



КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И РЕГЕНЕРАЦИЯ ТРИХОПЛАКСА *TRICHOPLAX* SP. H2 ИЗ ФРАГМЕНТОВ ТЕЛА И АГРЕГАТОВ ДИССОЦИИРОВАННЫХ КЛЕТОК: ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ

© 2022 г. А. В. Кузнецов^{1,2}, В. И. Вайнер², Ю. М. Волкова²,
В. М. Цыганкова², Д. Н. Бочко², В. С. Муханов¹

¹ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация

²ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет», Севастополь, Российская Федерация
E-mail: andrey.kuznetsov@web.de

Поступила в редакцию 31.07.2020; после доработки 26.08.2020;
принята к публикации 19.08.2022; опубликована онлайн 13.09.2022.

Выполнены исследования на культивируемом в лаборатории простейшем многоклеточном животном *Trichoplax* sp. H2 с целью дальнейшей генетической модификации этого организма. Предлагается вводить генетическую информацию в суспензию клеток после диссоциации тела трихоплекса на отдельные клетки с последующей их агрегацией и регенерацией полученных агломератов в жизнеспособное животное. С этой целью мы исследовали динамику роста трихоплексов в чашках Петри на матах из одноклеточной водоросли *Tetraselmis marina*. Особи были однородны на стадии экспоненциального роста. В экспериментах по посттравматической регенерации разрезали подопытных животных радиально и исследовали восстановление полученных частей под микроскопом. Оценивали интенсивность роста и размножения трихоплексов на водорослевых матах — показатели, ухудшавшиеся по мере измельчения животных. Обнаружено, что утраченная часть тела трихоплекса замещается за счёт ремоделинга оставшихся клеток. После витальной окраски животных подвергали диссоциации на отдельные клетки в среде, лишённой двухвалентных катионов. Идентифицированы клетки грушевидной или округлой формы и клетки эпителия со жгутиками, которые сохраняли двигательную активность более 12 ч. Для количественной оценки популяции клеток с помощью проточной цитометрии пластинки трихоплексов дезинтегрировали при добавлении 10 мкМ амлодипина. Показано, что трихоплекс размером 0,5–1,0 мм состоит примерно из 10 000 клеток. Обработка животных 10%-ным бычьим сывороточным альбумином (БСА) в течение различных промежутков времени свидетельствует в пользу существования тотипотентных клеток на периферии трихоплекса, вероятно в пояске пластинки. В экспериментах по репаративной регенерации удалось добиться диссоциации трихоплексов на отдельные клетки при обработке 0,1%-ным БСА, а затем воссоздать живые организмы путём центрифугирования суспензии клеток и последующего диспергирования крупного осадка на фрагменты до 0,1 мм перед высевом многоклеточных агрегатов на питательные маты. Развитие этих агрегатов сопровождалось активными движениями клеток и эпителизацией поверхности, что приводило к увеличению клеточной массы, формированию пластинки, росту и дальнейшему вегетативному делению трихоплексов. Предполагается, что пребывание экспериментальных животных на искусственной стадии одиночной клетки в ряду бесполой размножений позволит интродуцировать в трихоплекса чужеродную генетическую информацию, например с целью изучения сигнальных систем, организации и функционирования этого многоклеточного организма. Трансгенез, основанный на диссоциации тела животного на отдельные клетки, возможно, будет применим и к другим организмам, обладающим высоким регенеративным потенциалом.

Ключевые слова: трихоплекс, пластинчатые, посттравматическая и репаративная регенерация, диссоциация и агрегация клеток, клеточная инженерия, методы трансгенеза

Трихоплакс относится к типу Plасozoa и считается одним из самых просто устроенных многоклеточных животных (Серавин и Гудков, 2005 ; Schulze, 1883, 1891). Это пластинчатое беспозвоночное с асимметричным телом размером 0,2–2,0 мм в диаметре и толщиной 25 мкм встречается повсеместно в тропических морях (Eitel & Schierwater, 2010 ; Pearse & Voigt, 2007). Трихоплакс не имеет мышечных клеток и нейронов, состоит из трёх слоёв клеток, прикрепляется к субстрату с помощью микроворсинок и скользит по поверхности за счёт биения ресничек вентрального эпителия и наблюдаемых ритмических сокращений дорсального эпителия под действием звёздчатых волокнистых клеток среднего слоя, изменяя форму своего тела, как амёба (Armon et al., 2018 ; Eitel et al., 2013 ; Pearse & Voigt, 2007 ; Schierwater et al., 2009 ; Smith et al., 2019). Описано два возможных типа питания трихоплакса — внешний и внутренний. При внешнем питании животное наползает на крупную добычу, например на агломерат водорослей, и плотно прикрепляется к субстрату, образуя своеобразную пищевую полость, куда выделяет секреты, растворяющие содержимое, которое затем трихоплакс поглощает в процессе клатрин-опосредованного эндоцитоза (Smith & Mayorova, 2019 ; Smith et al., 2015). Также трихоплакс способен подхватывать ресничками мелкую добычу (одиночные водоросли) и перемещать её на дорсальную сторону, где она затем фагоцитируется клетками среднего слоя, временно экспонированными на поверхности (Wenderoth, 1986).

Интересно, что животное с таким примитивным строением тела содержит гены, которые у более высокоорганизованных животных отвечают за функции иммунной и нервной системы (Kamm et al., 2019 ; Varoqueaux et al., 2018). *Trichoplax* sp. H2 имеет геном величиной 94,88 Mb, в котором идентифицировано 12 225 генов (Kamm et al., 2018). Митохондриальный геном трихоплакса — наибольший среди всех Metazoa, он представляет собой кольцевую ДНК размером 43 Kb (Dellaporta et al., 2006). С помощью электронной микроскопии описано шесть основных типов клеток трихоплакса *Trichoplax adhaerens* H1 (табл. 1). На основе использования дифференциального окрашивания штамма H4 и конфокальной микроскопии охарактеризованы типы клеток трихоплакса и измерен мембранный потенциал митохондрий (Романова, 2019).

Наиболее представительными в теле трихоплакса являются вентральные эпителиальные клетки, обеспечивающие прикрепление к поверхности посредством микроворсинок и скольжение с помощью ресничек, а также всасывание переваренной пищи (табл. 1). Липофильные клетки тоже находятся в нижнем эпителии и содержат большое липидное включение. Наружный край тела животного, или поясok (~20 мкм), состоит из двух типов эпителиальных клеток — дорсальных и вентральных, а фибриллярные клетки здесь отсутствуют. По периферии пластинки трихоплакса расположены железистые клетки. В них экспрессируются такие нейроспецифические белки, как синтаксин 1, синаптобrevин, SNAP25; в нейросекреторных клетках присутствуют также FMRF-амид и другие нейропептиды (Mayorova et al., 2019 ; Senatore et al., 2017 ; Smith et al., 2014). Разнообразные типы пептидергических клеток встречаются не только на периферии: они располагаются также концентрически в направлении центра в обоих эпителиях животного (Varoqueaux et al., 2018). Фибриллярные клетки тетраплоидны, содержат симбионтов и отвечают за изменение формы тела, фагоцитоз и пищеварение (Gruber-Vodicka et al., 2019). Некоторые клетки имеют кристаллические включения арагонита. Предполагается, что они играют роль вестибулярного аппарата, позволяющего животному ориентироваться в пространстве, переворачиваться и прикрепляться к субстрату непосредственно вентральной стороной (Mayorova et al., 2018 ; Smith et al., 2014). Дорсальные плоские эпителиальные клетки находятся в верхнем слое трихоплакса и имеют одну сенсорную ресничку. Вероятно, существуют и другие, менее представительные или пока не идентифицированные типы клеток (Sebé-Pedrós et al., 2018). Например, у особей из природных источников были описаны клетки, имеющие вид блестящих шаров, которые отсутствуют у культивируемых линий животных (Grell & Ruthmann, 1991 ; Syed & Schierwater, 2002). Известны случаи отпугивания трихоплаксом потенциальных хищников, возможно за счёт выделения токсинов

специализированными клетками (Jackson & Buss, 2009 ; Pearse & Voigt, 2007). Высказано предположение, что в пояске трихоплакса могут располагаться стволовые клетки, обеспечивающие рост животного на периферии (Albertini et al., 2019).

Таблица 1. Преобладающие типы клеток трихоплакса, идентифицированные с помощью электронной и конфокальной микроскопии с использованием специфических антител (Smith et al., 2014)

Table 1. *Trichoplax* prevailing cells types identified by electron and confocal microscopy using specific antibodies (Smith et al., 2014)

Положение	Тип	Описание	Функция	Содержание
Нижний слой	Вентральные эпителиальные клетки	Мелкие клетки с ресничкой и микроворсинками, вытянуты в вентродорсальном направлении, многочисленные включения и везикулы	Активное скольжение по поверхности и прикрепление к субстрату, всасывание, пиноцитоз	72 % всех клеток трихоплакса
	Липофильные клетки	Крупные клетки, лишённые ресничек, образуют контакты с фибриллярными клетками, отсутствуют в краевой 20-мкм зоне, одно крупное включение с липидным содержимым	Секреция пищеварительных ферментов	11 % клеток животного
	Железистые клетки	Среднего размера, расположены в краевой зоне, имеют ресничку и микроворсинки, разнообразные по форме и цвету гранулы	Секреция нейромедиаторов	3 % клеток
Средний слой	Фибриллярные клетки	Тетраплоидные клетки с отростками, разнообразные включения, в том числе симбиотические бактерии и остатки пищи	Механические изменения формы тела, фагоцитоз, пищеварение	4 % клеток
	Кристаллические клетки	Клетки содержат кристаллы размером ~2 мкм, контактируют с волокнистыми клетками, не выходят на поверхность	Возможно, выполняют роль статоцистов	< 0,2 % клеток в теле животного
Верхний слой	Дорсальные эпителиальные клетки	Мелкие клетки т-образной формы с сенсорной ресничкой, внутриклеточные гранулы	Защитная, сенсорная, сократительная	9 % клеток

Трихоплакс размножается в основном путём фрагментации тела или почкования с участием «бродяжек» (Kamm et al., 2018 ; Thiemann & Ruthmann, 1988, 1991). Образование гоноцитов у животного обычно наблюдается в стареющих культурах; обнаружить яйцеклетки чрезвычайно трудно (Grell, 1971, 1972 ; Grell & Benwitz, 1974). Сперматозоиды до сих пор не описаны (Grell & Benwitz, 1981). В лабораторных условиях эмбрионы деградируют после дробления по невыясненным причинам; изучено развитие эмбрионов до стадии 64–128 клеток (Eitel et al., 2011). Время жизни отдельных клеток в организме животного также неизвестно. Стволовые элементы и ниши стволовых клеток не обнаружены. Предполагается, что все клетки трихоплакса способны к обратной дифференцировке, потому что животное может регенерировать после расчленения на мелкие фрагменты и даже из отдельных клеток (Ruthmann & Terwelp, 1979). Тем не менее эксперименты по восстановительному морфогенезу показали частичную дифференцированность клеток. Так, кусочки середины пластинки не регенерируют. При соединении пояска и центрального участка тела животного происходит отторжение лишнего материала (Schwartz, 1984). Показано, что по краю тела трихоплакса располагаются мелкие клетки, в которых экспрессируется ген *Trox-2*. Возможно, это мультипотентные стволовые клетки, так как подавление экспрессии

Trox-2 с помощью антисмысловых олигонуклеотидов или благодаря РНК-интерференции останавливает рост и регенерацию трихоплакса (Jakob et al., 2004).

