

ЗАМЕТКИ

УДК 593.1-14:[57.044:546.47]

**НАРУШЕНИЕ КООРДИНАЦИИ ДВИЖЕНИЙ  
*HOILUNGIA HONGKONGENSIS* (PLACAZOZA)  
В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ  $Zn^{2+}$**

© 2023 г. А. В. Кузнецов, Н. И. Бобко

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,  
Севастополь, Российская Федерация  
E-mail: [kuznet61@gmail.com](mailto:kuznet61@gmail.com)

Поступила в редакцию 24.05.2021; после доработки 26.06.2023;  
принята к публикации 04.08.2023; опубликована онлайн 21.09.2023.

*Hoilungia hongkongensis* принадлежит к типу пластинчатые (Placozoa) — простейшим многоклеточным организмам с динамическим планом строения тела. В поддержании целостности этих животных важную роль играют ионы кальция. В настоящей работе экспериментально изучено влияние ионов цинка на взаимодействие клеток *H. hongkongensis*. При увеличении концентрации ионов  $Zn^{2+}$  на 20–25 мкМ нарушается согласованность амёбоидного движения, что приводит к образованию «ветвистых» форм животного. Локомоторные реснитчатые клетки двигаются хаотично и независимо друг от друга. Эксперименты показали, что контактное взаимодействие клеток *H. hongkongensis* важно для скоординированных движений организма, в то время как ионы цинка могут конкурировать с ионами кальция, нарушая регуляцию и разрушая связь между клетками.

**Ключевые слова:** пластинчатые, локомоция, ионы кальция и цинка

Возможно, что микроэлементы сыграли важную роль как катализаторы зарождения жизни на Земле. Изменение состава микроэлементов в океанах в течение геологического времени позволяет предполагать, как их доступность в морской среде влияла на ранние этапы биологической эволюции [Dupont et al., 2006]. Так, избыток Fe, Co и Cu в архейской эре способствовал их широкому использованию прокариотами. В палеопротерозое-мезопротерозое происходило увеличение содержания Mo в океане и заметное снижение Fe, Co и Cu, что способствовало появлению альтернативных путей метаболизма и возникновению эукариот. Общее увеличение концентрации таких элементов, как Mo, Zn, Ni и Cu, в неопротерозое и кембрии было благоприятным для усложнения и диверсификации древней биоты [Robbins et al., 2016]. Высказано мнение, что появление первых пластинчатых организмов связано с отношением концентраций ионов  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  в арагонитовом океане в эдиакарский или криогенный периоды [Erwin, 2015; Mayorova et al., 2018].

Гонконгская хойлунгия *Hoilungia hongkongensis* Eitel, Schierwater & Wörheide, 2018 (гаплотип H13), как и трихоплакс *Trichoplax adhaerens* Schulze, 1883 (гаплотип H1), является простейшим многоклеточным организмом, имеющим размер до 1–2 мм, и состоит примерно из 50 тыс. клеток, которые образуют трёхслойную пластинку [Smith et al., 2014]. Движение животного осуществляется за счёт биения ресничек вентрального эпителия и сокращения

пластинки [Armon et al., 2018]. Считается, что целостность организма поддерживается за счёт  $\text{Ca}^{2+}$ -мостиков, так как трихоплакс разрушается под действием хелатирующих агентов, которые связывают ионы кальция [Ruthmann, Terwelp, 1979].

Известно, что ионы металлов конкурируют за места связывания с белками согласно ряду устойчивости комплексов Ирвинга — Вильямса,  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} \sim \text{Zn}^{2+}$  [Rosenzweig, 2002], а ионы  $\text{Zn}^{2+}$  замещают ионы  $\text{Ca}^{2+}$  при адсорбции [Zachara et al., 1988]. В предыдущем исследовании показано [Kuznetsov et al., 2021], что ионы  $\text{Zn}^{2+}$ , как и ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , располагаются в специфических сайтах связывания молекул клеточной адгезии кадгеринов и, таким образом, разрушают кальциевые мостики, что приводит к диссоциации тела трихоплакса на отдельные клетки. В данной статье акцент сделан на рассмотрении нарушения взаимодействия между клетками хойлунгии под действием ионов цинка.

