



УДК 593.1:591.4

## РАЗНООБРАЗИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТИПОВ У ГАПЛОТИПА H4 PLASOZOA SP.

© 2019 г. Д. Ю. Романова

Институт морских биологических исследований имени А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия  
E-mail: [driaromanova@yandex.ru](mailto:driaromanova@yandex.ru)

Поступила в редакцию 11.01.2019; после доработки 15.02.2019;  
принята к публикации 18.03.2019; опубликована онлайн 31.03.2019.

Эволюционная ветвь Пластинчатых (Placozoa) имеет большое значение для понимания происхождения и эволюции Metazoa. Представители типа Placozoa обладают простым строением тела, однако полное отсутствие органов, нервной системы и мышечных клеток резко контрастирует с достаточно сложными поведенческими реакциями, в том числе динамическими изменениями формы тела. Известно 19 гаплотипов Placozoa, включающих два вида — *Trichoplax adhaerens* (H1) и *Hoilungia hongkongensis* (H13) — и пока ещё малоисследованные штаммы, обозначаемые как H2–H19 Placozoa sp. Хотя все Placozoa имеют похожий фенотип (пластинчатую дископодобную форму тела), анализ клеточной организации был сделан только для H1 (*Trichoplax adhaerens*) с идентификацией шести типов клеток. В этой работе мы, используя конфокальную и электронную микроскопию, исследовали организацию штамма H4, который близок к новому роду — *Hoilungia*. У H4 обнаружены все шесть основных типов клеток, идентифицированных ранее у H1. Между тем мы выявили у штамма H4 большее разнообразие клеток по форме, плотности и, впервые, по мембранному потенциалу митохондрий, чем ранее было описано для H1. Это позволяет нам подчеркнуть важность объединения методов молекулярно-генетических исследований и микроскопии для уточнения клеточной систематики, включая параметры митохондриальной активности для классификации клеток и их состояний. Сравнительно-эволюционное изучение клеточных типов у разных экологических групп Placozoa и их сопоставление с функциями расширяют понимание того, как относительно простой организм формирует сложное поведение и как типы клеток эволюционируют.

**Ключевые слова:** *Trichoplax adhaerens*, *Hoilungia*, Placozoa, эволюция, типы клеток

Изучение типа Пластинчатых, или Placozoa, имеет большое значение для понимания происхождения и эволюции Metazoa в целом и возникновения нервных систем в частности [9, 15, 17, 25]. К сожалению, это один из наименее исследованных пяти мегатаксонов, или эволюционно наиболее древних линий животных, т. н. Basal Metazoa [25].

До 2018 г. считалось, что *Trichoplax adhaerens* является единственным представителем типа Placozoa [9]. Ранее были выделены 19 гаплотипов, собранных в лабораторные коллекции из тропических и субтропических вод Мирового океана [2, 8, 26]. Штаммы обозначали как H1–H19 по мере выделения и культивирования [5, 6, 8, 22]. В частности, H1 относится к исходному гаплотипу, описанному Греллем в 1971 г. [10, 11, 12, 13, 14]. Штамм H13 ранее считали одним из гаплотипов Placozoa, составляющих кладу V [8], однако более подробный анализ его генома привёл к пересмотру систематического положения. В результате клоновая линия H13 была выделена в отдельный род *Hoilungia hongkongensis* [9]. Культивируемый нами штамм H4 находится в одной клade с новым родом *Hoilungia* [8]; также он может быть отдельным видом, отличным от *Trichoplax adhaerens*.

По общему плану клеточного строения все штаммы похожи — уплощённая форма тела, напоминающая несимметричную пластину, а также меняющиеся длина (от 0,1 до 2–3 мм) и толщина (от 15 до 40 мкм) [1, 14, 19, 21]. Тело животных состоит примерно из 50 тысяч клеток [24], относящихся к шести основным типам, которые формируют три слоя. Нижний слой представлен вентральным эпителием и контактирующими с ним липофильными и железистыми типами клеток, верхний — дорзальным эпителием; средний слой — это волокнистый и кристаллический типы клеток [24]. По данным Серавина, у особей из природной среды дорзальный слой имеет «блестящие шары» [1]; у культивируемых штаммов они обнаружены не были [24]. Тело животных может принимать различную форму в процессе жизнедеятельности и движения — от дископодобной [11, 12, 14] до вытянутой, содержащей многочисленные инвагинации или фестончатый край [20, 23, 24]. Форма тела зависит от слаженности работы как вентрального, так и дорзального слоя [3].

Между тем по результатам, полученным при секвенировании единичных клеток, возможно предположить, что у представителей типа Placozoa может быть до 30–50 типов клеток [18]. Это расширяет круг вопросов, связанных с биологией Placozoa, поскольку объект исследования обладает сложными поведенческими реакциями и способен к половому воспроизведению [3, 4, 7]. Филогенетические отличия всех штаммов Placozoa предполагают различия в морфологии типов клеток, поведения и экологии, однако эти параметры не исследовались для штамма H4 Placozoa sp.

Метод сканирующей электронной микроскопии ранее был применён только для изучения строения штамма Грелля — H1 [24]. Основной упор исследователи делали на методы трансмиссионной электронной и лазерной сканирующей микроскопии [7, 20, 24]. В результате были получены подробные данные по морфологии основных пяти типов клеток и выявлен новый, шестой тип — кристаллический.