Поскольку последовательности геномов ряда штаммов трихоплакса стали доступны (Dellaporta et al., 2006 ; Kamm et al., 2018 ; Signorovitch et al., 2007 ; Srivastava et al., 2008), появилась возможность манипулировать ими, выключая, например, тот или иной ген, и анализировать, к каким изменениям это приведёт (Hardy et al., 2010). С другой стороны, для идентификации отдельных клеток и их потомков часто используют репортёрные гены, кодирующие флуоресцирующие белки (Currie et al., 2016). Данный подход позволяет изучать пространственно-временное распределение клеток под флуоресцентным микроскопом, разделять их с помощью проточного флуоресцентного клеточного сортера и маркировать популяции клеток для scRNAseq-анализа транскриптомов отдельных клеток по экспрессии транскриптов мРНК (Lush et al., 2019). Наиболее интересным в случае трихоплакса видится молекулярно-генетическое изучение коммуникации между клетками, которая является причиной образования многоклеточных ансамблей и системного поведения (Kuznetsov et al., 2020b).

Ограниченность данных по тонкому строению и слабая изученность репродуктивного цикла трихоплакса, а также отсутствие исчерпывающей информации по динамике роста и критериев изменения физиологического состояния животных в процессе их культивирования сдерживают работы по его генетической модификации и обратной генетике. Исследователи вынуждены ограничиваться анализом генетически немаркированных клеток (Moroz et al., 2020 ; Romanova et al., 2020 ; Sebé-Pedrós et al., 2018) и гетерологичной экспрессией генов (Elkhatib et al., 2019 ; Smith et al., 2017) из-за отсутствия методов генетической модификации трихоплакса. Такие методы введения генетической информации, как электропорация и липофекция (за исключением баллистической трансфекции) (Sambrook & Russell, 2001), ориентированы на манипуляции с клетками в культуре, будь то прокариоты или эукариоты. В случае многоклеточных организмов с половым процессом трансгенез осуществляется на стадии одиночной клетки, например путём инъекции ДНК в зиготу (Transgenesis Techniques, 2009). Для трихоплакса, который не способен к половому размножению в лабораторных условиях, а делится вегетативно, необходима разработка специального метода трансгенеза.

Основная цель нашего исследования заключается в изучении регенерационных способностей трихоплакса для клеточной и генетической инженерии этого животного.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Культивирование. Для экспериментов использовали штамм *Trichoplax* sp. H2. С помощью микропипетки 15 животных помещали в чашку Петри диаметром 90 мм и культивировали при температуре +25 °С и рН 7,8–8,0. В качестве пищи использовали одноклеточную зелёную водоросль *Tetraselmis marina* (Cienkowski) R. E. Norris, Hori & Chihara, 1980 (Kuznetsov et al., 2020b). Искусственную морскую воду (artificial seawater, ASW) с солёностью 35 ‰ меняли каждые 5–7 дней. Трихоплаксов пересаживали на свежий мат из водорослей каждые 3–5 недель. За сутки до начала эксперимента животных переводили в режим «голодания», отсаживая в чашку с ASW без водорослей.

Микроскопия и анализ изображений. Животных обрабатывали под микроскопом для лабораторных исследований Zeiss Primo Star или Zeiss Stemi 305 со встроенной камерой при увеличении в 8 и 40 раз. Изображения изучали с помощью программы ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Подбирали порог контрастности, позволяющий отделить анализируемый образ от зашумлённого фона. Измеряли площади пластинок. Отдельные клетки трихоплакса и их агломераты изучали под инвертированным микроскопом Nikon Eclipse Ts2R с ДИК-оптикой при увеличении до 600 раз.

Витальное окрашивание. Для прижизненного окрашивания отдельных животных (или их частей) образцы последовательно отмывали в двух каплях ASW. К последней капле добавляли 20 мкл 0,01%-ного раствора нейтрального красного (Sigma-Aldrich, USA), экспонировали 10 мин при комнатной температуре и далее снова отмывали в двух каплях ASW в течение 30 мин.

Микрохирургия. Для эксперимента брали крупных животных размером не менее 1 мм в диаметре, которые после активного поиска пищи меняли стратегию поведения на «ожидание» и распластывались на субстрате. Для этого трихоплаксов пересаживали в чашку Петри на пластиковую подложку в ASW до их перехода в состояние покоя (примерно на 60 мин). В таком состоянии отдельных животных разрезали на радиальные части. Медиальные разрезы выполняли с помощью скальпеля под микроскопом Zeiss Stemi 305 при увеличении в 8 раз. Для оценки способности частей трихоплакса к росту и репродукции животных разделяли на две, четыре или восемь радиальных долей и по десять сегментов (условие — по одному фрагменту от отдельной особи) засеивали на маты из водорослей *T. marina*. Процесс посттравматической регенерации непосредственно наблюдали в течение 3–4 ч под микроскопом Nikon Eclipse Ts2R. Фото- и видеосъёмку проводили через различные промежутки времени.

Диссоциация на отдельные клетки. Для эксперимента брали от 50 до 150 особей размером 0,5–1,0 мм и одного возраста до стационарной фазы роста культуры, что соответствовало 2–3 неделям после посева. Отмывали их 2 раза по 30 мин в ASW и переносили в лунки планшета объёмом по 300 мкл. Для диссоциации пластинок трихоплаксов на отдельные клетки использовали бычий сывороточный альбумин (далее — БСА) (Sigma, USA) в концентрациях 10 и 0,1 %, или 10 мкМ амлодипина (Тева, Россия), или 3,5%-ный NaCl с временем экспозиции от 15 до 90 мин. При подготовке клеточной суспензии трихоплаксов выдерживали в ASW с 0,1%-ным БСА в течение 15 мин при комнатной температуре, причём последние 5 мин среду интенсивно перемешивали до получения гомогенной клеточной взвеси.

Проточная цитометрия. Для исследования эффективности диссоциации трихоплаксов на отдельные клетки и оценки их числа, а также размера применяли проточный цитометр Cytomics™ FC 500 (Beckman Coulter, USA), оборудованный аргоновым лазером с длиной волны 488 нм. Обработку цитометрических данных проводили с помощью программы Flowing Software v2.5.0 (www.flowingsoftware.com, Perttu Terho, University of Turku, Finland). Общее число отдельных клеток и их агрегатов определяли в неокрашенных пробах с помощью гейтинга популяции клеток на двухпараметрических цитограммах прямого (forward scatter, FS) и бокового (side scatter, SS) светорассеивания, а также после окрашивания проб SYBR Green I (Molecular Probes, USA). Конечное разбавление в каждой пробе составляло 10^{-4} . Окрашивание проводили в темноте в течение 30 мин непосредственно перед цитометрией. Анализ окрашенных образцов осуществляли с использованием прямого светорассеивания (FS) и флуоресценции SYBR Green I в зелёной области спектра (канал FL1, 525 нм). Концентрацию клеток рассчитывали по скорости потока пробы ($60 \text{ мкл} \cdot \text{мин}^{-1}$), времени и количеству клеток, зарегистрированных в этот промежуток времени (60 с). Контроль и калибровку измерений производили с помощью флуоресцентных микросфер (Beckman Coulter, USA) размером 1,0; 4,2; 10,7 мкм. Размеры клеток (L, мкм) определяли на основе данных канала FS как диаметр эквивалентной сферы (equivalent spherical diameter, ESD), объём которой равен объёму клетки независимо от её морфологии.

Реагрегация клеток и репаративная регенерация. В первой серии экспериментов полученную взвесь клеток сразу помещали на питательные маты. Во второй серии опытов гомогенат переносили в микропробирку объёмом 1,5 мл, клетки трижды промывали (по 1 мл ASW) путём осаждения на микроцентрифуге FVL-2400 Combi-Spin (BioSan, Latvia) в течение 2 мин. На последнем этапе длительность центрифугирования увеличивали до 5 мин, далее

следовало диспергирование осадка на вихреке в течение 2 сек. Мини-агрегаты клеток размером до 100 мкм высевали на маты из водорослей для дальнейшей регенерации, роста и размножения трихоплексов.