Цель работы — изучить морфологические изменения *Hoilungia hongkongensis* при воздействии ионов  $\text{Zn}^{2+}$ .

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

*H. hongkongensis* культивировали в стеклянных чашках Петри диаметром 90 мм на матах одноклеточной зелёной микроводоросли *Tetraselmis marina* (Cienkowski) R. E. Norris, Hori & Chihara, 1980. Чашки находились в термостате при температуре +25 °C. Животных пересеивали на свежий мат каждые три недели, а искусственную морскую воду (artificial seawater, ASW) с солёностью 35 ‰ меняли один раз в неделю [Кузнецов и др., 2022; Kuznetsov et al., 2021]. Для каждого опыта отбирали не менее 20 особей хойлунгии. В серии из трёх экспериментов использовано более 500 животных. За 30–45 мин до начала опыта хойлунгий пересеивали в пластиковые чашки Петри с ASW без водорослей для адаптации. К особям, которые находились в 50 мл ASW, добавляли раствор  $\text{ZnCl}_2$  так, чтобы конечная концентрация ионов  $\text{Zn}^{2+}$  увеличилась на 10–25 мкМ, и изучали подопытных животных в течение разных промежутков времени: 15 и 30 мин; 1, 2, 4 и 24 ч. Исследования проводили под световыми микроскопами Zeiss Stemi 305 (Германия) и Nikon Eclipse Ts2R (Япония), оборудованными цифровыми камерами, при увеличении от  $\times 40$  до  $\times 400$ .

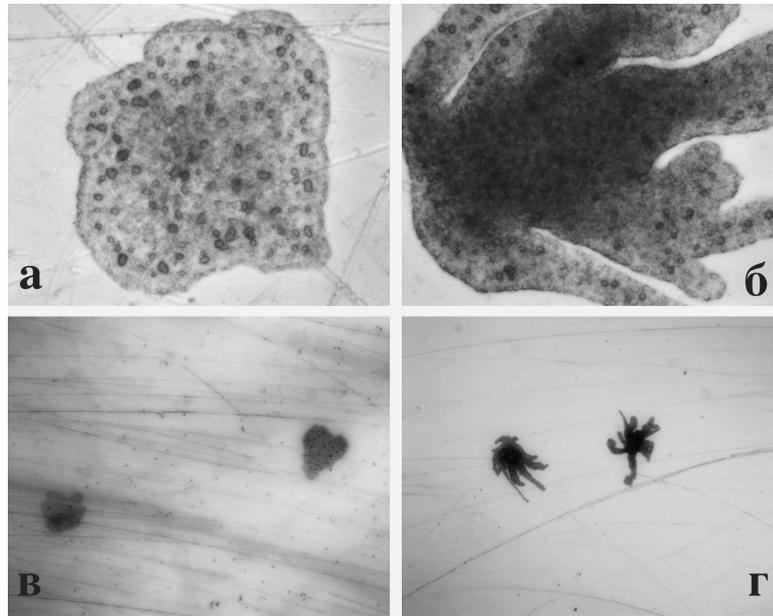
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инкубация хойлунгий в течение 2 ч после добавления 15–25 мкМ ионов  $\text{Zn}^{2+}$  вызывала изменение структуры и формы пластинки, что проявлялось в её утолщении, а также в появлении у отдельных особей множественных отростков, напоминающих щупальца. Отростки не двигались, в то время как тело организма перемещалось вперёд. Животные сохраняли вихревые движения групп клеток в центре пластинки и были способны перемещаться поступательно.