Задачами настоящего исследования были изучение разнообразия клеточных типов и их идентификация с помощью методов сканирующей электронной и лазерной сканирующей микроскопии для лабораторного штамма H4 Placozoa sp., принадлежащего, возможно, к роду *Hoilungia*. Все шесть основных типов клеток были найдены у H4. Мы обнаружили значительно большее разнообразие клеток по форме, плотности и, впервые, по мембранному потенциалу митохондрий у H4, чем ранее было описано для H1.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Культивация.** В работе использован штамм Placozoa sp. H4 (HWH-B, штамм, найденный на Гавайях). Животных содержали при постоянной температуре ( $28 \pm 2$ ) °C в 20-литровом аквариуме. В качестве субстрата использовали зелёную водоросль *Tetraselmis marina* и цианобактерии *Leptolyngbya ectocarpus* и *Spirulina versicolor*. Поддержание жизнеспособности культуры животных включает замену искусственной морской воды с солёностью 35 ‰ (artificial sea water, далее — ASW) каждые 10 дней с сохранением значений pH в диапазоне 7,6–8,2. Перед экспериментами особей отсаживали на стерильную чашку Петри и промывали ASW трижды, затем помещали в пробирку типа Эппендорф объёмом 1,5 мл.

**Лазерная сканирующая микроскопия.** Для протокола прижизненного окрашивания митохондрий в пробирки с десятью особями, трижды промытыми искусственной морской водой, добавляли 40 мкл 1 mM MitoTracker Orange (Sigma, США) к 100 мкл ASW и инкубировали 25 минут. Далее особей штамма H4 фиксировали в прогретом до 41 °C 4%-ном параформальдегиде на воде ASW 1 ч, затем инкубировали в течение 16 ч при температуре 41 °C. Трижды промывали в 100 мкл 0,1 M PBS (pH 7,4) (натрий-фосфатный буфер) по 20 минут, затем — в 100 мкл PBT (натрий-фосфатный буфер) в течение 20 минут, далее — трижды в 100 мкл PBS по 5 минут. После добавляли 40 мкл 26,4 нМ фаллоидина (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin, Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали в течение 40 минут. Далее образцы трижды отмывали в 100 мкл PBS по 5 минут.

Окрашивание DAPI (Carl Roth, Германия, 1:1000, 10 мкл·мл<sup>-1</sup>) проводили в 100 мкл раствора PBS. Животных монтировали на предметном стекле с помощью 20 мкл ProLong™ Gold Antifade (Thermo Fisher Scientific, США).

Образцы исследовали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Carl Zeiss Microscopy LSM 710 с объективом Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27 immersion lens (Zeiss, Германия). Изображения получены с помощью программного пакета ZEN (blue edition) (Zeiss, Германия). Обработка изображений проведена с использованием ZEN (blue edition), Imaris, ImageJ. Профили интенсивности построены при идентичных условиях получения изображения. Интенсивность сопоставляется с расстоянием по снимкам, что обозначается красной полосой на панелях профилей для трёх использованных красителей — DAPI, MitoTracker Orange, Alexa Fluor™ 488 Phalloidin.

**Сканирующая электронная микроскопия.** Животных без заметных морфологических изменений отсаживали в чашку Петри. Трижды промывали средой ASW, затем фиксировали в 2,5%-ном глютаральдегиде, приготовленном на среде ASW. Для штамма H4 на данном этапе использовали прогретый до 41 °C раствор этого же фиксатора. Затем образцы трижды промывали раствором 0,1 М PBS (pH 7,4) по 10 минут. Вторичную фиксацию проводили с использованием солевого буфера (0,9 М NaCl, 0,2 М какодилата натрия (pH 7,4), 1 % OsO<sub>4</sub>) в течение часа. Образцы обезвоживали в серии растворов ацетона восходящей концентрации (30, 50, 70, 80, 90, 95 и 100 %), выдерживая по 5 минут в каждом. Сушку в критической точке проводили на установке CPD 030 (Balzers). Образцы исследовали на сканирующем электронном микроскопе Quanta 250 (FEI, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Клетки тела животного формируют три чётко выраженных слоя — дорзальный и вентральный эпителий и заключённый между ними промежуточный средний слой, как и у *Trichoplax adhaerens* (H1) [24]. Вентральный слой представлен эпителиальными и плотно прилегающими к ним липофильными клетками (рис. 1А, С, Е). Эпителий характеризуется наличием ресничек и микроворсинок (рис. 1А, чёрные стрелочки).

