содержания токсинов ряда ТТХ у особей *K. alborostrata* из одной популяции и 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. Впервые показано содержание токсинов ряда ТТХ в железистых клетках кишечника немертин. Сопоставление всех результатов, полученных в ходе выполнения данной работы, позволило предположить схему вероятного поступления, переноса и экскреции ТТХ и его производных у немертин.

Теоретическая и практическая значимость. 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 были применены традиционные и современные методы клеточной биологии и биохимии, включая световую микроскопию, иммуногистохимические методы с использованием электронной и флуоресцентной микроскопии, высокоэффективную жидкостную хроматографию с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).

Личный вклад автора. Автор осуществил сбор и первичную обработку образцов для всех видов исследований, лично выполнил экспериментальную работу и анализ полученных данных, а также написание диссертации. Подготовка и написание основных публикаций проводилась с соавторами.

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.

Апробация 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.

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. Список литературы включает 191 наименование, 190 из которых на иностранном языке.

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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В обзоре литературы представлены актуальные данные о содержании ТТХ и его производных у животных различных таксономических групп, а также рассмотрены важнейшие вопросы, связанные с тканевой и клеточной локализацией токсинов в структурах, участвующих в процессах их миграции, накопления и экскреции.

Материалы и методы

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.

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.

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. Образец гомогенизировали, затем подвергали обработке с помощью ультразвукового гомогенизатора HD 2070 (Bandelin Sonopuls, Германия). Полученный гомогенат центрифугировали, супернатант отбирали, выпаривали досуха в роторном испарителе (Labconco, США). Полученный осадок растворяли в 0,1% водном растворе уксусной кислоты из расчета 1 мл/г гомогената немертины, фильтровали через центрифужные концентраторы Vivaspin turbo 4 (3 кДа (Sartorius, Германия)).

Высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией (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 (Merck, Германия). Масс-спектрометр работал в режиме сканирования (m/z 200-1000) и мониторинга множественных реакций (MRM). 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). 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 (Bane et al., 2014), Пуилинги с соавторами (Puilingi et al., 2015) и Тёрнера с соавторами (Turner et al., 2017). Расчет концентрации производных ТТХ проводили относительно площади пика ТТХ по иону 320,1 с использованием калибровочной кривой согласно методике Чен (Chen et al., 2011). В качестве стандарта ТТХ использовали экстракт *C. simula*, содержащий ТТХ в известной концентрации, а также его производные. 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), предела количественного определения (LoQ).

Изучение локализации ТТХ и его производных в теле K. alborostrata. Каждая из 28 особей *K. alborostrata* была поделена на 6 фрагментов: хобот, прецеребральный, ротовой, передний, средний и задний отделы тела. Одинаковые фрагменты тела 25 особей объединяли, затем использовали для приготовления экстракта. Фрагменты трех особей были использованы для иммуногистохимических и морфологических исследований.

Световая микроскопия. Фиксацию немертин производили с помощью 2,5% раствора глутаральдегида на 0,2М какодильном буфере (КБ) с добавлением 0,2 М хлорида натрия с последующей промывкой в КБ. Постфиксацию осуществляли с помощью 1% водного раствора OsO₄. 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).

Флуоресцентная микроскопия. Кусочки тела немертин фиксировали в 4% параформальдегиде. 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. Для выявления ТТХ и его производных использовали первичные поликлональные антитела против ТТХ (Genetex, Ирвин, Калифорния, США) и вторичные антитела Alexa 647 (Invitrogen, США). Срезы 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). Полученные изображения анализировали с помощью программного обеспечения ZEN 3.0, и обрабатывали в Adobe Photoshop 2019 (Adobe, Сан-Хосе, Калифорния, США).

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ). Кусочки тела немертин фиксировали в 4% параформальдегиде, 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). Для выявления ТТХ и его производных использовали поликлональные антитела против ТТХ и вторичные антитела Alexa 647 (Invitrogen, США). Для детектирования структур цитоскелета использовали антитела к ацетилованному α -тубулину (Genetex, США) и вторичные антитела Alexa 488. Препараты заключали в поливиниловый спирт (Mowiol 4-88) (Sigma-Aldrich, США) и анализировали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM-780 (Carl Zeiss, Германия).

Электронная иммуногистохимия. Немертин анестезировали 7% раствором хлорида магния, разделяли на фрагменты, фиксировали 4% формальдегидом. 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. Для выявления ТТХ срезы инкубировали в растворе первичных антител против ТТХ и докрашивали вторичными антителами, конъюгированными с золотыми частицами. Материал исследовали с использованием просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия).