Дальнейшая экспозиция хойлунгий в течение суток с дополнительными 15 мкМ ионов  $\text{Zn}^{2+}$  в ASW вызывала увеличение доли животных с «ветвистой» структурой (68,1 %) или частично разрушенных организмов (2,8 %), причём части разрушающихся особей продолжали двигаться хаотично и независимо друг от друга за счёт биения ресничек клеток вентрального эпителия (рис. 1б, г). Добавление 25 мкМ ионов цинка приводило к градуальному росту доли «ветвистых» и разрушенных животных до 77,1 и 16,3 % соответственно (рис. 2).

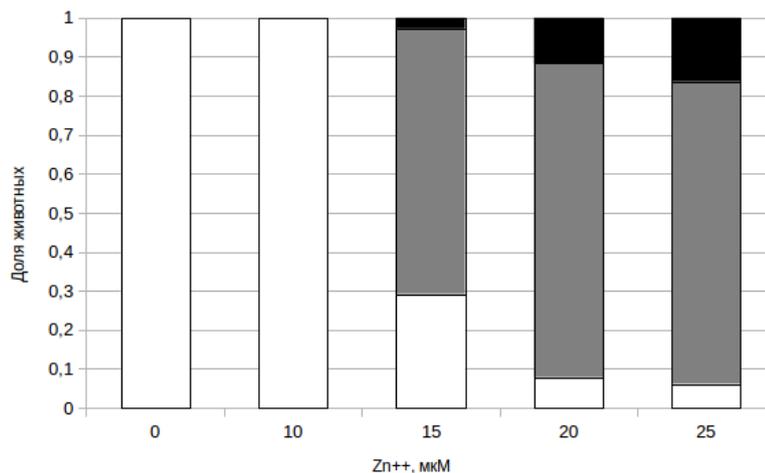
Известны такие механизмы токсичности цинка, как вытеснение меди из внутриклеточных белков [Plum et al., 2010], генерация супероксида [Ninsontia et al., 2016] и связывание с тиоловыми группами [Gazaryan et al., 2002]. Ионы  $\text{Zn}^{2+}$  способны взаимодействовать с сайтами связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на кадгерине и кальмодулине [Kuznetsov et al., 2021]. Отметим, что при последовательном увеличении концентрации ионов  $\text{Zn}^{2+}$ , которые могут замещать ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , доля «ветвистых» и разрушающихся животных росла пропорционально. Описанные

морфологические изменения, вероятно, возникают из-за первоначального нарушения передачи сигналов между отдельными клетками [Jékely, 2021; Senatore et al., 2017; Varoqueaux et al., 2018] и последующего разрушения непосредственных физических контактов между ними [Ruthmann, Terwelp, 1979], так как ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , помимо клеточной адгезии, участвуют в проведении сигналов внутрь клетки [Berridge et al., 2003].



**Рис. 1.** Морфологические изменения *Hoilungia hongkongensis* после инкубации в течение суток в присутствии ионов цинка: а, в — контроль без реагентов; б, г — 20 мкМ  $\text{Zn}^{2+}$ . Увеличение: а, б — 400 раз; в, г — 40 раз

**Fig. 1.** *Hoilungia hongkongensis* morphological changes following a day of incubation with zinc ions: а, в, control without reagents; б, г, 20  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ . Magnification: а, б, 400 times; в, г, 40 times



**Рис. 2.** Количественный анализ аномалий, возникших в результате инкубации *Hoilungia hongkongensis* в течение суток с добавлением разных концентраций ионов цинка. Интактные особи — белый цвет; «ветвистые» — серый; неподвижные, повреждённые или полностью разрушенные особи — чёрный. В опыте использовано 245 животных

**Fig. 2.** Quantitative examination of abnormalities that occurred when *Hoilungia hongkongensis* was incubated with zinc ions at various doses for a day. Intact individuals are shown in white color; “branched” individuals are shown in gray; motionless, damaged, or completely destroyed individuals are shown in black. There were 245 animals used in the experiment