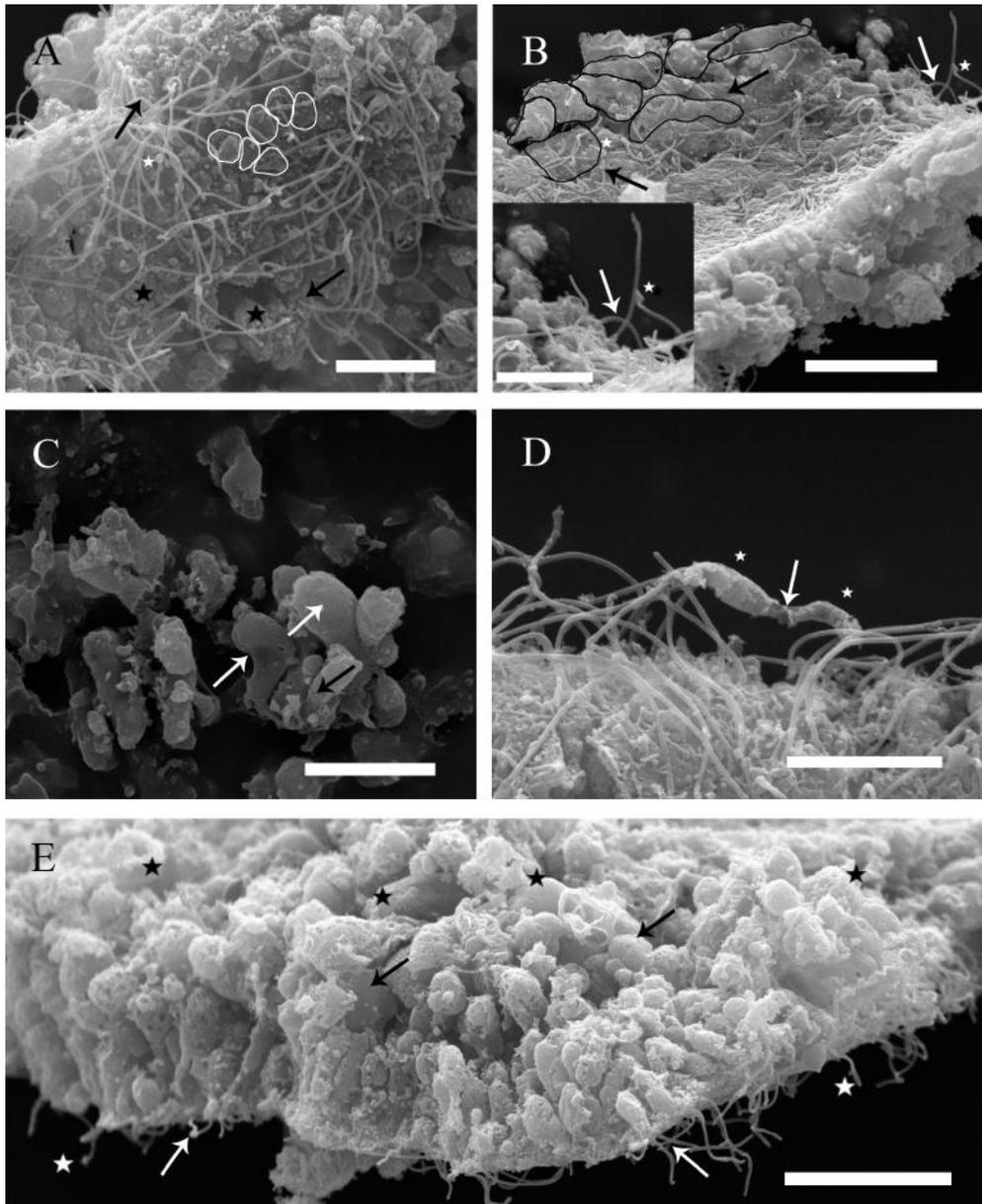
Дорзальный слой тоже состоит из эпителиальных клеток (рис. 1В). Широкая поверхность клеток обращена во внешнюю среду (рис. 1В, чёрные стрелочки) и характеризуется наличием реснички (рис. 1В, белая стрелочка). Некоторые реснички вентрального (рис. 1А, Е) и дорзального (рис. 1В) слоёв имеют на своем конце утолщения различной формы, предполагаемые рецепторы, хотя здесь не исключены артефакты фиксации при приготовлении препаратов для электронной микроскопии.

Волокнистые клетки располагаются в среднем слое животного, непосредственно под дорзальным эпителием. Клетки имеют отростки, контактирующие с отростками других волокнистых клеток (рис. 1D, белая стрелочка).

У штамма H4 был найден кристаллический тип клеток. Эти клетки расположены рядами по всему телу животных (рис. 2А) (в противоположность тому, что у H1 они концентрируются в области краевого эпителия [24]).

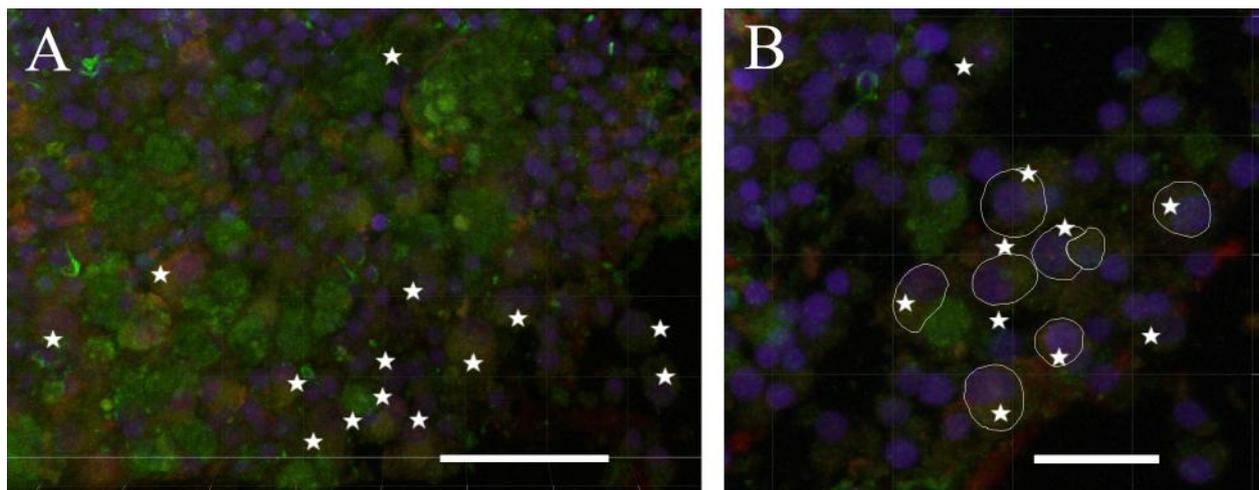
Используя профили интенсивности флуоресценции трёх красителей, мы обнаружили различия в распределении ядер, мембранного потенциала митохондрий и актиновых волокон в клетках различных слоёв животного (рис. 3, 4). Отмеченная гетерогенность в активности мембранного потенциала митохондрий в разных слоях клеток (рис. 3А, В) предполагает использование в дальнейшем биоэнергетических параметров для более детальной классификации типов клеток у Placozoa.