Эксперимент по изучению изменения содержания ТТХ и его производных в теле и слизи К. alborostrata в течение 7 мес. Семнадцать особей *К. alborostrata* содержали в аэрируемых аквариумах с фильтрованной морской водой ($t=12^{\circ}\text{C}$) без подкормки. Животных подвергали стимуляции для выработки секрета, в 1 и 3 сут, через 30 сут и через 7 мес содержания. После отбора секрета на 7 мес тело использовали для последующего выделения ТТХ и его производных, экстракты тела и секрета анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Эксперимент по исследованию локализации ТТХ и его производных методом иммуногистохимии до и после секреции. Для исследования локализации ТТХ и его производных в теле *К. alborostrata* методом иммуногистохимии было взято 4 особи, 2 из которых подвергали стимуляции электрическим током, другие 2 особи не стимулировали. Далее червей анестезировали 7% MgCl_2 , отделяли фрагменты тела из района передней кишки, исследовали методом КЛСМ.

Результаты

Внутривидовая вариация концентраций ТТХ и его производных у особей *К. alborostrata*. Экстракты 36 особей *К. alborostrata* содержали от одного до шести токсинов ряда ТТХ 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 ($5,16 \pm 9,67\%$).

Распределение ТТХ и его производных в теле *K. alborostrata*. Изучение ТТХ и его аналогов в различных участках тела *K. alborostrata* показало, что 5,6,11-тридеоксиТТХ является единственным токсином у изученных особей, концентрация которого превышала LoQ (табл. 1). Для количественного определения токсинов использовали объединенные образцы одних и тех же участков тканей 25 экземпляров *K. alborostrata*.

Таблица 1 – 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 |

ТТХ-содержащие структуры *K. alborostrata* и их морфологические особенности. В текущем исследовании был изучен клеточный состав секреторного эпителия *K. alborostrata*, была предложена новая классификация железистых клеток немертин (табл. 2). 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 *K. alborostrata* (табл. 2). Была получена количественная характеристика встречаемости ТТХ-позитивных структур (табл. 3).

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). Буккальная полость и эпителий передней кишки содержали нефагоцитирующие энтероциты, кишечник – фагоцитирующие энтероциты. 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. 1 А, Б), в кишечнике – два типа железистых клеток (g8 и g9) (рис. 1 Г; табл. 2). Секреторные гранулы g7 (рис. 1 В), g8 (рис. 1 Д) и g9 (рис. 1 Д) демонстрировали свечение при маркировании антителами против ТТХ (табл. 2).

Таблица 2 – Характеристика железистых клеток интегумента, пищеварительной системы и хобота *Kulikovia alborostrata*.

| Тип клеток | Морфологическое описание | Окрашивание метиленовым синим | Локализация | ТТХ-положительное 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.

Таблица 3 – 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.

Методом КЛСМ с использованием антител против ТТХ было выявлено наличие ТТХ-положительных частиц в цитоплазме фагоцитирующих энтероцитов кишечника *K. alborostrata* (рис. 2 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. 2 Б). Эти ТТХ-меченные фагосомы имели крупные размеры, а их содержимое было представлено гетерогенным материалом.