Исследования проводили в течение года. Всего выполнено 14 серий экспериментов с БСА и амлодипином в различных модификациях, а также контрольные эксперименты с использованием 3–5 чашек в отдельном опыте. Данные в тексте представлены как «среднее значение \pm стандартное отклонение».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рост животных. *Trichoplax* sp. H2 находились в течение недели в состоянии адаптации к новым условиям после заселения в чашки Петри на маты из водорослей. По прошествии лаг-фазы длительностью до 7–10 дней трихоплексы начинали расти, а потом — делиться с образованием зоны растяжения и истончения между клетками, заканчивающимся разрывом соединения. Наступала экспоненциальная фаза роста, характеризующаяся однородной морфологией животных. Последующая логарифмическая стадия роста культуры трихоплексов сопровождалась небольшим изменением численности популяции (рис. 1а), а прирост биомассы происходил ступенчато (рис. 1б). Замедление роста культуры с переходом в стационарную фазу с последующим измельчением части животных отмечено на 20-е сутки; начало фазы отмирания зафиксировано на 25-е сутки. Для дальнейшего культивирования по 10 интактных животных пересаживали в чашки со свежими матами из водорослей. Как и раньше, после 7-дневной паузы происходило экспоненциальное увеличение количества особей (рис. 1в) при некотором замедлении прироста биомассы на поздней стадии (рис. 1г), сопровождающемся временным уменьшением размеров животных.

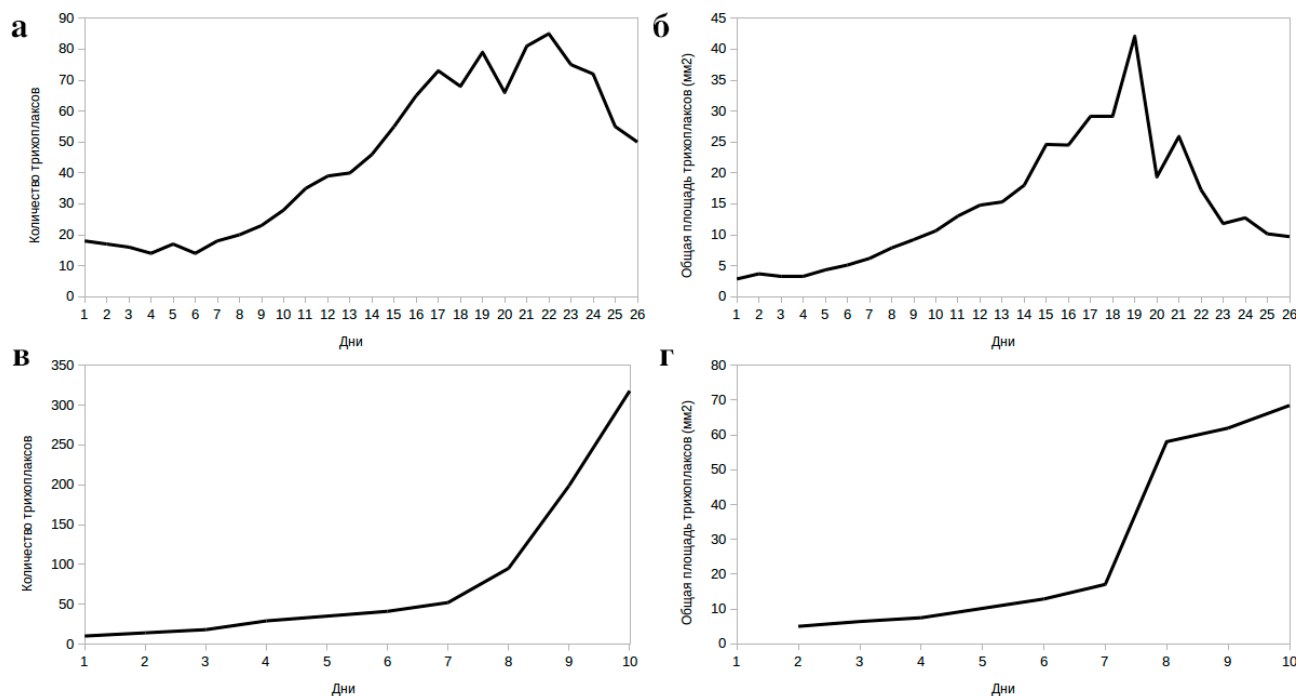


Рис. 1. Рост культуры *Trichoplax* sp. H2: а, б — длительное культивирование; в, г — повторное краткое культивирование. Суммарная площадь поверхности животных в мм² (б, г)

Fig. 1. *Trichoplax* sp. H2 culture growth: а, б, the long-term cultivation; в, г, the following short-term cultivation. Total surface area of animals is in mm² (б, г)

Пищевое поведение трихоплаксов. При избытке пищи трихоплаксы находились на мате из водорослей (рис. 2а). По мере выедания мата животные медленно перемещались на новое место, изобилующее пищей. В случае если трихоплаксы были пересажены в ASW без водорослей, они начинали активно двигаться в поисках пищи (рис. 2б). Через несколько десятков минут безуспешного поиска животные успокаивались и переходили в режим «ожидания» (рис. 2в), при котором движение клеток внутри тела замедляется, образуется утончённый периферийный ободок, а особь прочно прикрепляется к субстрату. Аккуратное добавление отдельных микроводорослей возле трихоплакса стимулировало положительный таксис животного в направлении пищи и последующее её поедание. Добавление небольшого объёма среды из старой культуры или расположение мёртвых водорослей возле трихоплакса, наоборот, вызывало у него реакцию убления.



Рис. 2. Трихоплаксы в различных физиологических состояниях: а — животное на мате из водорослей; б — трихоплакс в движении; в — неподвижное животное. Увеличение в 40 раз

Fig. 2. *Trichoplax* in various physiological states: а, animal resting on an algal mat; б, *Trichoplax* in motion; в, motionless animal. Magnification 40 times

Микродиссекция животных. После разрезания трихоплакса на две части (рис. 3а) половинки начинали регенерировать в интактную особь и примерно через 1 ч «залечивали» рану (рис. 3б, в). Повреждённое животное переставало двигаться, оставалось распластанным на субстрате и сворачивалось, изолируя травмированную область от окружающей среды. Травмированная часть пластинки характеризуется отсутствием ресничек и пояска, тогда как нативный край пластинки формирует поясок из мелких тёмных клеток с хорошо различимыми подвижными ресничками. Внутреннее содержимое пластинки, в отличие от раневого края, было очень динамичным. Трихоплакс постоянно менял форму, но не приподнимался при этом над поверхностью, а оставался плотно прижатым к субстрату. Поясок на противоположной от раны стороне несколько утолщился по высоте, становился темнее и прочно прикреплялся к подложке, фиксируя животное таким образом, что трихоплакс совершал амёбоидные движения, но не мог оторваться от места прикрепления (см. Приложение 1: <https://marine-biology.ru/mbj/article/view/353>). Процесс заживления раны продолжался около 30 мин (рис. 3а) и завершился глубокой инвагинацией пояска в сторону центральной части пластинки через 60 мин после бисекции (рис. 3б) (см. Приложение 2: <https://marine-biology.ru/mbj/article/view/353>). Ещё около часа требовалось на дальнейшую репарацию, приводящую к выравниванию края пластинки (рис. 3в, г). Животные больше не прикреплялись противоположной стороной к поверхности и начинали вращаться. Через 3 ч и более край пластинки в зоне повреждения округлялся и формировал интактный поясок, а рубец внутри пластинки рассасывался. Все клетки внутри пластинки трихоплакса начинали двигаться скоординированно, пластинка приобретала первоначальную пластичность, а животное — возможность перемещаться поступательно.

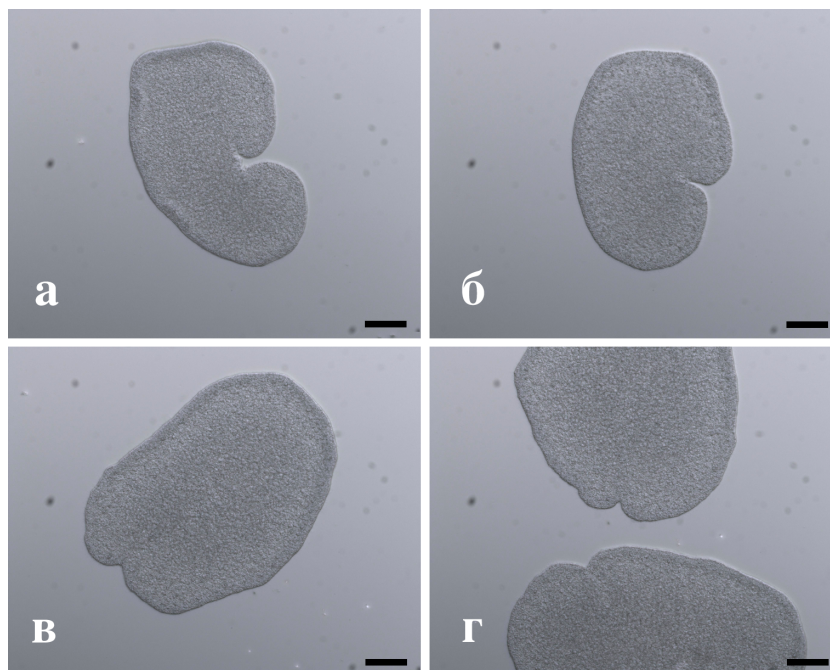


Рис. 3. Репарация раневой зоны у половинки *Trichoplax* sp. H2 в течение 30 мин (а), 60 мин (б) и 120 мин (в, г). Увеличение в 400 раз; отрезки шкалы по 50 мкм

Fig. 3. Repair of a wound area in half of *Trichoplax* sp. H2 within 30 min (a), 60 min (б), and 120 min (в, г). Magnification 400 times. Scale bars are 50 μ m

Когда трихоплакса разделяли на 4 части и особенно на 8 частей, первоначальное восстановление протекало дольше — до 60–120 мин, так как раневая поверхность была больше неповреждённой части. При этом животному, чтобы восстановить раневую зону с помощью оставшихся мелких клеток пояска пластинки, приходилось утолщаться (рис. 4б), образовывать складки и даже отторгать некоторое количество крупных клеток из центральной части пластинки. Разрезание животного приводило к обездвиживанию пластинки в районе повреждения; трихоплакс терял способность передвигаться поступательно и совершал ритмичные движения в одной плоскости, сопровождавшиеся перестройкой клеток и приводившие к уменьшению размера раневой зоны, а позднее начинал вращаться. По мере заживления раны край пластинки выравнивался, к животному возвращалась прежняя подвижность.