Рис. 4 показывает пищеварительную полость для штамма H4 (белые звёздочки). Одна из полостей содержит четыре клетки микроводоросли *Tetraselmis marina* (рис. 4, верхний правый угол) и частично переваренные клетки (рис. 4, маленькие стрелочки). Полости не содержат ядер и актиновых филаментов и не показывают наличие мембранного потенциала митохондрий, что указывает на активное пищеварение и на повреждение микроводорослей.



**Рис. 1.** Сканирующая электронная микроскопия основных типов клеток штамма H4 у Placozoa: A — внешняя поверхность вентральных эпителиальных клеток (чёрными звёздочками показаны поверхности эпителиальных клеток, чёрными стрелочками — реснички, белым цветом обведены поверхности клеток); B — дорзальные эпителиальные клетки (чёрными стрелочками показана поверхность эпителиальных клеток, белой стрелочкой — реснички, белые звёздочки показывают возможные рецепторы, чёрным цветом обведены поверхности клеток); C — липофильные клетки показаны белыми стрелочками, чёрной стрелочкой отмечены эпителиальные клетки; D — волокнистый тип клеток с отростками отмечен двумя звёздочками, десмосомальный контакт показан белой стрелочкой; E — расположение слоёв различных типов клеток от вентрального эпителия (снизу) к дорзальному (сверху), чёрными стрелочками отмечен средний слой клеток, белыми стрелочками показаны реснички, белыми звёздочками отмечены возможные рецепторы, чёрными звёздочками показаны железистые клетки. Размерные шкалы: A, D, вставка на B — 5 мкм; B, C, E — 10 мкм

**Fig. 1.** Scanning electron microscopy of the major cell types in H4 haplotype of Placozoa: A – ventral epithelium (black stars show the outer surface of the epithelium cells, black arrows show cilia, white circled cell surfaces); B – the upper layer of the dorsal epithelium (black arrows show the surface of epithelial cells, white arrows – cilia, black circled – cell surface); C – the lipophils are shown by white arrows, black arrow shows epithelial cells; D – two asterisks label fiber cell types with processes, desmosomal contact is shown with a white arrow; E – the overview of different cell layers (the ventral epithelium – bottom, the dorsal – top), black arrows indicate the middle layer of cells, white stars show cilia and putative receptors of ventral epithelium, black stars show gland cells. Scale bars: A, D, sidebar on B – 5 µm; B, C, E – 10 µm



**Рис. 2.** Лазерная сканирующая микроскопия кристаллического типа клеток. Распределение клеток в теле животного показывает, что этот тип клеток может находиться у штамма H4 не только в зоне краевого эпителия, но и за его пределами (звёздочки — кристаллический тип клеток). Синий цвет — ядра, окрашенные DAPI; красный — митохондрии, окрашенные MitoTracker Orange; зелёный — актиновые филаменты, окрашенные Alexa Fluor™ 488 Phalloidin. Размерные шкалы: А — 20 мкм, В — 10 мкм

**Fig. 2.** Laser scanning microscopy of the crystal cell type. The distribution of cells in the animal body shows that this cell type was broadly distributed along the entire body of the H4 haplotype, and the crystal cells (stars) are not exclusively restricted to the marginal epithelium zone as in H1. Blue – nucleus stained by DAPI; red – mitochondria stained by MitoTracker Orange; green – actin filaments visualized by Alexa Fluor™ 488 Phalloidin. Scale bars: A – 20  $\mu\text{m}$ , B – 10  $\mu\text{m}$