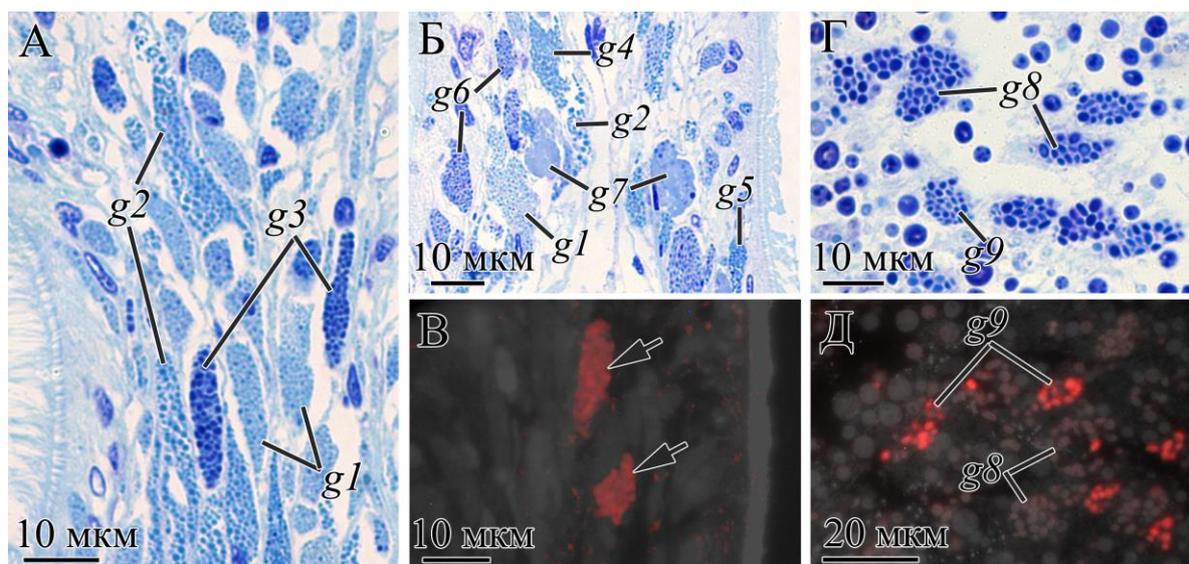


Рисунок 1 – Световые (А, Б, Г) и иммунофлуоресцентные (В, Д) микрофотографии поперечных срезов пищеварительного тракта *Kulikovia alborostrata*. Красный цвет обозначает ТТХ-позитивную реакцию при маркировании антителами против ТТХ. (А) Эпителий буккальной полости. (Б) Эпителий передней кишки. (В) Дистальная 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.

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 (рис. 3 А). Эпидермис представляет собой столбчатый многорядный ресничный эпителий, в составе которого выделяются ресничные и серозные клетки (рис. 3 Б). Кутис включает мускулатуру кутиса, нервные волокна и субэпидермальные (кутисные) железистые клетки (рис. 3 А). Среди железистых клеток кутиса *K. alborostrata* было выявлено 4 типа (gc1–gc4) (табл. 2). Все типы железистых клеток были равномерно распределены в кутисе от головного к хвостовому концу гетеронемертины. Согласно иммуногистохимическим исследованиям, ТТХ-

позитивная метка была обнаружена только в железах кутиса. ТТХ-положительные секреторные гранулы заполняли тела и шейки клеток *gc4* (рис. 3 В), тогда как у *gc1* они выявлялись только в телах клеток (рис. 3 Г). ТТХ-положительные *gc1* обнаружены в прецеребральной области и регионе ротовой полости; в остальных областях тела *gc1* клетки не содержали ТТХ-положительных секреторных гранул.

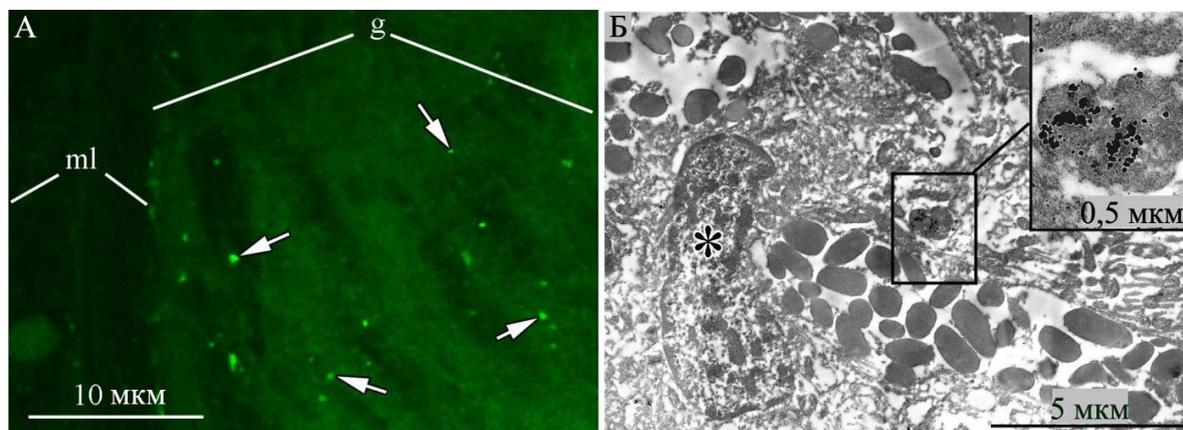


Рисунок 2 – Микрофотографии (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (А) и иммуноэлектронная микроскопия (Б)) поперечных срезов тела немертینی *Kulikovia alborostrata*, окрашенных антителами против ТТХ. (А) Кишечный эпителий с ТТХ-положительными гранулами (стрелки). (Б) Энтероцит (звездочка) с ТТХ-положительной фагосомой в базальной части клетки. Вставка показывает фагосому при большем увеличении. Обозначения: *g* – кишечник, *ml* – мышечный слой.