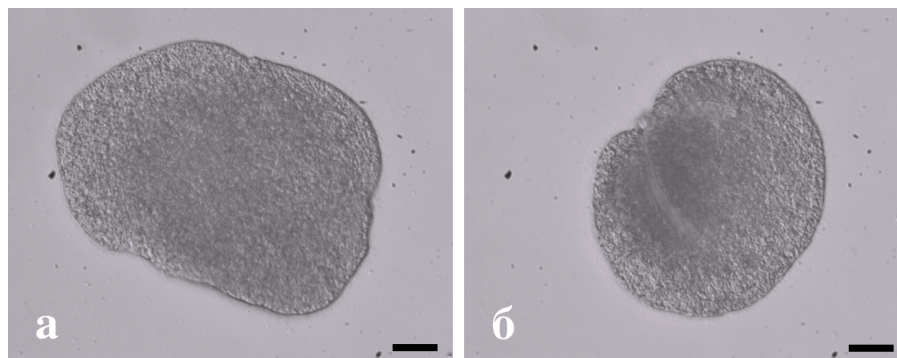


Рис. 4. Репарация раневой зоны у 1/8 части особи *Trichoplax* sp. H2: а — мелкое интактное животное в качестве положительного контроля; б — заживление 1/8 части крупного животного в течение 1–2 ч. Увеличение в 400 раз; отрезки шкалы по 50 мкм

Fig. 4. Repair of a wound area in 1/8 of *Trichoplax* sp. H2 specimen: а, small intact animal as a positive control; б, healing of 1/8 of a large animal within 1–2 hours. Magnification 400 times. Scale bars are 50 μ m

Через две недели после посева 10 половинок и 10 четвертинок трихоплакса на водорослевый мат обнаружено по 40 интактных особей в обеих чашках (табл. 2). Животные располагались поодиночке на водорослях и под ними, плотно прилегали к субстрату, были малоподвижны, имели типичную морфологию с ровными краями и соответствующие размеры пластинки (около 1 мм). Данный результат свидетельствует о том, что половинки и четвертинки трихоплакса обладают примерно одинаковым потенциалом к восстановлению на длительном промежутке времени при наличии источника пищи. Из 1/8 части трихоплакса регенерировало меньше особей, вероятно в силу того, что только некоторые из них были способны давать начало полноценным животным. Тем не менее все восстановленные особи обладали репродуктивным потенциалом: отмечен 4–5-кратный прирост численности популяции за неделю.

Таблица 2. Регенерация *Trichoplax* sp. H2 после микродиссекции пластинки

Table 2. *Trichoplax* sp. H2 regeneration after microdissection of the plate

Недели	Количество развившихся животных			
	Целая часть	1/2 часть	1/4 часть	1/8 часть
2	42	40	40	10
3	> 200	> 200	> 200	51
4	> 200	> 200	> 200	> 200

Диссоциация животных на отдельные клетки. В результате погружения трихоплаксов в среду, лишённую двухвалентных катионов (3,5%-ный NaCl), тела животных постепенно диссоциировали на отдельные клетки (рис. 5б). После 60 мин большинство составляли клетки округлой формы, которые совершали беспорядочные движения в результате биения ресничек даже на следующие сутки. Также выявлены, но в гораздо меньшем количестве, неподвижные клетки грушевидной формы. При длительной инкубации грушевидные клетки превращались в сферические.

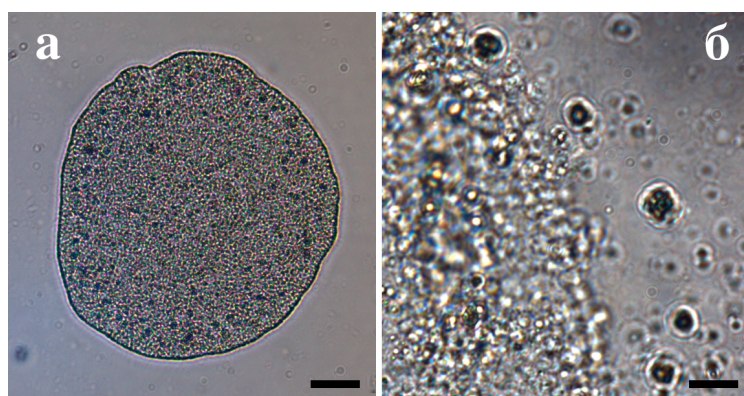


Рис. 5. Пластинка трихоплакса, окрашенного нейтральным красным: а — интактное животное, увеличение в 200 раз, отрезок шкалы 75 мкм; б — животное в процессе диссоциации в 3,5%-ном растворе NaCl, увеличение в 600 раз, отрезок шкалы 25 мкм

Fig. 5. *Trichoplax* plate stained with neutral red: a, intact animal, magnification 200 times, scale bar is 75 μ m; b, animal during dissociation with 3.5 % NaCl solution, magnification 600 times, scale bar is 25 μ m

Оценка отдельных клеток и их агрегатов с помощью проточного цитофлуориметра. Анализ клеток трихоплакса в неокрашенных пробах (рис. 6а, г) затруднён наличием в среде значительного количества взвешенных частиц сопоставимого размера. Эта проблема остро ощущалась при обработке проб 3,5%-ным NaCl и в меньшей степени — 0,1%-ным БСА (рис. 6а).

Образование агрегатов клеток разного размера в результате диссоциации тела трихоплакса не позволило получить компактный кластер на цитограммах, который включал ядро одиночных клеток (IC) и шлейф клеточных агрегатов (CC) (см. рис. 6а, г).

Эффективность диссоциации клеток трихоплакса оценивали по доле одиночных клеток в общем количестве регистрируемых объектов. Значение изменялось в диапазоне от 60 до 76 % [(68 ± 8) %]. По данному показателю статистически достоверного отличия между обработкой 0,1%-ным БСА и 10 мкМ амлодипина не обнаружено. Число клеток в одном организме составляло от 7 000 до 12 000 и, возможно, было занижено, поскольку эффективность диссоциации ткани не превышала 80 %.

Окраска нуклеиновых кислот флуорохромом SYBR Green I облегчала идентификацию клеток трихоплакса на цитограммах (гейты TR на рис. 6б, д) и давала более точные оценки количества и размеров клеток на основе гейтинга их популяций (рис. 6в, е). Согласно калибровочным измерениям, средние размеры (ESD) одиночных клеток трихоплакса составляют (3,5 ± 0,4) мкм, при этом достоверного отличия между пробами с БСА и амлодипином не выявлено.

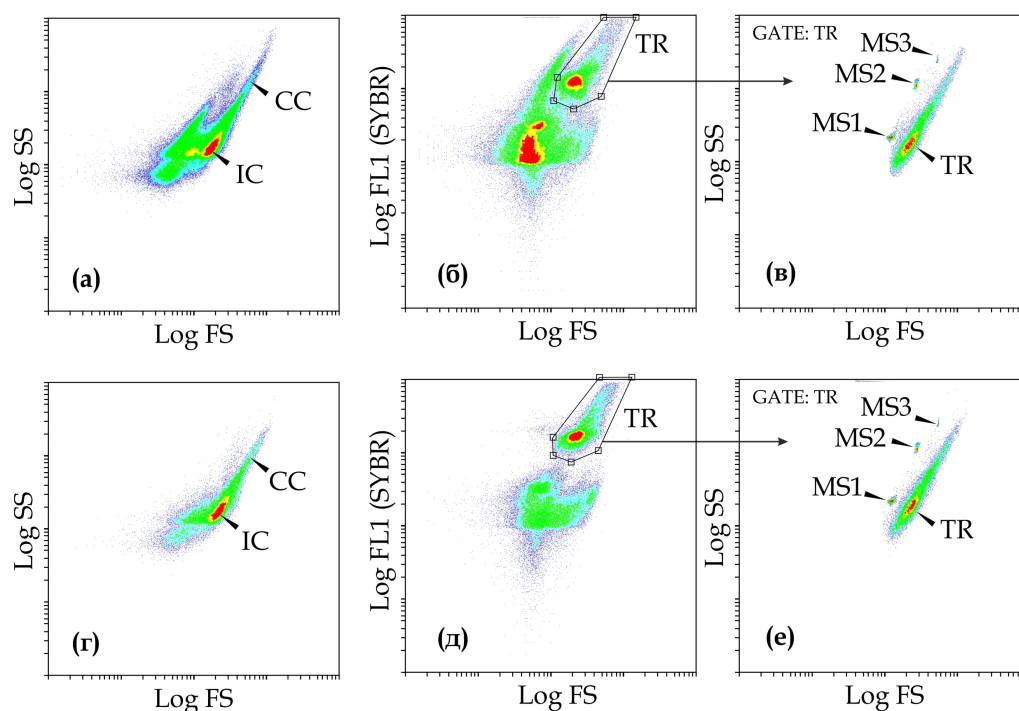


Рис. 6. Проточная цитометрия диссоциированных клеток трихоплакса без окраски (а, г) и после их окрашивания флуорохромом SYBR Green I (б, в, д, е). Обработка 0,1%-ным БСА (а, б, в) и 10 мкМ амлодипина (г, д, е). Обозначены: одиночные клетки животного (IC) и их агрегаты (CC); гейтинг клеток трихоплакса в окрашенных пробах (TR); калибровочные микросферы размером 1,0 мкм (MS1), 4,2 мкм (MS2) и 10,7 мкм (MS3). На двух графиках (в, е) представлены данные из гейта TR

Fig. 6. Flow cytometry of dissociated *Trichoplax* cells with no staining (а, г) and after their staining with SYBR Green I fluoro-chrome (б, в, д, е). Treatment with 0.1 % BSA (а, б, в) and 10 μM amlodipine (г, д, е). Single *Trichoplax* cells (IC), their aggregates (CC), gating of *Trichoplax* cells in stained samples (TR), and calibration microspheres of 1.0 μm (MS1), 4.2 μm (MS2), and 10.7 μm (MS3) are marked. Data from the TR gate are given on two graphs (в, е)

Регенерация животных после обработки 10%-ным БСА. Предстояло выяснить, способны ли трихоплаксы регенерировать из фрагментов менее 1/8 части тела. Для получения таких мелких фрагментов животных использовали методику диссоциации пластинки трихоплакса с помощью БСА. В опыт брали по 50 особей и добавляли БСА в концентрации до 10 %. Трихоплаксов выдерживали в течение 15, 45 и 90 мин при комнатной температуре; извлекали и высевали

суспензию фрагментов животных на питательные маты для проращивания. Использование БСА вместо скальпеля не позволяло получить уменьшающиеся фрагменты с сохранением осей, такие как секторы 1/16, 1/32 и т. д.; вместо этого получали случайные фрагменты тела животных. Через 3 недели культивирования на матах обнаружены жизнеспособные трихоплаксы. Примечательно, что животные были разного размера — от очень мелких до крупных, около 1 мм. Часть особей после деления оставалась в плотном контакте друг с другом.