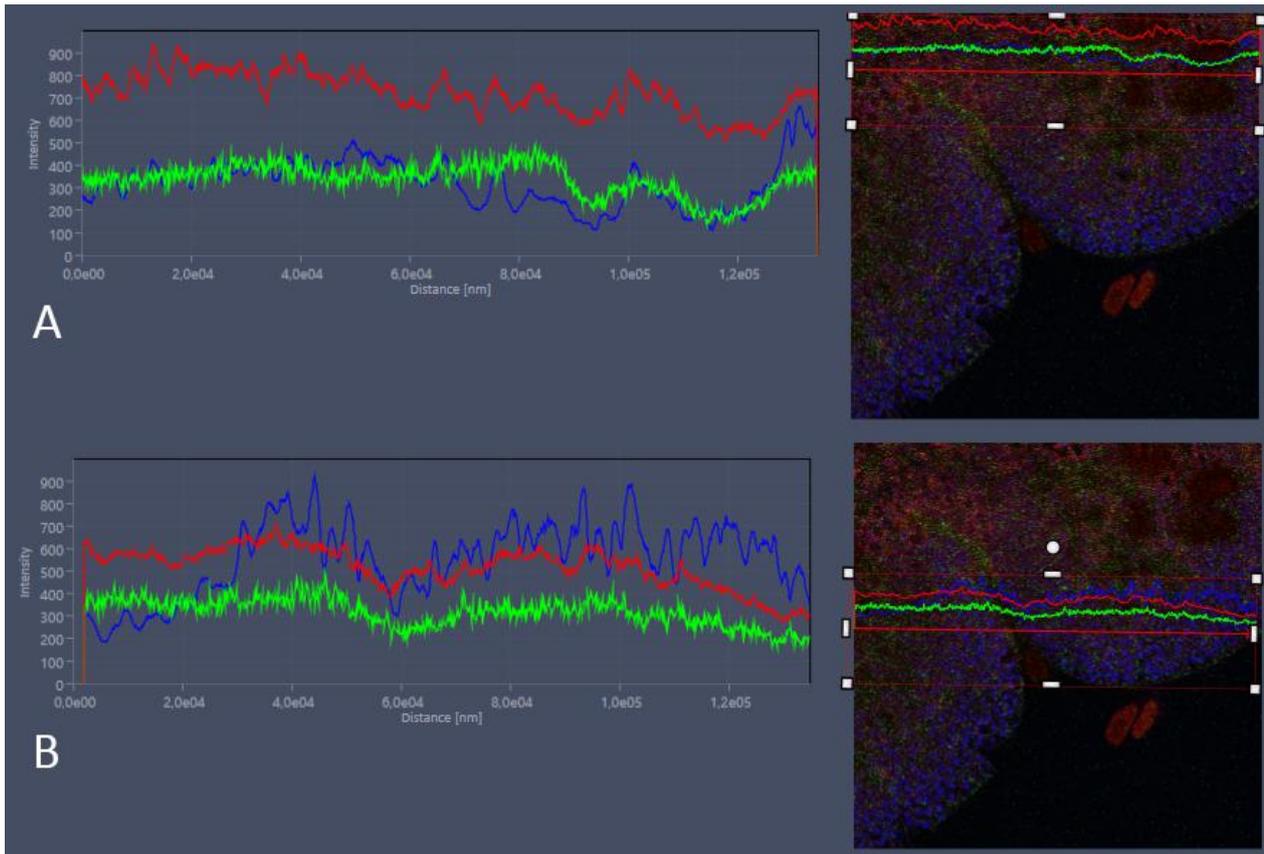
## ОБСУЖДЕНИЕ

Эволюционная ветвь Пластинчатых имеет большое значение для понимания происхождения и эволюции Metazoa [8]. Представители типа Placozoa обладают простым строением тела (у них нет органов, нервной системы и мышечных клеток), однако демонстрируют достаточно сложные поведенческие реакции [20, 23, 24]. Известно 19 гаплотипов Placozoa, среди которых на данный момент выделены два вида: *Trichoplax adhaerens* (H1) и *Hoilungia hongkongensis* (H13). Точная систематика других гаплотипов ещё не стандартизирована, и здесь они обозначаются как Placozoa sp. [9].

Представители всех 19 штаммов Placozoa обладают практически идентичным фенотипом — пластинчатой дископодобной формой тела. В процессе поиска пищи Placozoa могут скоординированно двигаться в заданном направлении с помощью инвагинаций краевого эпителия. Каким образом, не имея мышц и нейронов, животные с помощью шести типов клеток могут организованно и синхронно передвигаться? Вентральные эпителиальные клетки вертикально вытянуты; с краевой стороны они имеют по одной ресничке и микроворсинке, которые участвуют в передвижении и питании животного [20, 23, 24].

Слои вентрального и дорзального эпителия имеют переходную морфологию в краевой зоне (форма клеток там — грушевидная) (рис. 1А, Е). Именно краевой эпителий участвует в формировании инвагинаций при движении животных (рис. 4). Важно отметить, что наличие на вентральном и дорзальном слоях некоторого количества ресничек с утолщениями позволяет предположить, что это могут быть рецепторы (рис. 1А, В, Е). И всё же не исключено, что это артефакты фиксации во время приготовления препаратов для электронной микроскопии. Данные требуют дальнейшего исследования.

Наибольший интерес представляют волокнистые клетки. Ранее было сделано предположение, что именно они участвуют в процессе изменения формы тела животного [11, 20, 23, 24]. Вероятно, координация движений возможна за счёт множества контактов отростков волокнистых клеток (рис. 1D). Между собой клетки соединены десмосомами (рис. 1D, белая стрелочка).