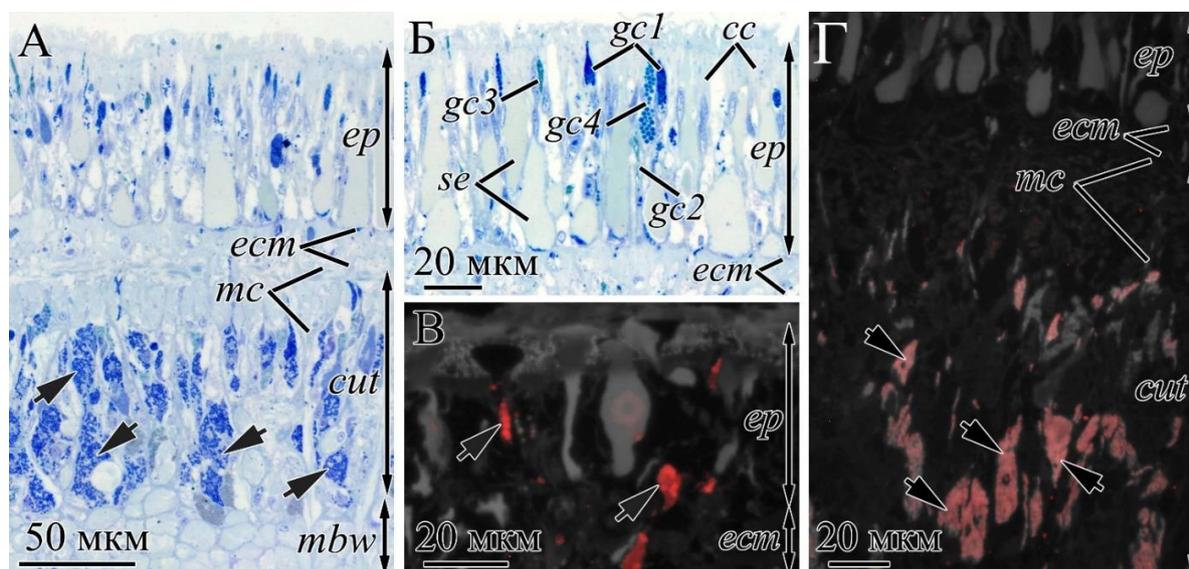


Рисунок 3 – Световые (А, Б) и иммунофлуоресцентные (В, Г) микрофотографии поперечных срезов покровов *Kulikovia alborostrata*. Красный цвет обозначает ТТХ-положительную реакцию при маркировании антителами против ТТХ. (А) Панорамный вид интегумента. (Б) Панорамный вид эпидермиса. (В) ТТХ-положительные цитоплазматические отростки железистых клеток кутиса *gc4* (стрелки). (Г) Покровный эпителий прецеребральной

области с ТТХ-положительными клетками, телами железистых клеток кутисы *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 кутисы; *se* – серозная клетка.

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 образцах немертин, подвергаемых стимуляции, большое количество ТТХ-положительных гранул обнаруживали в шейках субэпидермальных желез в эпидермисе (рис. 4 В, В1). На поверхности эпидермиса присутствовало множество скоплений ТТХ-положительного секрета (рис. 4 Г).