Размеры фрагментов пластинки трихоплакса после 90 мин обработки были значительно меньше, чем после 15 мин инкубации. Длительность экспозиции с 10%-ным БСА негативно сказывалась на способности животных к репаративной регенерации, росту и размножению. Так, через 3 недели культивирования на чашках обнаружены 83, 38 и 1, а через 4 недели — 333, 220 и 4 интактные особи после воздействия БСА в течение 15, 45 и 90 мин соответственно (табл. 3). В последнем случае три из четырёх развившихся животных отмечены лишь после 4 недель культивирования, а размножение трихоплаксов было замедленным.

Полученный результат показывает, что длительность разрушения трихоплаксов на фрагменты с помощью 10%-ного БСА негативно сказывается на репарации подопытных животных. Несмотря на то, что в результате микрохирургии и обработки БСА получают фрагменты тела, существенно отличающиеся по структуре, отмечено, что эффективность восстановления трихоплаксов после 15 мин обработки 10%-ным БСА сопоставима с регенерацией животных из 1/8 частей (табл. 2). Однако после 90 мин обработки 10%-ным БСА для репаративной регенерации животных и дальнейшего размножения требовался почти один месяц культивирования на матах водорослей. Тем не менее восстановившиеся трихоплаксы дали начало новой популяции, которая достигла максимума из 182 особей на втором месяце роста культуры и характеризовалась постепенным отмиранием животных к третьему месяцу культивирования (табл. 3).

Таблица 3. Регенерация *Trichoplax* sp. H2 после обработки 10%-ным БСА в зависимости от времени инкубации

Table 3. *Trichoplax* sp. H2 regeneration after 10 % BSA treatment depending on incubation period

Недели	Количество развившихся животных		
	15 мин	45 мин	90 мин
3	83	38	1
4	333	220	4
5	> 400	> 400	8
6	> 400	> 400	18
7	> 400	> 400	47
8	> 400	> 400	182

Восстановление животных из конгломерата отдельных клеток. Способны ли трихоплаксы восстанавливаться после полной диссоциации на отдельные клетки? В случае посева суспензии таких клеток на питательный мат трихоплаксы не росли, однако после центрифугирования взвеси клеток, диспергирования осадка и высева клеточных агрегатов на маты удалось добиться образования жизнеспособных животных. В случае использования для диссоциации трихоплаксов 0,1%-ного БСА после 1 недели культивирования на мате из водорослей обнаружены 74 особи, а при применении 10 мкМ амлодипина — 2 особи, которые далее успешно размножались (количество особей достигло 380 через 4 недели) (табл. 4). В противоположность этому обработка животных 3,5%-ным NaCl негативно сказывалась на их последующей регенерации.

Эксперименты воспроизводились стабильно, причём количество регенерировавших трихоплексов прямо зависело от числа взятых животных. Так, при применении 0,1%-ного БСА для диссоциации ткани в случае использования 50, 100 и 150 трихоплексов проросли 5, 74 и 93 особи соответственно. То есть увеличение числа трихоплексов повышало концентрацию клеток в суспензии, что позитивно влияло на количество фрагментов после его дезагрегации и в конечном счёте на количество восстановившихся животных.

Таблица 4. Восстановление *Trichoplax* sp. H2 из агрегатов отдельных клеток после диссоциации различными реагентами

Table 4. *Trichoplax* sp. H2 regeneration from aggregates of single cells after dissociation with various reagents

Недели	Количество развившихся животных		
	0,1%-ный БСА	10 мкМ амлодипина	3,5%-ный NaCl
1	74	2	0
2	> 400	25	0
3	> 400	236	0
4	> 400	380	0
5	> 400	> 400	0

Со временем на матах появлялись новые скопления клеток, которые росли на субстрате, приобретали типичную для трихоплексов морфологию и способность к движению, внешнему питанию и делению (рис. 7а, б). Трихоплексы регенерировали из агрегатов асинхронно, образуя колонии клеток разного размера с неровными краями, причём изначально крупные агрегаты развивались быстрее мелких. Затем эти скопления округлялись, превращаясь в подвижных животных, вырастали до обычных размеров (около 1 мм) и начинали делиться с помощью истончения и растяжения, как интактные животные. Если после центрифугирования суспензии клеток и последующей дезинтеграции осадка животные регенерировали из клеточных агрегатов в ASW без пищи, то в результате восстановительного морфогенеза первоначально случайные, бесформенные и хаотичные агрегаты клеток трихоплекса перестраивались в шарообразные структуры, подобные «бродяжкам», у которых мелкие эпителиальные клетки с подвижными ресничками расположены на поверхности, а крупные клетки находятся внутри (рис. 7в).

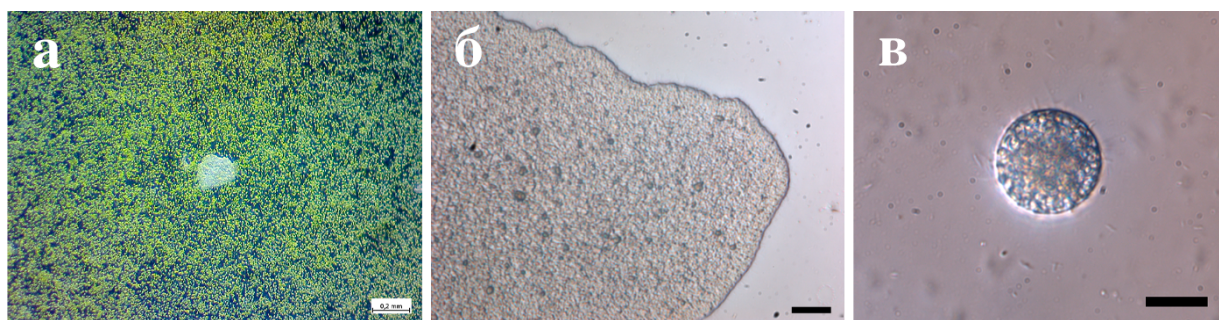


Рис. 7. Восстановительные морфогенезы *Trichoplax* sp. H2: а — особь в возрасте 7 дней, сформировавшаяся на мате из водорослей, увеличение в 40 раз, отрезок шкалы 0,2 мм; б — трихоплекс из 6-недельной культуры с мелкими клетками в пояске и ресничками по периферии, увеличение в 400 раз, отрезок шкалы 50 мкм; в — животное в возрасте 7 дней, регенерировавшее без источника пищи в ASW, увеличение в 2×400 раз, отрезок шкалы 100 мкм

Fig. 7. Regenerative morphogenesis of *Trichoplax* sp. H2: а, 7-day animal formed on an algal mat, magnification 40 times, scale bar is 0.2 mm; б, *Trichoplax* from a 6-week culture, with small cells in the rim and cilia on the periphery, magnification 400 times, scale bar is 50 μm; в, 7-day animal regenerated in ASW with no food source, magnification 2×400 times, scale bar is 100 μm

Динамика восстановления, последующего роста и размножения трихоплаксов на питательных матах варьировала в отдельных опытах и зависела от возраста и состояния животных, отобранных для эксперимента (рис. 8). Лучшие результаты были получены на трихоплаксах, взятых на стадии экспоненциального роста. В отличие от интактных животных с длительностью лаг-фазы около 1 недели (рис. 1в, г), подопытные животные характеризовались тем, что либо агломераты не восстанавливались, либо данная стадия затягивалась до двух и более недель. Тем не менее далее наступала фаза экспоненциального деления и логарифмического роста, последовательно переходящая сначала в стационарную фазу (на втором месяце существования культуры), а затем — в медленное отмирание (начиная с 6-й недели после посева). Отмирание культуры выражалось в уменьшении общей биомассы, включающем снижение количества особей в чашках Петри и их измельчение.

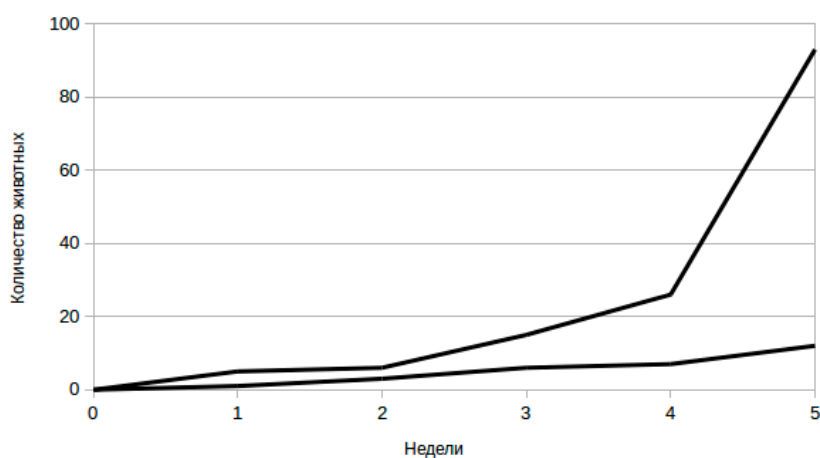


Рис. 8. Динамика восстановления количества *Trichoplax* sp. H2 после диссоциации с помощью 0,1%-ного БСА. Два независимых эксперимента с ростом животных в отдельных чашках Петри

Fig. 8. Dynamics of *Trichoplax* sp. H2 regeneration after dissociation with 0.1 % BSA. Two independent experiments with animal growth in separate Petri dishes