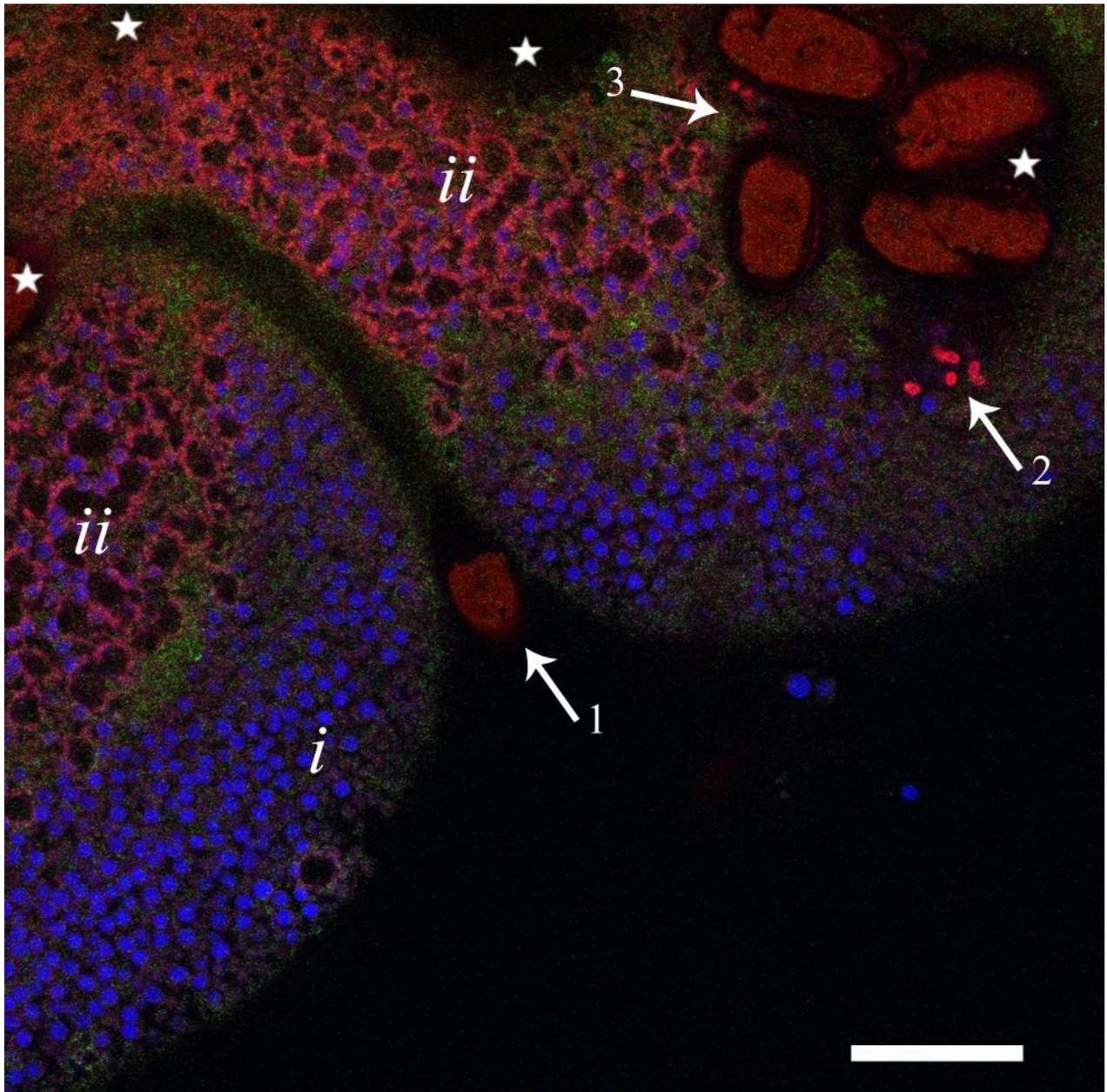


**Рис. 3.** Профили интенсивности флюоресценции для разных клеточных маркеров у H4 (*Placozoa* sp.). Профили интенсивности построены при идентичных условиях получения изображения. Интенсивность (ось Y) сопоставляется с расстоянием (ось X) по снимкам, что обозначено красной полосой на панелях профилей для трёх использованных красителей. Синий цвет — ядра, окрашенные DAPI; красный — митохондрии, окрашенные MitoTracker Orange; зелёный — актиновые филаменты, окрашенные Alexa Fluor™ 488 Phalloidin

**Fig. 3.** The intensity profiles of different fluorescent cellular markers in H4 (*Placozoa* sp.). Intensity profiles are built under identical imaging conditions. The intensity (Y-axis) is compared to the distance (X-axis) from the confocal images, which is indicated by the red stripe in the profile panels for each of the three dyes used in this study. Blue – nucleus stained by DAPI; red – mitochondria stained by MitoTracker Orange; green – actin filaments visualized by Alexa Fluor™ 488 Phalloidin

Секреторную функцию выполняют железистые клетки сферической формы (рис. 1E) с липидосодержащими гранулами, основная функция которых связана с продукцией пищеварительных ферментов и компонентов, участвующих в активации сигнальных молекул [24]. Для всех штаммов показано схожее строение железистого типа клеток. Клетки этого типа, располагающиеся в среднем слое, важны для процесса питания. У животных образуются пищеварительные полости (рис. 4), и, вероятно, с ними непосредственно контактируют железистые клетки, обеспечивая процесс пищеварения.

Новым идентифицированным типом были кристаллические клетки, найденные у штамма Грелля — H1 [24]. Их основными маркерами являются включение кристалла арагонита, плотно охваченное двумя митохондриями, расплюснутое ядро и минимальное содержание клеточных включений [16]. Майорова и соавторы предполагают, что кристаллические клетки играют роль рецепторов гравитации и участвуют в ориентации тела животного в пространстве [16]. Нами замечено, что данный тип клеток может находиться не только в краевой зоне (20 мкм), как отмечалось ранее [24], но и по всей площади дорзальной стороны животного (рис. 2A, распределение клеток показано белыми звёздочками).



**Рис. 4.** Организация типов клеток *Placozoa* sp. (гаплотип H4), выявленная тремя красителями (ядерный DAPI — синий; MitoTracker Orange — красный; F-актин / Alexa Fluor™ 488 Phalloidin — зелёный). На фотографии заметна пищеварительная полость с *Tetraselmis marina* (белые звёздочки); некоторые из водорослей частично переварены. Стрелочки 2, 3 — возможно, митохондрии или хлоропласты из полупереваренной клетки водоросли. Стрелочка 1 указывает на *T. marina* вблизи инвагинации краевого слоя животного. Белые звёздочки указывают на пищеварительные полости. Краевой эпителиальный слой содержит множество плотно упакованных клеток с низкой интенсивностью окрашивания мито-маркера (*i*, возможно, с низким митохондриальным потенциалом). С помощью мито-трекера мы идентифицировали два типа клеток — эпителиальные клетки (*i*) и волокнистые клетки (*ii*). Митохондрии в волокнистых клетках локализуются на периферии, а в эпителиальных клетках находятся вблизи ядер. Размерная шкала — 20 мкм