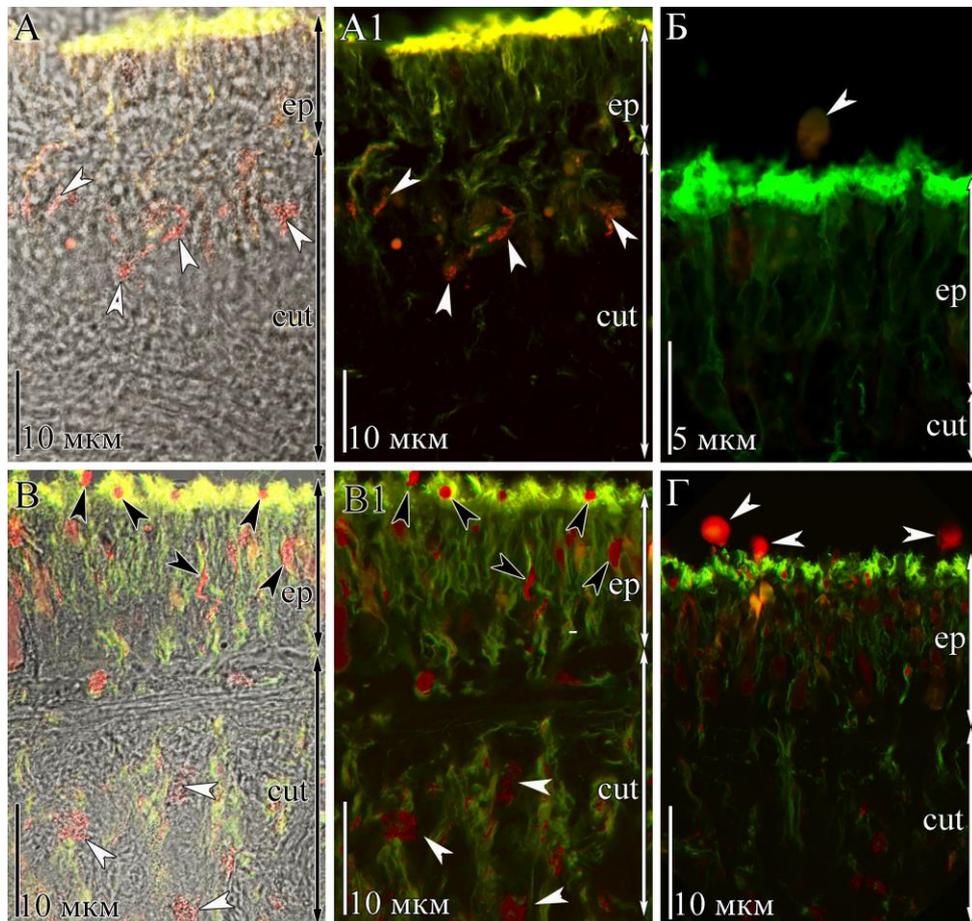


Рисунок 4 – Микрофотографии поперечных срезов стенки тела intactных (А, А1, Б) и подвергнутых стимуляции электрическим током (В, В1, Г) особей *Kulikovia alborostrata*, полученные методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ). Микрофотографии А, В получены с использованием проходящего света. Красный цвет обозначает ТТХ-положительную 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.

ТТХ-содержащие структуры хобота. Хобот это полый, выворачиваемый орган, состоящий из секреторного эпителия, мышц и эндотелия. Секреторный эпителий хобота состоит из железистых и опорных клеток. Среди железистых клеток выделяют пять типов (*gp1–gp5*) (рис. 5 А, Б). Иммуногистохимические исследования показали интенсивное мечение ТТХ в секреторных гранулах *gp4* (рис. 5 В). Слабую ТТХ-позитивную метку имеют эндотелий и мускулатура хобота.

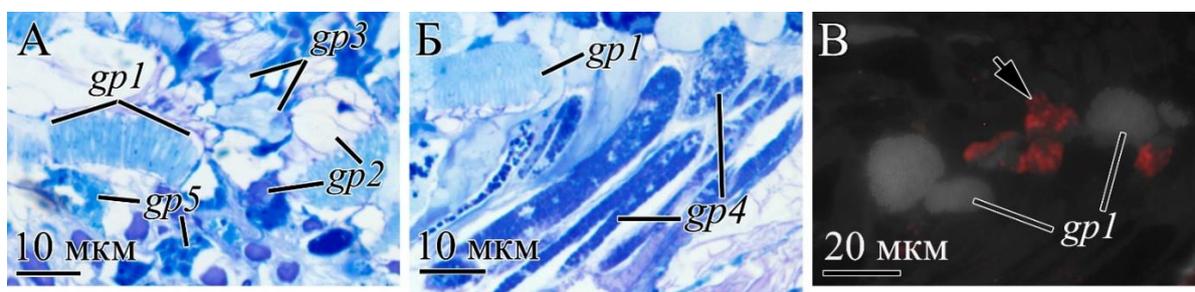


Рисунок 5 – Световые (А, Б) и иммунофлуоресцентная (В) микрофотографии поперечных срезов хобота *Kulikovia alborostrata*. Красный цвет обозначает ТТХ-позитивную реакцию при маркировании антителами против ТТХ. (А, Б) Проксимальная область секреторного эпителия хобота. (В) Секреторный эпителий гребня хобота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

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. 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, на 2 сут концентрация ТТХ превышала LoQ только у трех особей и составляла от 0,21 до 0,63 нг/г. Количество немертин с концентрацией 5,6,11-тридеоксиТТХ выше LoQ увеличивалось на 2 сут стимуляции и падала на 3 сут. 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, у остальных концентрация составляла от 0,15 до 0,62 нг/г. Через 7 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 (до 0,85 нг/г). За 7 мес содержания без доступа пищи немертины экскретировали в среднем 32,71% от общего количества содержащегося в особи ТТХ; в случае 5,6,11-тридеоксиТТХ, все содержащие его особи выпускали с секретом 100% токсина уже при стимуляции на 30 сут.

Обсуждение

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.

Поступление ТТХ и его производных в тело K. alborostrata. Ранее было показано, что 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), а 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. 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. 6) (Vlasenko, Magarlamov, 2023).

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). 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).