ОБСУЖДЕНИЕ

Использование ограниченного числа модельных организмов, таких как *Escherichia coli* (Migula, 1895), *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900), *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830, *Mus musculus* Linnaeus, 1758 и т. д., принадлежащих к разным таксономическим группам, позволило биологам сосредоточить усилия на изучении молекулярных механизмов жизни и привело к пониманию биологических процессов на молекулярном уровне, а также даёт возможность модифицировать живые объекты (Sommer, 2009). Среди гидробионтов, помимо *Danio rerio* (Hamilton, 1822), уже несколько десятилетий общепризнанными объектами изучения биологии развития являются *Hydra vulgaris* Pallas, 1766, *Nematostella vectensis* Stephenson, 1935 (Layden et al., 2016), *Ciona intestinalis* (Linnaeus, 1767) (Liu et al., 2006), *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Gildor et al., 2016) и др. Заметен возрастающий интерес к новым модельным объектам, один из которых — *Trichoplax* sp. Этот уникальный многоклеточный организм без нервной системы относится к базальным Metazoa (Heyland et al., 2014), поэтому интересно знать, как осуществляется координация его функционирования. Однако данный объект остаётся трудным как для биологии развития, так и для молекулярной генетики из-за слабой изученности его жизненного цикла и регенерационных способностей (Eitel et al., 2011; Kamm et al., 2018), неявной симметрии, неопределённости плана строения и экспрессии

соответствующих генов (DuBuc et al., 2019 ; Schwartz, 1984 ; Zuccolotto-Arellano & Cuervo-González, 2020), а также из-за предполагаемого отсутствия стволовых клеток по причине преимущественной вегетативной репродукции (Ruthmann, 1977).

Работа с отдельными клетками трихоплакса — это основа для исследований молекулярно-генетическими методами. С другой стороны, способность к генетической трансформации у бактерий и к генетической трансфекции у эукариотических клеток в культуре связана с экспоненциальной фазой роста, характеризующейся максимальным числом митозов (Sambrook & Russell, 2001). Именно поэтому мы уделили значительное внимание получению отдельных клеток трихоплаксов и дальнейшей их агрегации для восстановления репродуктивных животных. При этом отметим, что рост трихоплаксов в чашках Петри заметно отличается от их культивирования в аквариуме (Pearse, 1989).

Решающими факторами в наших условиях были постоянство pH в среде и периодическая смена ASW, позволяющая удалять продукты жизнедеятельности трихоплаксов. Закисление среды и смена воды влияли на форму кривой роста, выражаясь в появлении ступенек (рис. 1), что затрудняло выявление начала перехода к стационарной фазе роста. Поедание водорослей животными приводило в конце концов к гибели культуры. Такое поведение трихоплаксов, как поиск пищи, остановка и распластывание на субстрате, а также пищевые реакции при индивидуальном кормлении служили критерием физиологического состояния животных. Наиболее однородные особи выявлены на экспоненциальной стадии роста.

Возможность манипулирования отдельными клетками и регенерация после диссоциации впервые продемонстрированы в начале XX в. для губок (Galtsoff, 1925 ; Wilson, 1907, 1910), а регенерация гидры открыта А. Трамбле ещё раньше — в середине XVIII в. (Lenhoff & Lenhoff, 1986). Подвижность и регенерационные способности *Trichoplax adhaerens* являются предметом активного изучения со второй половины XX в. (Kuhl & Kuhl, 1963, 1966). В наших экспериментах *Trichoplax* sp. H2 продемонстрировал высокий регенеративный потенциал и тканевую пластичность в опытах, когда животное разрезали радиально на несколько частей. Рассечённые особи оставались прикрепленными к субстрату, но изгибались так, чтобы минимизировать площадь повреждённой поверхности и окружить рану здоровой тканью. Трихоплаксы восстанавливались значительно медленнее из 1/4 и особенно 1/8 частей, чем из 1/2 части, в силу меньшего соотношения между площадью интактной поверхности и площадью раневой зоны. Среди индивидуальных клеток, полученных в результате диссоциации пластинки трихоплакса, преобладали эпителиальные клетки с ресничкой, сохраняющие двигательную активность не менее 12 ч. Однако же их округлая форма не соответствовала таковой клеток, входящих в состав тела животного (Smith et al., 2014), что может быть результатом отсутствия соседей или действия осмотического давления среды. Также найдены неподвижные клетки грушевидной формы, предположительно дериваты липофильных клеток. Однако обнаружение менее представительных типов клеток с помощью световой микроскопии в наших условиях было невозможно, поэтому в экспериментах по репаративной регенерации был использован весь пул доступных клеток в надежде на естественную селекцию малодифференцированных клеток при восстановительном морфогенезе. Подтверждением сказанного является отторжение части материала, который, возможно, содержал дифференцированные эпителиальные клетки и клетки середины пластинки (Schwartz, 1984). Общее количество клеток в животном размером 0,5–1,0 мм по данным проточной цитометрии было округлено до 10 000, что почти совпадает с результатами электронной микроскопии, где число клеток в трихоплаксе размером 1 мм составляло 50 000 (Smith et al., 2014).

В опытах по диссоциации трихоплаксов с помощью 10%-ного БСА в течение разных периодов времени показано, что животные теряют способность к восстановлению пропорционально продолжительности экспозиции, что связано, вероятно, с преимущественной потерей

периферийных клеток и согласуется с результатами инкубирования трихоплаксов в бескальциевой среде. Это свидетельствует в пользу существования тотипотентных клеток в пояске пластинки трихоплакса, что расходится с данными по губкам, где большинство клеток способно к перемещениям, а также к трансдифференцировкам (Bond, 1992 ; Harris, 1987). Диссоциация пластинки трихоплаксов на отдельные клетки была более эффективна при применении 10 мкМ амлодипина, чем при использовании 0,1%-ного БСА, однако имела обратный эффект на восстановление животных после центрифугирования суспензии клеток. Обнаруженное отличие может быть объяснено разными механизмами диссоциации ткани трихоплакса: БСА способен связывать ионы кальция и блокировать рецепторы на поверхности клеток (Kuznetsov et al., 2020b), в то время как амлодипин нарушает работу кальциевых каналов (Кузнецов и др., 2020a). Использование бескальциевой среды не приводило к последующему восстановлению животных, как и в других опытах (Ruthmann & Terwelp, 1979).

Результаты наших экспериментов позволяют предположить, что гипотетические стволовые клетки трихоплакса расположены на периферии, в краевом пояске пластинки, но не способны самостоятельно пролиферировать и дифференцироваться без контакта с соседними клетками и без активных морфогенетических движений, что согласуется с предположением (Albertini et al., 2019). Подтверждением этому является реконфигурация клеток в течение нескольких суток при отсутствии пищи из бесформенных клеточных агрегатов в выраженные сферические образования с плоским эпителием и крупными срединными клетками (Thiemann & Ruthmann, 1988, 1991), но не самосборка из отдельных клеток, как описано в работе (Ruthmann & Terwelp, 1979). С другой стороны, развитие многоклеточных агрегатов на водорослевых матах, их последующая регенерация и рост экспериментальных трихоплаксов повторяли развитие интактных животных в культуре с отставанием на 1–2 недели.

Заключение. Широко представленные типы клеток трихоплакса маскируют возможное существование тотипотентных клеток и затрудняют их поиск. Тем не менее используемая нами система селекции стволовых клеток во время ассоциации диссоциированных клеток с помощью центрифугирования и дальнейшей дезагрегации осадка с проращиванием полученных агрегатов может быть полезна и/или критична при работе с клетками, компетентными к генетической трансфекции. Данное предположение требует дальнейшего изучения. Продолжением начатой работы на суспензии клеток трихоплакса может быть применение существующих методов трансфекции, таких как липофекция и электропорация, с использованием видоспецифичных генетических конструкций: это позволит исследовать и модифицировать механизмы клеточной сигнализации, функционирования и организации этого древнего многоклеточного организма. Метод трансгенеза, основанный на диссоциации ткани на отдельные клетки, в более широком аспекте может быть применим и к другим гидробионтам, обладающим высоким регенеративным потенциалом, например к губкам, книдариям и планариям.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации по Постановлению № 220 (договор № 14. W03.31.0015 от 28.02.2017).

Благодарность. Благодарим А. А. Солдатову за поддержку, А. А. Пономарёву, А. В. Дорошкова, О. В. Кривенко и Е. Г. Сахонь — за содействие при выполнении работы, А. В. Пиркову и И. В. Довгала — за критическое прочтение рукописи, анонимных рецензентов — за полезные замечания и советы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- | | |
|---|---|
| <p>1. Кузнецов А. В., Кулешова О. Н., Пронозин А. Ю., Кривенко О. В., Завьялова О. С. Действие прямоугольных электрических импульсов низкой частоты на трихоплакса (тип</p> | <p>Placozoa) // <i>Морской биологический журнал</i>. 2020а. Т. 5, № 2. С. 50–66. [Kuznetsov A. V., Kuleshova O. N., Pronozin A. Yu., Krivenko O. V., Zavyalova O. S. Effects of low frequency</p> |
|---|---|