**Fig. 4.** Regional organization of cell types in *Placozoa* sp. (H4 haplotype) as revealed by three fluorescent markers (nuclear DAPI – blue; MitoTracker Orange – red; F-actin by Alexa Fluor™ 488 Phalloidin – green). A digestive cavity with *Tetraselmis marina* is noted (white stars); some of algae are half-digested. Arrows 2, 3 – possible mitochondria or chloroplasts from semi-digested algal cells. Arrow 1 indicates *T. marina* near to invagination of the lateral edge in H4. White stars point out digestive cavities. Marginal epithelial layer contains numerous densely packed cells with low intensity of labeling of the mito-tracker. Using the mito-tracker we can distinguish two types of cell – epithelial cells (*i*) and fiber cells (*ii*). Mitochondria are localized at the periphery of the fiber cells, whereas in epithelial cells mitochondria are located near the nucleus. Scale bar is 20 μm

Основные типы клеток у *Trichoplax adhaerens* (Placozoa), в том числе новый, шестой тип (кристаллические клетки для штамма Грелля), подробно описаны в [24]. Мы провели микроскопические исследования на штамме Н4 вида Placozoa sp. Анализ микрофотографий и сравнение с исследуемыми ранее штаммами Placozoa показали, что морфологически гаплотипы Н1, Н2 и Н4 по основным типам клеток не различаются. Все основные типы клеток были найдены у штамма Н4. Отметим, что гетерогенность клеток по мембранному потенциалу митохондрий была показана впервые для Placozoa. Мы также описали пищеварительные полости — без клеточных структур, но иногда с одной или несколькими клетками водорослей (рис. 4).

**Заключение.** В этой работе мы исследовали морфологические различия между двумя штаммами Placozoa — Н1 (*Trichoplax adhaerens*) и Н4. Ранее филогенетический анализ показал разделение всех штаммов на семь основных групп. Важно отметить, что исследуемый нами Н4 находится в одной кладе со штаммом Н13, который недавно был выделен в новый род *Hoilungia hongkongensis*.

Placozoa sp. характеризуется кажущейся простотой строения, однако в ходе исследования морфологии шести основных клеточных типов мы обнаружили значительно большее разнообразие клеток по их форме и возможной внутриклеточной активности митохондрий у Н4, чем ранее было описано для Н1. Это позволяет подчеркнуть важность объединения методов молекулярно-генетических исследований и микроскопии для уточнения клеточной систематики и для её интерпретации. Сравнительно-эволюционное изучение клеточных типов у разных экологических групп Placozoa и их сопоставление с функциями конкретных типов клеток расширяют понимание того, как относительно простой организм формирует сложное поведение и как типы клеток эволюционируют.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства РФ (грант № 14. WO3.31.0015).*