Обратим внимание на токсичность цинка для пресноводной губки *Ephydatia fluviatilis* (Linnaeus, 1759) в концентрации, превышающей 0,1 мкМ [John, Harrison, 1988], что сравнимо с данными наших экспериментов на Placozoa, а также с данными для двух видов гидр, *Hydra vulgaris* Pallas, 1766 и *Hydra viridissima* Pallas, 1766, у которых 96-часовые значения ЛД<sub>50</sub> составляют примерно 35 и 14 мМ соответственно [Holdway et al., 2001]. Показано, что у актинии *Nematostella vectensis* Stephenson, 1935 уже через час после воздействия ионов Hg, Cu, Cd и Zn происходит активация генов факторов ранней транскрипции Egr1, AP1 и NF-κB с последующей экспрессией генов стрессового ответа, включая *Hsp*, *ABC* и *CYP* [Elran et al., 2014], что может компенсировать токсический эффект ионов тяжёлых металлов. У *Trichoplax* sp. H2, геном которого достаточно хорошо аннотирован [Kamm et al., 2018], присутствуют ортологи Egr1 (RDD41957.1), NF-κB (RDD44621.1) и Hsp (RDD46759.1). Возможно, что и у *H. hongkongensis* существуют подобные защитные системы.

Таким образом, экспериментальное воздействие ионами Zn<sup>2+</sup> приводит к рассогласованию амёбоидного движения у *H. hongkongensis*, выражающемуся в появлении неуправляемых «щупалец», что согласуется с результатами экспериментов на *Trichoplax* sp. H2 [Kuznetsov et al., 2021]. Отдельные области пластинки хойлунгии начинают двигаться без координации, независимо друг от друга. Позднее тело животного диссоциирует на отдельные клетки, что может быть результатом вмешательства ионов Zn<sup>2+</sup> в регуляцию ионами Ca<sup>2+</sup> двух фундаментальных процессов, таких как координация совместного функционирования клеток и поддержание целостной структуры тела животного.

*Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ гос. регистрации 121030300149-0).*

**Благодарность.** Авторы благодарят профессора А. У. Игамбердиева за ценные рекомендации при выполнении работы, Ю. С. Баяндину, А. В. Пиркову, Э. С. Челебиеву, О. В. Кривенко, С. В. Капранова и В. И. Рябушко — за полезные советы при подготовке рукописи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Кузнецов А. В., Вайнер В. И., Волкова Ю. М., Цыганкова В. М., Бочко Д. Н., Муханов В. С. Культивирование и регенерация трихоплакса *Trichoplax* sp. H2 из фрагментов тела и агрегатов диссоциированных клеток: перспективы генетической модификации // *Морской биологический журнал*. 2022. Т. 7, № 3. С. 60–79. [Kuznetsov A. V., Vainer V. I., Volkova Yu. M., Tsygankova V. M., Bochko D. N., Mukhanov V. S. *Trichoplax* sp. H2 cultivation and regeneration from body fragments and dissociated cell aggregates: Outlook for genetic modification. *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2022, vol. 7, no. 3, pp. 60–79. (in Russ.)]. <https://marine-biology.ru/mbj/article/view/353>
2. 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>
3. Berridge M. J., Bootman M. D., Roderick H. L. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003, vol. 4, iss. 7, pp. 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
4. Dupont C. L., Yang S., Palenik B., Bourne P. E. Modern proteomes contain putative imprints of ancient shifts in trace metal geochemistry. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, vol. 103, no. 47, pp. 17822–17827. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605798103>
5. Elran R., Raam M., Kraus R., Brekhman V., Sher N., Plaschkes I., Chalifa-Caspi V., Lotan T. Early and late response of *Nematostella vectensis* transcriptome to heavy metals. *Molecular Ecology*, 2014, vol. 23, iss. 19, pp. 4722–4736. <https://doi.org/10.1111/mec.12891>