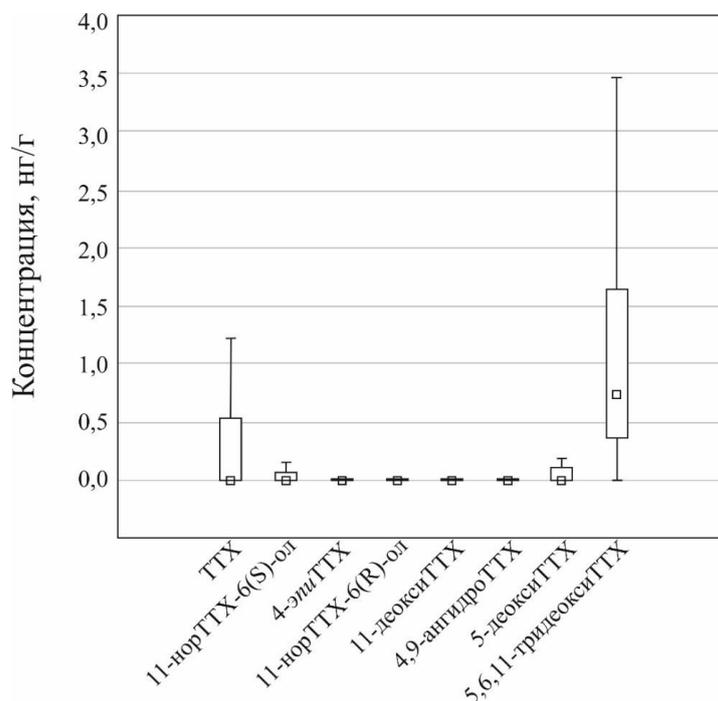


Рисунок 6 – Диаграмма размаха, представляющая медианные концентрации ТТХ и его производных *Kulikovia alborostrata* (n = 36). Нижняя и верхняя границы прямоугольника обозначают 25 и 75 процентиля соответственно; нижние и верхние отрезки отражают изменчивость вне этих процентилей; знак квадрата обозначает медианное значение.

Одним из подтверждений возможности аккумуляции токсинов по трофическим цепям являются исследования, выявившие одинаковое соотношение производных токсинов в некоторых хищниках и их объектах питания (Lopes et al., 2014; Ito et al., 2022). 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 секретирующие клетки и утрачивался с выбросом секрета, о чем говорит тот факт, что через 6 мес он не был обнаружен ни в секрете, ни в теле (Vlasenko et al., 2021). Эти данные являются аргументом в пользу версии их поступления в тело из внешних источников. Окончательное подтверждение было получено путем изучения пищеварительной системы немертин *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. 2 Б). Потенциальные жертвы немуртин, в свою очередь, предположительно, получают ТТХ и его производные с пищей или от симбиотических бактерий-продуцентов токсинов ряда ТТХ (Noguchi et al., 2006a). Обобщенная схема предположительного пути аккумуляции ТТХ и его производных в теле *K. alborostrata* представлена на рисунке 7.

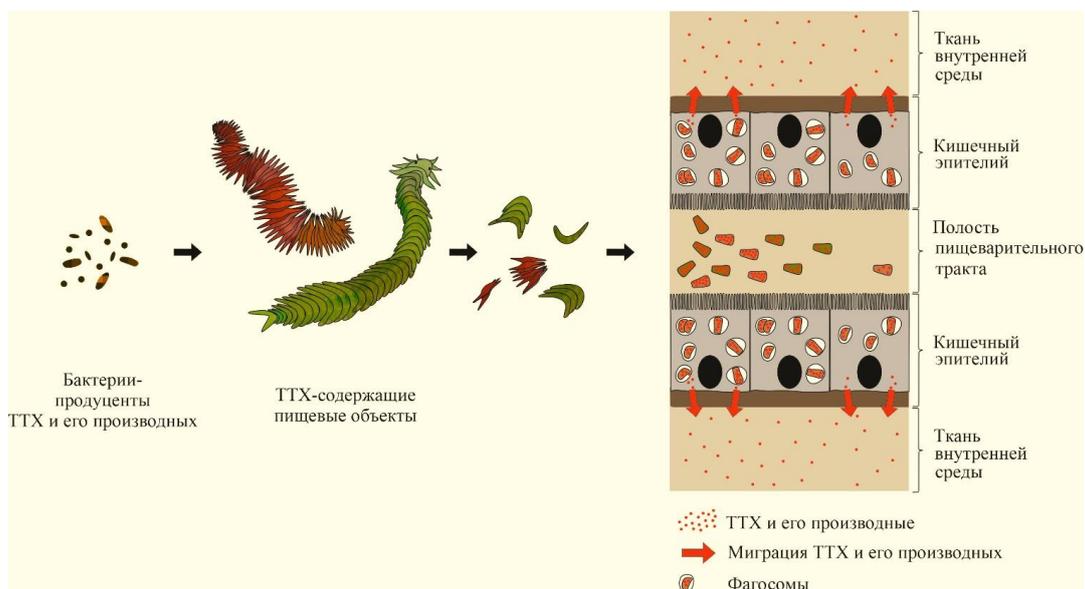


Рисунок 7 – Схема поступления ТТХ и его производных от пищевых объектов в тело *Kulikovia alborostrata* посредством фагоцитарной активности энтероцитов.