- rectangular electric pulses on *Trichoplax* (Placozoa). *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2020a, vol. 5, no. 2, pp. 50–66. (in Russ.). <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.05>
2. Романова Д. Ю. Разнообразие клеточных типов у гаплотида H4 Placozoa sp. // *Морской биологический журнал*. 2019. Т. 4, № 1. С. 81–90. [Romanova D. Y. Cell types diversity of H4 haplotype Placozoa sp. *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 81–90. (in Russ.). <https://doi.org/10.21072/mbj.2019.04.1.07>
 3. 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. Saint Petersburg : TESSA, 2005, 69 p. (in Russ.)]
 4. Albertini M. C., Fraternali D., Semprucci F., Cecchini S., Colomba M., Rocchi M. B. L., Sisti D., Di Giacomo B., Mari M., Sabatini L., Cesaroni L., Balsamo M., Guidi L. Bioeffects of *Prunus spinosa* L. fruit ethanol extract on reproduction and phenotypic plasticity of *Trichoplax adhaerens* Schulze, 1883 (Placozoa). *PeerJ*, 2019, vol. 7, art. no. e6789 (22 p.). <https://doi.org/10.7717/peerj.6789>
 5. Armon S., Bull M. S., Aranda-Diaz A., Prakash M. Ultrafast epithelial contractions provide insights into contraction speed limits and tissue integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, vol. 115, no. 44, pp. E10333–E10341. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802934115>
 6. Bond C. Continuous cell movements rearrange anatomical structures in intact sponge. *Journal of Experimental Zoology*, 1992, vol. 263, iss. 3, pp. 284–302. <https://doi.org/10.1002/jez.1402630308>
 7. Currie J. D., Kawaguchi A., Traspas R. M., Schuez M., Chara O., Tanaka E. M. Live imaging of axolotl digit regeneration reveals spatiotemporal choreography of diverse connective tissue progenitor pools. *Developmental Cell*, 2016, vol. 39, iss. 4, pp. 411–423. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.10.013>
 8. Dellaporta S. L., Xu A., Sagasser S., Jakob W., Moreno M. A., Buss L. W., Schierwater B. Mitochondrial genome of *Trichoplax adhaerens* supports Placozoa as the basal lower metazoan phylum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, vol. 103, no. 23, pp. 8751–8756. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602076103>
 9. DuBuc T. Q., Ryan J. F., Martindale M. Q. “Dorsal–ventral” genes are part of an ancient axial patterning system: Evidence from *Trichoplax adhaerens* (Placozoa). *Molecular Biology and Evolution*, 2019, vol. 6, iss. 5, pp. 966–973. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz025>
 10. Eitel M., Guidi L., Hadrys H., Balsamo M., Schierwater B. New insights into placozoan sexual reproduction and development. *PLoS One*, 2011, vol. 6, iss. 5, art. no. e19639 (9 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019639>
 11. Eitel M., Osigus H. J., DeSalle R., Schierwater B. Global diversity of the Placozoa. *PLoS One*, 2013, vol. 8, iss. 4, art. no. e57131 (12 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057131>
 12. Eitel M., Schierwater B. The phylogeography of the Placozoa suggests a taxon-rich phylum in tropical and subtropical waters. *Molecular Ecology*, 2010, vol. 19, iss. 11, pp. 2315–2327. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04617.x>
 13. Elkhatib W., Smith C. L., Senatore A. A Na⁺ leak channel cloned from *Trichoplax adhaerens* extends extracellular pH and Ca²⁺ sensing for the DEG/ENaC family close to the base of Metazoa. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, vol. 294, iss. 44, pp. 16320–16336. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010542>
 14. Galtsoff P. S. Regeneration after dissociation (an experimental study on sponges). II. Histogenesis of *Microciona prolifera*, verr. *Journal of Experimental Zoology*, 1925, vol. 42, iss. 1, pp. 223–255. <https://doi.org/10.1002/jez.1400420110>
 15. Gildor T., Malik A., Sher N., Avraham L., Ben-Tabou de-Leon S. Quantitative developmental transcriptomes of the Mediterranean Sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Genomics*, 2016, vol. 25, pp. 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2015.11.013>
 16. Grell K. G. Eibildung und Furchung von *Trichoplax adhaerens* F. E. Schulze (Placozoa). *Zeitschrift für Morphologie der Tiere*, 1972, vol. 73, iss. 4, pp. 297–314. <https://doi.org/10.1007/BF00391925>

17. Grell K. G. Embryonalentwicklung bei *Trichoplax adhaerens* F. E. Schulze. *Naturwissenschaften*, 1971, vol. 58, iss. 11, pp. 570. <https://doi.org/10.1007/BF00598728>
18. Grell K. G., Benwitz G. Elektronenmikroskopische Beobachtungen über das Wachstum der Eizelle und die Bildung der „Befruchtungsmembran“ von *Trichoplax adhaerens* F. E. Schulze (Placozoa). *Zeitschrift für Morphologie der Tiere*, 1974, vol. 79, iss. 4, pp. 295–310. <https://doi.org/10.1007/BF00277511>
19. Grell K. G., Benwitz G. Ergänzende Untersuchungen zur Ultrastruktur von *Trichoplax adhaerens* F. E. Schulze (Placozoa). *Zoomorphology*, 1981, vol. 98, iss. 1, pp. 47–67. <https://doi.org/10.1007/BF00310320>
20. Grell K. G., Ruthmann A. Placozoa. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Vol. 2. *Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora* / F. W. Harrison, J. A. Westfall (Eds). New York : Wiley-Liss, 1991, pp. 13–28.
21. Gruber-Vodicka H. R., Leisch N., Kleiner M., Hinzke T., Liebeke M., McFall-Ngai M., Hadfield M. G., Dubilier N. Two intracellular and cell type-specific bacterial symbionts in the placozoan *Trichoplax* H2. *Nature Microbiology*, 2019, vol. 4, iss. 9, pp. 1465–1474. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0475-9>
22. Hardy S., Legagneux V., Audic Y., Pailard L. Reverse genetics in eukaryotes. *Biology of the Cell*, 2010, vol. 102, iss. 10, pp. 561–580. <https://doi.org/10.1042/BC20100038>
23. Harris A. K. Cell motility and the problem of anatomical homeostasis. In: *Cell Behaviour: Shape, Adhesion and Motility. The Second Abercrombie Conf. [Proceed.]* / S. E. Heaysman, C. A. Middleton, F. M. Watt (Eds). Cambridge : The Company of Biologists L., 1987, pp. 121–140. (Journal of Cell Science Supplements ; Suppl. 8). https://doi.org/10.1242/jcs.1987.Supplement_8.7
24. Heyland A., Croll R., Goodall S., Kranyak J., Russell W. *Trichoplax adhaerens*, an enigmatic basal metazoan with potential. In: *Developmental Biology of the Sea Urchin and Other Marine Invertebrates: Methods and Protocols* / D. J. Carroll, S. A. Stricker (Eds). Totowa, NJ : Humana, 2014, pp. 45–61. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-974-1_4
25. Jackson A. M., Buss L. W. Shiny spheres of placozoans (*Trichoplax*) function in anti-predator defense. *Invertebrate Biology*, 2009, vol. 128, iss. 3, pp. 205–212. <https://doi.org/10.1111/J.1744-7410.2009.00177.X>
26. Jakob W., Sagasser S., Dellaporta S., Holland P., Kuhn K., Schierwater B. The *Trox-2* Hox/ParaHox gene of *Trichoplax* (Placozoa) marks an epithelial boundary. *Development Genes and Evolution*, 2004, vol. 214, iss. 4, pp. 170–175. <https://doi.org/10.1007/s00427-004-0390-8>
27. Kamm K., Osigus H. J., Stadler P. F., DeSalle R., Schierwater B. *Trichoplax* genomes reveal profound admixture and suggest stable wild populations without bisexual reproduction. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, iss. 1, art. no. 11168 (11 p.). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29400-y>
28. Kamm K., Schierwater B., DeSalle R. Innate immunity in the simplest animals – placozoans. *BMC Genomics*, 2019, vol. 20, iss. 1, art. no. 5 (12 p.). <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5377-3>
29. Kuhl W., Kuhl G. Bewegungsphysiologische Untersuchungen an *Trichoplax adhaerens* F. E. Schulze. *Zoologischer Anzeiger Supplement*, 1963, vol. 26, pp. 460–469.
30. Kuhl W., Kuhl G. Untersuchungen über das Bewegungsverhalten von *Trichoplax adhaerens* F. E. Schulze (Zeittransformation: Zeitraf-fung). *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, 1966, vol. 56, iss. 4, pp. 417–435. <https://doi.org/10.1007/BF00442291>
31. Kuznetsov A. V., Halaimova A. V., Ufim-tseva M. A., Chelebjeva E. S. Blocking a chemical communication between *Trichoplax* organisms leads to their disorderly movement. *International Journal of Parallel, Emergent and Distributed Systems*, 2020b, vol. 35, iss. 4, pp. 473–482. <https://doi.org/10.1080/17445760.2020.1753188>
32. Layden M. J., Rentzsch F., Röttinger E. The rise of the starlet sea anemone *Nematostella vectensis* as a model system to investigate development and regeneration. *WIREs Developmental Biology*, 2016, vol. 5, iss. 4, pp. 408–428. <https://doi.org/10.1002/wdev.222>
33. Lenhoff S. G., Lenhoff H. M. *Hydra and the Birth of Experimental Biology, 1744: Abraham Trembley's Memoires Concerning the Polyps*. Pacific Grove, CA : Boxwood Press, 1986. 192 p.
34. Liu L.-P., Xiang J.-H., Dong B., Natarajan P., Yu K.-J., Cai N.-E. *Ciona intestinalis* as an emerging model organism: Its regeneration under controlled conditions and methodology for egg