6. Erwin D. H. Early metazoan life: Divergence, environment and ecology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences*, 2015, vol. 370, iss. 1684, art. no. 20150036 (7 p.). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0036>
7. Gazaryan I. G., Krasnikov B. F., Ashby G. A., Thorneley R. N., Kristal B. S., Brown A. M. Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive oxygen species production by lipoamide dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277, iss. 12, pp. 10064–10072. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108264200>
8. Holdway D. A., Lok K., Semaan M. The acute and chronic toxicity of cadmium and zinc to two hydra species. *Environmental Toxicology*, 2001, vol. 16, iss. 6, pp. 557–565. <https://doi.org/10.1002/tox.10017>
9. Jékely G. The chemical brain hypothesis for the origin of nervous systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences*, 2021, vol. 376, iss. 1821, art. no. 20190761 (13 p.). <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0761>
10. John C. F., Harrison F. W. Copper and zinc toxicity in *Ephydatia fluviatilis* (Porifera: Spongillidae). *Transactions of the American Microscopical Society*, 1988, vol. 107, no. 1, pp. 67–78. <https://doi.org/10.2307/3226409>
11. 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>
12. Kuznetsov A. V., Vainer V. I., Volkova Yu. M., Kartashov L. E. Motility disorders and disintegration into separate cells of *Trichoplax* sp. H2 in the presence of Zn<sup>2+</sup> ions and L-cysteine molecules: A systems approach. *BioSystems*, 2021, vol. 206, art. no. 104444 (11 p.). <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2021.104444>
13. 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>
14. Ninsontia Ch., Phiboonchaiyanan P. P., Chanvorachote P. Zinc induces epithelial to mesenchymal transition in human lung cancer H460 cells via superoxide anion-dependent mechanism. *Cancer Cell International*, 2016, vol. 16, art. no. 48 (16 p.). <https://doi.org/10.1186/s12935-016-0323-4>
15. Plum L. M., Rink L., Haase H. The essential toxin: Impact of zinc on human health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2010, vol. 7, iss. 4, pp. 1342–1365. <https://doi.org/10.3390/ijerph7041342>
16. Robbins L. J., Lalonde S. V., Planavsky N. J., Partin C. A., Reinhard Ch. T., Kendall B., Scott C., Hardisty D. S., Gill B. C., Alessi D. S., Dupont Ch. L., Saito M. A., Crowe S. A., Poulton S. W., Bekker A., Lyons T. W., Konhauser K. O. Trace elements at the intersection of marine biological and geochemical evolution. *Earth-Science Reviews*, 2016, vol. 163, pp. 323–348. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2016.10.013>
17. Rosenzweig A. C. Metallochaperones: Bind and deliver. *Chemistry & Biology*, 2002, vol. 9, iss. 6, pp. 673–677. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00156-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00156-4)
18. 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>
19. 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>
20. Smith C. L., Varoqueaux F., Kittelmann M., Azzam 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>
21. Varoqueaux F., Williams E. A., Grandemange S., Truscillo 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>
22. Zachara J. M., Kittrick J. A., Harsh J. B. The mechanism of  $Zn^{2+}$  adsorption on calcite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1988, vol. 52, iss. 9, pp. 2281–2291. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(88\)90130-5](https://doi.org/10.1016/0016-7037(88)90130-5)

**DISCOORDINATION  
OF *HOILUNGIA HONGKONGENSIS* (PLACOZOA) MOVEMENTS  
IN THE PRESENCE OF  $Zn^{2+}$  IONS**

**A. V. Kuznetsov and N. I. Bobko**

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

E-mail: [kuznet61@gmail.com](mailto:kuznet61@gmail.com)

Placozoa are the simplest multicellular organisms with a dynamic body plan. Calcium ions play a significant role in maintaining the integrity of these animals. We studied the effect of zinc ions on the interaction of *Hoilungia hongkongensis* cells. The coordination of amoeboid movement was disrupted by the addition of 20–25  $\mu M$   $Zn^{2+}$  ions, which led to the formation of “branched” forms of animals. Locomotor ciliated cells moved without coordination and independently of each other. Experimental research showed that the contact interaction of *H. hongkongensis* cells is important for coordinated movements of the organism, whereas zinc ions can compete with calcium ions, disrupting the regulation and destroying the connection between cells.

**Keywords:** Placozoa, locomotion, calcium and zinc ions