**Благодарность.** Работы по микроскопированию выполнялись в ЦКП «Ультрамикрoанализ» при ФГБУН ЛИН СО РАН (г. Иркутск) и в ЦКП «Таксон» при ЗИН РАН (г. Санкт-Петербург). Авторы благодарны В. В. Старунову (ЗИН РАН) за помощь в подготовке образцов перед микроскопированием и М. А. Никитину (НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, МГУ, г. Москва) — за предоставление штамма Н4 Placozoa sp.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Серавин Л. Н., Гудков А. В. *Trichoplax adhaerens* (тип Placozoa) – одно из самых примитивных многоклеточных животных. Санкт-Петербург : ТЕССА, 2005. 69 с. [Seravin L. N., Gudkov A. V. *Trichoplax adhaerens* (Placozoa) — одно из самых примитивных многоклеточных животных. Санкт-Петербург: TESSA, 2005, 69 p. (in Russ.)]
2. Aleoshin V. V., Konstantinova A. V., Nikitin M. A., Okshtein I. L. On the genetic uniformity of the genus *Trichoplax* (Placozoa). *Russian Journal of Genetics*, 2004, vol. 40, no. 12, pp. 1423–1425. <https://doi.org/10.1007/s11177-005-0015-y>
3. Armon S., Bull M., Aranda-Diaz A., Prakash M. Ultra-fast contractions and emergent dynamics in a living active matter – the epithelium of the primitive animal *Trichoplax adhaerens*. *Biophysical Journal*, 2018, vol. 114, no. 3, pp. 649a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.11.3503>
4. Belahbib H., Renard E., Santini S., Jourda C., Claverie J. M., Borchiellini C., Le Bivic A. New genomic data and analyses challenge the traditional vision of animal epithelium evolution. *BMC Genomics*, 2018, vol. 19, no. 1, pp. 393. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4715-9>
5. DeSalle R., Schierwater B. *Key Transitions in Animal Evolution* / DeSalle R., Schierwater B. (Eds). Boca Raton, FL: CRC Press, 2010, 446 p.
6. Eitel M., Schierwater B. The phylogeography of the Placozoa suggests a taxon rich phylum in tropical and subtropical waters. *Molecular Ecology*, 2010, vol. 19, no. 11, pp. 2315–2327. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04617.x>
7. Eitel M., Guidi L., Hadrys H., Balsamo M., Schierwater B. New insights into placozoan sexual reproduction and development. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 5, pp. e19639.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019639>
8. Eitel M., Osigus H.J., DeSalle R., Schierwater B. Global diversity of the Placozoa. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 4, pp. e57131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057131>
  9. Eitel M., Francis W.R., Varoqueaux F., Daraspe J., Osigus H.J., Krebs S., Vargas S., Blum H., Williams G.A., Schierwater B., Wörheide G. Comparative genomics and the nature of placozoan species. *PLoS Biology*, 2018, vol. 16, no. 7, pp. e2005359. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005359>
  10. Grell K.G. *Trichoplax adhaerens* F.E. Schulze und die entstehung der Metazoen. *Naturwissenschaftliche Rundschau*, 1971, vol. 24, pp. 160–161.
  11. Grell K.G., Benwitz G. Die Ultrastruktur von *Trichoplax adhaerens* F.E. Schulze. *Cytobiologie*, 1971, vol. 4, pp. 216–240.
  12. Grell K.G. Eibildung und furchung von *Trichoplax adhaerens* F.E. Schulze (Placozoa). *Zoomorphology*, 1972, vol. 73, no. 4, pp. 297–314. <https://doi.org/10.1007/BF00391925>
  13. Grell K.G., Benwitz G. Elektronenmikroskopische beobachtungen über das wachstum der eizelle und die bildung der „befruchtungsmembran“ von *Trichoplax adhaerens* F.E. Schulze (Placozoa). *Zoomorphology*, 1974, vol. 79, no. 4, pp. 295–310. <https://doi.org/10.1007/BF00277511>
  14. Grell K.G., Ruthmann A. Placozoa. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates* / F. W. Harrison and J. A. Westfall (Eds). New York: Wiley-Liss, 1991, pp. 13–27.
  15. Laumer C.E., Gruber-Vodicka H., Hadfield M.G., Pearse V.B., Riesgo A., Marioni J.C., Giribet G. Support for a clade of Placozoa and Cnidaria in genes with minimal compositional bias. *eLife*, 2018, vol. 7, pp. e36278. <https://doi.org/10.7554/eLife.36278>
  16. Mayorova T.D., Smith C.L., Hammar K., Winters C.A., Pivovarova N.B., Aronova M.A., Leapman R.D., Reese T.S. Cells containing aragonite crystals mediate responses to gravity in *Trichoplax adhaerens* (Placozoa), an animal lacking neurons and synapses. *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 1, pp. e0190905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190905>
  17. Moroz L.L. The genealogy of genealogy of neurons. *Communicative & Integrative Biology*, 2014, vol. 7, no. 6, pp. e993269. <https://doi.org/10.4161/19420889.2014.993269>
  18. Moroz L.L. NeuroSystematics and Periodic System of Neurons: Model vs Reference Species at Single-Cell Resolution. *ACS Chemical Neuroscience*, 2018, vol. 9, pp. 1884–1903. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.8b00100>
  19. Schierwater B. My favorite animal, *Trichoplax adhaerens*. *BioEssays*, 2005, vol. 27, pp. 1294–1302. <https://doi.org/10.1002/bies.20320>
  20. Schierwater B., De Salle R. Placozoa. *Current Biology*, 2018, vol. 28, iss. 3, pp. R97–R98.
  21. Schulze F.E. *Trichoplax adhaerens*, nov. gen., nov. spec. *Zoologischer Anzeiger*, 1883, vol. 6, pp. 92–97.
  22. Signorovitch A.Y., Dellaporta S.L., Buss L.W. Caribbean placozoan phylogeography. *Biological Bulletin*, 2006, vol. 211, iss. 2, pp. 149–156. <https://doi.org/10.2307/4134589>
  23. Smith C.L., Pivovarova N., Reese T.S. Coordinated feeding behavior in *Trichoplax*, an animal without synapses. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 9, pp. e0136098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136098>
  24. Smith C.L., Varoqueaux F., Kittelmann M., Azam R.N., Cooper B., Winters C.A., Eitel M., Fasshauer D., Reese T.S. Novel cell types, neurosecretory cells, and body plan of the early-diverging metazoan *Trichoplax adhaerens*. *Current Biology*, 2014, vol. 24, no. 14, pp. 1565–1572. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.046>
  25. Telford M.J., Moroz L.L., Halanych K.M. Evolution: A sisterly dispute. *Nature*, 2016, vol. 529, no. 7586, pp. 286. <http://doi.org/10.1038/529286a>
  26. Voigt O., Collins A.G., Pearse V.B., Pearse J.S., Ender A., Hadrys H., Schierwater B. Placozoa – no longer a phylum of one. *Current Biology*, 2004, vol. 14, iss. 22, pp. R944–R945. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.036>

**CELL TYPES DIVERSITY OF H4 HAPLOTYPE PLACOZOA SP.****D. Y. Romanova**

Kovalevsky Institute of Marine Biological Research RAS, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: [driaromanova@yandex.ru](mailto:driaromanova@yandex.ru)

Placozoa is one of the five basal metazoan lineages critical for our understanding of animal evolution in general, and the origin of neuromuscular organization in particular. All Placozoa have the simplest known animal body plan, without neurons and muscles, but relatively complex behaviors. Totally 19 haplotypes of placozoans have been identified including two genera, *Trichoplax adhaerens* (H1) and *Hoilungia hongkongensis* (H13), plus a number of less characterized ecological groups also known as H2–H19 Placozoa sp. However, microscopic anatomy had been characterized for H1 (*Trichoplax adhaerens*) only. Here, using scanning and confocal microscopy, we described morphological organization of H4, the haplotype similar to *Hoilungia*. All six basal morphological cell types have been found in H4. Nevertheless, we recognized a greater heterogeneity of cell populations (in their shape, density, mitochondrial distribution and activity) than described elsewhere for H1. This study expands our knowledge about the biology of these enigmatic groups of marine organisms.

**Keywords:** *Trichoplax adhaerens*, *Hoilungia*, Placozoa, evolution, cell types