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 выявило высокую концентрацию 5,6,11-тридеоксиТТХ в прецеребральной и ротовой областях *K. alborostrata* (рис. 8), что, вероятно, может быть связано с неравномерным распределением ТТХ-положительных клеток *gs1*: 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). Содержание токсинов ряда ТТХ в железистых клетках кишечника ТТХ-содержащих организмов показано в настоящем исследовании впервые.

Функционирование структур, содержащих ТТХ и его производные у K. alborostrata. В настоящей работе показано, что в орудии охоты немуртин, хоботе, ТТХ-позитивные клетки расположены в «эпителиальном гребне» секреторного эпителия (рис. 5 В). 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-положительные железистые клетки хобота gr4 играют роль в иммобилизации жертвы.

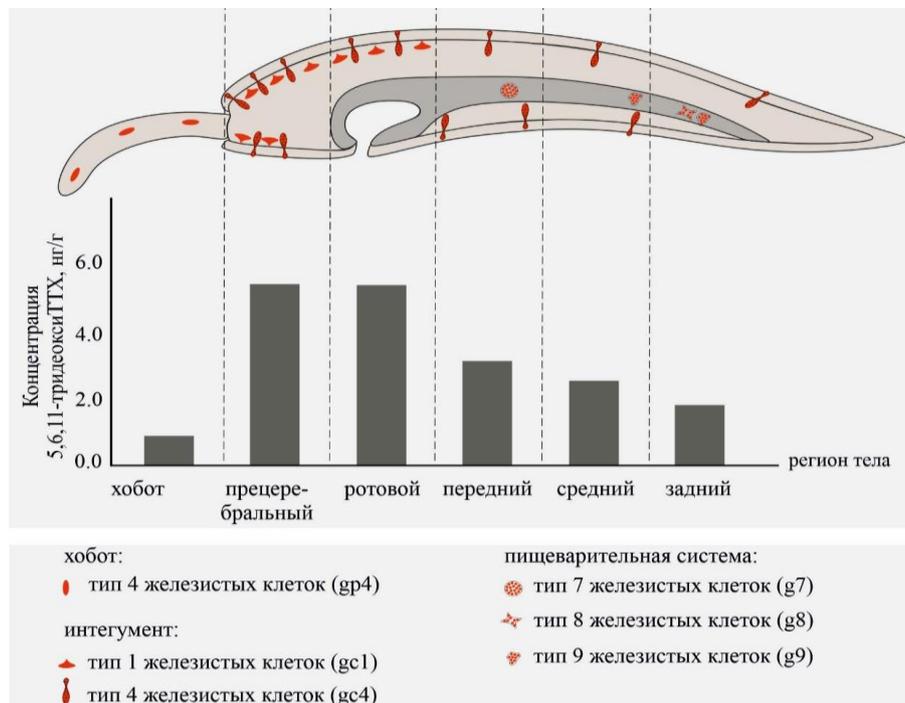


Рисунок 8 – Распределение 5,6,11-тридеоксиТТХ согласно данным ВЭЖХ-МС/МС в различных отделах тела *Kulikovia alborostrata*, а также локализация ТТХ-положительных клеток, выявленных методом иммуногистохимического анализа.

В текущем исследовании был смоделирован процесс реализации механизмов защиты у *K. alborostrata* (Vlasenko et al., 2021). Количество токсинов ряда ТТХ, экскретируемых на поверхность тела, 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. 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 кутикса во внешнюю среду (рис. 9). На основании того, что иммуногистохимическое окрашивание у клеток gc4 выявило окрашивание ТТХ в выводных протоках и папилле, а у gc1 – только теле клеток, можно сделать вывод о том, что у ТТХ-содержащих немертин токсин-содержащие железистые клетки кутикса именно типа gc4 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. 9). В то же время несмотря на то, что *gc1* являются местами локализации ТТХ и его производных, экскреция токсинов для них не показана.