- dechoriation. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B – Biomedicine & Biotechnology*, 2006, vol. 7, iss. 6, pp. 467–474. <https://doi.org/10.1631/jzus.2006.B0467>
35. Lush M. E., Diaz D. C., Koenecke N., Baek S., Boldt H., St Peter M. K., Gaitan-Escudero T., Romero-Carvajal A., Busch-Nentwich E. M., Perera A. G., Hall K. E., Peak A., Haug J. S., Piotrowski T. scRNA-Seq reveals distinct stem cell populations that drive hair cell regeneration after loss of Fgf and Notch signaling. *eLife*, 2019, vol. 25, art. no. e44431 (31 p.). <https://doi.org/10.7554/eLife.44431>
36. Mayorova T. D., Hammar K., Winters C. A., Reese T. S., Smith C. L. The ventral epithelium of *Trichoplax adhaerens* deploys in distinct patterns cells that secrete digestive enzymes, mucus or diverse neuropeptides. *Biology Open*, 2019, vol. 8, iss. 8, art. no. bio045674 (13 p.). <https://doi.org/10.1242/bio.045674>
37. 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, iss. 1, art. no. e0190905 (20 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190905>
38. Moroz L. L., Sohn D., Romanova D. Y., Kohn A. B. Microchemical identification of enantiomers in early-branching animals: Lineage-specific diversification in the usage of D-glutamate and D-aspartate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, vol. 527, iss. 4, pp. 947–952. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.04.135>
39. Pearse V. B. Growth and behavior of *Trichoplax adhaerens*: First record of the phylum Placozoa in Hawaii. *Pacific Science*, 1989, vol. 43, no. 2, pp. 117–121.
40. Pearse V. B., Voigt O. Field biology of placozoans (*Trichoplax*): Distribution, diversity, biotic interactions. *Integrative & Comparative Biology*, 2007, vol. 47, iss. 5, pp. 677–692. <https://doi.org/10.1093/icb/icm015>
41. Romanova D. Y., Heyland A., Sohn D., Kohn A. B., Fasshauer D., Varoqueaux F., Moroz L. L. Glycine as a signaling molecule and chemoattractant in *Trichoplax* (Placozoa): Insights into the early evolution of neurotransmitters. *NeuroReport*, 2020, vol. 31, iss. 6, pp. 490–497. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001436>
42. Ruthmann A. Cell differentiation, DNA content and chromosomes of *Trichoplax adhaerens* F. E. Schulze. *Cytobiologie*, 1977, vol. 15, iss. 1, pp. 58–64.
43. Ruthmann A., Terwelp U. Disaggregation and reaggregation of cells of the primitive metazoan *Trichoplax adhaerens*. *Differentiation*, 1979, vol. 13, iss. 3, pp. 185–198. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1979.tb01581.x>
44. Sambrook J., Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 2344 p.
45. Schierwater B., Eitel M., Jakob W., Osigus H. J., Hadrys H., Dellaporta S. L., Kolokotronis S. O., Desalle R. Concatenated analysis sheds light on early metazoan evolution and fuels a modern “urmetazoon” hypothesis. *PLoS Biology*, 2009, vol. 7, iss. 1, art. no. e1000020 (9 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000020>
46. Schulze F. E. *Trichoplax adhaerens*, nov. gen., nov. spec. *Zoologischer Anzeiger*, 1883, vol. 6, no. 132, pp. 92–97.
47. Schulze F. E. Über *Trichoplax adhaerens*. *Physikalische Abhandlungen der Königlichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin*, 1891, abh. 1, s. 1–23.
48. Schwartz V. Das radialpolare Differenzierungsmuster bei *Trichoplax adhaerens* F. E. Schulze (Placozoa). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 1984, vol. 39, iss. 7–8, pp. 818–832. <https://doi.org/10.1515/znc-1984-7-822>
49. Sebé-Pedrós A., Chomsky E., Pang K., Lara-Astiaso D., Gaiti F., Mukamel Z., Amit I., Hejnal A., Degnan B. M., Tanay A. Early metazoan cell type diversity and the evolution of multicellular gene regulation. *Nature Ecology & Evolution*, 2018, vol. 2, iss. 7, pp. 1176–1188. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0575-6>
50. Senatore A., Reese T. S., Smith C. L. Neuropeptidergic integration of behavior in *Trichoplax adhaerens*, an animal without synapses. *Journal of Experimental Biology*, 2017, vol. 220, iss. 18, pp. 3381–3390. <https://doi.org/10.1242/jeb.162396>
51. Signorovitch A. Y., Buss L. W., Dellaporta S. L. Comparative genomics of large mitochondria in placozoans. *PLoS Genetics*,

- 2007, vol. 3, iss. 1, art. no. e13 (7 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030013>
52. Smith C. L., Abdallah S., Wong Y. Y., Le P., Har-racksingh A. N., Artinian L., Tamvacakis A. N., Rehder V., Reese T. S., Senatore A. Evolutionary insights into T-type Ca²⁺ channel structure, function, and ion selectivity from the *Trichoplax adhaerens* homologue. *Journal of General Physiology*, 2017, vol. 149, no. 4, pp. 483–510. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611683>
53. Smith C. L., Mayorova T. D. Insights into the evolution of digestive systems from studies of *Trichoplax adhaerens*. *Cell and Tissue Research*, 2019, vol. 377, iss. 3, pp. 353–367. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03057-z>
54. Smith C. L., Pivovarova N., Reese T. S. Coordinated feeding behavior in *Trichoplax*, an animal without synapses. *PLoS One*, 2015, vol. 10, iss. 9, art. no. e0136098 (15 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136098>
55. Smith C. L., Reese T. S., Govezensky T., Barrio R. A. Coherent directed movement toward food modeled in *Trichoplax*, a ciliated animal lacking a nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019, vol. 116, no. 18, pp. 8901–8908. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815655116>
56. Smith C. L., Varoqueaux F., Kittelmann M., Az-zam 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, iss. 14, pp. 1565–1572. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.046>
57. Sommer R. J. The future of evo-devo: Model systems and evolutionary theory. *Nature Reviews Genetics*, 2009, vol. 10, iss. 6, pp. 416–422. <https://doi.org/10.1038/nrg2567>
58. Srivastava M., Begovic E., Chapman J., Putnam N. H., Hellsten U., Kawashima T., Kuo A., Mitros T., Salamov A., Carpenter M. L., Siginorovitch A. Y., Moreno M. A., Kamm K., Grimwood J., Schmutz J., Shapiro H., Grigoriev I. V., Buss L. W., Schierwater B., Delaporta S. L., Rokhsar D. S. The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature*, 2008, vol. 454, iss. 7207, pp. 955–960. <https://doi.org/10.1038/nature07191>
59. Syed T., Schierwater B. *Trichoplax adhaerens*: Discovered as a missing link, forgotten as a hydrozoan, re-discovered as a key to metazoan evolution. *Vie et Milieu*, 2002, vol. 52, iss. 4, pp. 177–187.
60. Thiemann M., Ruthmann A. Alternative modes of asexual reproduction in *Trichoplax adhaerens* (Placozoa). *Zoomorphology*, 1991, vol. 110, iss. 3, pp. 165–174. <https://doi.org/10.1007/BF01632872>
61. Thiemann M., Ruthmann A. *Trichoplax adhaerens* F. E. Schulze (Placozoa): The formation of swimmers. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 1988, vol. 43, iss. 11–12, pp. 955–957. <https://doi.org/10.1515/znc-1988-11-1224>
62. *Transgenesis Techniques: Principles and Protocols*. 3rd ed. / E. J. Cartwright (Ed.). Totowa, NJ : Humana Press, 2009, 335 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-019-9>
63. Varoqueaux F., Williams E. A., Grandemange S., Truscello L., Kamm K., Schierwater B., Jékely G., Fasshauer D. High cell diversity and complex peptidergic signaling underlie placozoan behavior. *Current Biology*, 2018, vol. 28, iss. 21, pp. 3495–3501. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.08.067>
64. Wenderoth H. Transepithelial cytophagy by *Trichoplax adhaerens* F. E. Schulze (Placozoa) feeding on yeast. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 1986, vol. 41, iss. 3, pp. 343–347. <https://doi.org/10.1515/znc-1986-0316>
65. Wilson H. V. Development of sponges from dissociated tissue cells. *Fishery Bulletin*, 1910, vol. 30, pp. 1–35.
66. Wilson H. V. On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *Journal of Experimental Zoology*, 1907, vol. 5, iss. 2, pp. 245–258. <https://doi.org/10.1002/jez.1400050204>
67. Zuccolotto-Arellano J., Cuervo-González R. Binary fission in *Trichoplax* is orthogonal to the subsequent division plane. *Mechanisms of Development*, 2020, vol. 162, art. no. 103608 (9 p.). <https://doi.org/10.1016/j.mod.2020.103608>

**TRICHOPLAX SP. H2 CULTIVATION AND REGENERATION
FROM BODY FRAGMENTS AND DISSOCIATED CELL AGGREGATES:
OUTLOOK FOR GENETIC MODIFICATION**

**A. V. Kuznetsov^{1,2}, V. I. Vainer², Yu. M. Volkova²,
V. M. Tsygankova², D. N. Bochko², and V. S. Mukhanov¹**

¹A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation

²Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: andrey.kuznetsov@web.de

Trichoplax sp. H2, a simple multicellular animal cultivated in the laboratory, was studied with the aim of its further genetic modification. The idea here is to introduce genetic information into a cell suspension after dissociation of the *Trichoplax* body into single cells, followed by their aggregation and regeneration of the resulting agglomerates into a viable animal. 1. We analyzed the dynamics of the *Trichoplax* growth in Petri dishes on *Tetraselmis marina* algal mats. Specimens were uniform on the exponential growth stage. 2. Trichoplaxes were cut radially in a post-traumatic regeneration research, and the regeneration of the obtained parts was investigated under a microscope. Growth and reproduction rate of animals on nutrient mats were determined that decreased as the animals had been cut. The missing part of the *Trichoplax* body was replaced by remodeling of remaining cells. 3. The animals after a vital staining were dissociated into single cells in a medium with no divalent cations. Pear-shaped or rounded cells were identified, as well as epithelial cells with flagella maintaining motion activity for more than 12 hours. 4. *Trichoplax* plates were disintegrated in the presence of 10 μ M amlodipine to quantify a cell population using flow cytometry. As estimated, *Trichoplax* (0.5–1 mm in size) consists of approximately 10,000 cells. 5. Treatment of animals with 10 % BSA (Bovine Serum Albumin) during various exposure intervals suggests a hypothesis on the existence of totipotent cells at the periphery of the *Trichoplax* body, probably in the rim. 6. In the course of reparative regeneration experiments, we achieved *Trichoplax* dissociation into single cells with 0.1 % BSA treatment and the following recreation of the viable organisms by centrifugation of a cell suspension and subsequent dispersion of a large pellet into fragments up to 0.1 mm *prior* to plating multicellular aggregates on nutrient mats. 7. The development of the aggregates was accompanied by active motion of cells and epithelialization of the surface, which resulted in cell growth, formation of a plate, and further vegetative division of *Trichoplax*. As assumed, the artificial stage of a single cell in a line of asexual reproductions allows to introduce foreign genetic information into *Trichoplax*, for example, in order to study the signal processing, organization, and functioning of this multicellular organism. Transgenesis, which is based on the dissociation of an animal body into single cells, could be applied to other organisms with high regenerative potential.

Keywords: *Trichoplax*, Placozoa, post-traumatic and reparative regeneration, cell dissociation and aggregation, cellular engineering, methods of transgenesis