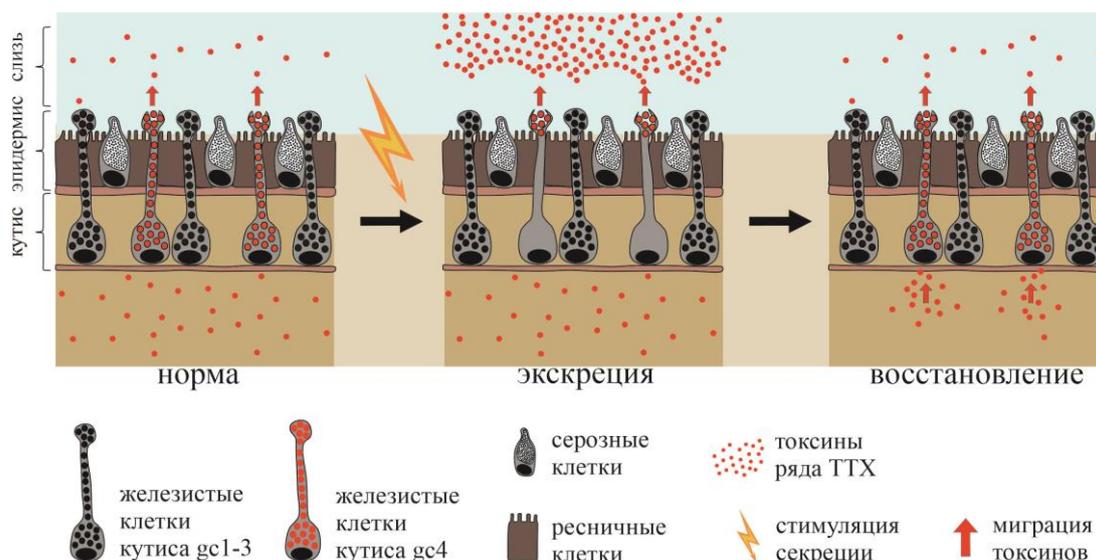


Рисунок 9 – Схематичное изображение экскреции тетродотоксина (ТТХ) и его производных из железистых клеток покровов немертин в норме и при стимуляции, и их последующего восстановления.

Исследование концентрации токсинов ряда ТТХ в слизи *K. alborostrata* показало снижение их концентрации к третьему дню стимуляций секреции. После этого, через 30 сут содержания немертин в отсутствие 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 на 7 мес показал, что в теле сохранялось в среднем 67% ТТХ от изначального количества. 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. Ранее 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), а также формировать микробиоту кишечника и способствовать ее изменению для противостояния стрессовым условиям (Wassel et al., 2024). Для достоверного выявления

функции секретлируемых 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 немертин *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 секретлирующие 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 куписа *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 немертин 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 gr4.
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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ:

1. **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. V. 13. Article No. 606. doi: 10.3390/toxins13090606.
2. **Vlasenko A.E.**, Magarlamov T.Yu. Tetrodotoxins in ribbon worms *Cephalothrix cf. simula* and *Kulikovia alborostrata* from Peter the Great bay, Sea of Japan // *Toxins*. 2023. V. 15. Article No. 16. doi: 10.3390/toxins15010016.
3. **Vlasenko A.E.**, Pereverzeva A.O., Velansky P.V., Magarlamov T.Yu. 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. V. 16. Article No. 186. doi: doi.org/10.3390/toxins16040186.

Работы, опубликованные в материалах региональных и международных научных конференций:

1. **Vlasenko A.E.**, Petrova I.Yu., Magarlamov T.Yu. Search for tetrodotoxin and its analogues in some nemertean species from the Sea of Japan, Russia // Abstracts of the International Conference «9th International Conference on Nemertean Biology in List auf Sylt», August 13–17, List auf Sylt, Germany. – List auf Sylt: Universitat Bonn, 2018. P. 40.
2. **Власенко А.Е.**, Кузнецов В.Г. Роль низкомолекулярных токсинов гуанидинового ряда в поведенческих стратегиях морских червей типа Nemertea // XVIII Международная научно-практическая конференция «Advances in Science and Technology»: материалы коференции, 31 января 2019 г., Москва, Россия. – Москва: Научно-издательский центр «Актуальность.РФ», 2019. С. 10–11.
3. **Vlasenko A.E.**, Kuznetsov V.G., Pereverzeva A.O., Malykin G.V., Magarlamov T.Yu. Tetrodotoxins secretion and voltage-gated sodium channel adaptation in ribbon worm *Kulikovia alborostrata* (Takakura, 1898) (Nemertea) // Abstracts of the International Conference «Marine Biology in the 21st Century: Achievements and Development Outlook (in commemoration of the 100th anniversary of the birth of academician Alexey V. Zhirmunsky)», October 6–8, 2021, Vladivostok, Russia. – Vladivostok: NSCMB FEB RAS, 2021. P. 210–211.

ВЛАСЕНКО АННА ЕВГЕНЬЕВНА

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

1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук