



Конкурс для школьников «Гениальные мысли» Автореферат проекта победителя I степени

Название работы – Трихоплакс для нанобионики.

Автор – Козырицкий Даниил Витальевич, 8 класс, ГБОУ «Гимназия № 8», г. Севастополь.

Руководители – Кузнецов Андрей Вадимович, д.б.н., лаборатория «Биоразнообразие и функциональной геномики Мирового океана» ФИЦ ИнБЮМ им. А. О. Ковалевского РАН; Минаева Светлана Олеговна, педагог дополнительного образования ГБОУ ЦДО «Малая академия наук».

Основная идея работы, цели, задачи

Занимаясь проектами влияния светодиодного освещения с большой дозой синего света на здоровье детей, я узнал, что свет влияет на работу шишковидной железы, которая имеет микрокристаллы кальцита, нейропептидную сеть, вырабатывает гормоны серотонин и мелатонин, которые регулируют циркадные ритмы человека, его поведенческие реакции. Начав работать в проекте «Трихоплакс для бионики» (<https://www.youtube.com/watch?v=rkszDLEv3U0>) я с удивлением узнал, что это маленькое животное (размером до 1 мм) имеет в своей структуре микрокристаллы кальцита, нейропептидную сеть, триптофан и серотонин. Информации о влиянии света на поведенческую реакцию Trichoplax [1] не было, имелись противоречивые данные о его сенсорной системе. Группа исследователей по Trichoplax считает, что микрокристаллы являются чувствительными элементами гравитационных датчиков у Trichoplax [2,3,4]. Я задумался, как же он выжил без светочувствительной системы в течении 780 млн. лет на коралловых рифах, которые пестрят многообразием красок и потенциальных хищников. Я выдвинул гипотезу о том, что у нашего предка должен быть RGB-таксис, реализованный в простой сенсорной системе. Поняв механизм ее функционирования можно спроектировать на принципах нанотехнологий аналогичную систему для управления нанороботами, построенных на природоподобных технологиях из живых клеток и их составляющих, что отвечает концепции нанобионики.

Идея работы – поиск световой сенсорной системы (RGB-таксиса) у простейшего многоклеточного животного Trichoplax для построения аналогичной сенсорной системы управления нанороботами с помощью световых стимулов.

Цель – открыть RGB-таксис у Trichoplax для построения модели возможного механизма функционирования светочувствительного сенсора, который можно спроектировать на нанокристаллах, светочувствительных молекулах и молекулах-поляризаторах, а также нанозеркалах.

Для этого были поставлены задачи:

- изучить особенности световой среды обитания выжившего первого многоклеточного животного Trichoplax, особенности генома и клеточного строения Trichoplax;
- исходя из условий световой среды обитания выбрать световые стимулы для обнаружения RGB-таксиса у Trichoplax;
- собрать установку (оптический микроскоп с манипулятором) для подтверждения наличия у Trichoplax RGB-таксиса с учетом условий комфортной среды обитания животного;

- провести исследования поведения Trichoplax при различных световых стимулах для подтверждения гипотезы о наличии RGB-таксиса у Trichoplax;
- построить гипотетическую модель светочувствительного сенсора, который можно создать на нано-кристаллах арагонита, гуанина и молекул L-аргинина.

Актуальность и новизна работы

Интерес к работе связан с точки зрения нанобионики с построением нанокристаллических RGB-сенсоров для управления нанороботами, с биологической точки зрения с изучением эволюции цветного зрения у многоклеточных, с медицинской точки зрения с взаимодействием нано- и микрокристаллов с нейропептидной сетью шишковидной железы человека.

Актуальность работы обусловлена изучением кристаллических клеток, которые были открыты в 2004 году [6,7], как основы сенсорной светочувствительной системы Trichoplax для использования этой наноструктуры как основы для построения аналогичных структур у нанороботов, имеющих клеточное строение [5].

Новизна работы заключается в открытии RGB-таксиса у Trichoplax, что позволяет по-новому взглянуть на эволюцию цветного зрения от первого многоклеточного животного до человека. Принципы построения RGB-сенсора Trichoplax позволяют спроектировать аналогичные сенсоры с использованием природных нанотехнологий.

В работе используются стандартные животные TrichoplaxH2, выращенные в Лаборатории «Биоразнообразие и функциональной геномики Мирового океана» ФИЦ «ИнБЮМ им. А. О. Ковалевского РАН», оптический микроскоп собственной разработки для одновременного наблюдения и видео регистрации поведенческой реакции группы Trichoplax и члена этой группы с возможностью контролировать положение оптоволоконного монохромного источника света. Разработанная методика позволила подтвердить открытие RGB-таксиса у Trichoplax на оптическом микроскопе Nikon SMZ-1270 с одновременной видеорегистрацией (материалы вошли в фильм «Trichoplax Movement control RGB-taxis» <https://www.youtube.com/watch?v=cxIXm41d9mg> в лаборатории «Биоразнообразие и функциональной геномики Мирового океана» ФИЦ «ИнБЮМ им. А. О. Ковалевского РАН».

Основные результаты

Спектр световой среды обитания Trichoplax (Placozoa) в значительной степени определяет сенсорную структуру Trichoplax и его характер передвижения. Свет, достигающий глубин формирования коралловых рифов, на которых проживают морская биота и Trichoplax, в основном это свет коротковолновой области видимого солнечного света УФ-А365 нм-395 нм. Свет с такой длиной волны вызывает люминесценцию микрокристаллов арагонита коралла, которую используют симбиотические фотосинтезирующие водоросли. Механизм концентрации и адаптации света через арагонитовую структуру приводит к меньшему количеству светочувствительных фосфоресцирующих пигментов, необходимых для выживания симбионтов [8]. Это очень интересный факт, который нашел свое отражение в строении морских обитателей, в частности у Trichoplax на кристаллах арагонита в кристаллических клетках живут митохондрии.

Клеточный и геномный анализ показал, что у Trichoplax имеются предпосылки для построения сенсорной структуры, чувствительной к свету:

1. Набор генов-опсинов в геноме *Trichoplax*.
2. Наличие в кристаллических клетках *Trichoplax* микрокристаллов биоминерала кальцита со структурой арагонита, имеющих двойное лучепреломление и свечение (люминисценцию) красным светом (630нм) при облучении УФ светом (395нм). Данный кристалл является основой поляризационного зрения морских животных (хитоны, морские звезды, ракообразные).
3. Из анализа строения кристаллических клеток *Trichoplax* следует, что в их состав входит L-аргинин, от концентрации которого зависит поворот плоскости поляризации света, проходящего через арагонит. L-аргинин может связываться с органическими соединениями на основе рутения, что обеспечивает светочувствительность сенсора.
4. В сенсорных системах морских животных для повышения светочувствительности применяются отражатели из кристаллов гуанина, которые имеют наноразмерную структуру. Степень отражения света этими кристаллами может зависеть от величины (напряженности) внешнего магнитного поля, что представляет интерес в создании эффективных управляемых отражателей для нанооптических систем.

Для оценки возможности создания таких систем мною была выдвинута гипотеза о наличии RGB-таксиса у *Trichoplax*, простейшего многоклеточного животного, пережившего динозавров, что подтверждает высокую эффективность его сенсорной системы, обеспечивающей его выживание.

Исходя из спектра солнечного света, достигающего глубин обитания трихоплакса (глубина 5-20м), поляризованных источников света в среде его обитания, клеточного строения кристаллических клеток и перечня генов опсинов были выбраны источники световых стимулов. Обобщенные данные выбора приведены в таблице 1.

Таблица 1. Обобщенные результаты выбора световых стимулов

| Характеристика светового стимула | Глубина, на которой поглощается 99% света, метр (м) | Наличие генома опсина, соответствующего определенной длине волны света | Источники света в среде обитания | Источники света для моделирования |
|----------------------------------|---|--|---|-----------------------------------|
| УФ 395нм | 107 | RDD38879.1 Violet-sensitive opsin [<i>Trichoplax</i> sp. H2] | Солнечная гелиовертикаль | Профессиональный фонарь геолога |
| Зеленый | 113 | RDD36429.1 Green-sensitive opsin [<i>Trichoplax</i> sp. H2] | Отраженный от водорослей свет | Лазер 532нм с оптоволокном |
| Красный | 4 | Вопрос открыт | Отраженный от арагонитового панциря хищника моллюска свет | Лазер 630нм-650нм |

| | | | | |
|--------------------|---------|--|--|--------------------|
| Синий | 254 | RDD38730.1 Blue-sensitive opsin [Trichoplax sp. H2] RDD42761.1 Blue-sensitive opsin [Trichoplax sp. H2] RDD39212.1 Blue-sensitive opsin [Trichoplax sp. H2] | Светодиодные источники света при 6500K | Синий |
| Оранжевый и Желтый | 25 и 51 | нет | Лампа накаливания | Оранжевый и Желтый |

Для исключения влияния постороннего освещения на проводимый эксперимент был собран оптический микроскоп «Леонардо 3.0» с двумя веб-камерами, которые могут работать с уровнем освещенности намного меньше, чем указанный уровень освещенности в работе [2]. Предметный столик микроскопа был обклеен светопоглощающей черной тканью. Данный микроскоп позволил получить эффект RGB-таксиса у Trichoplax и отработать дальнейшую методику исследований. Общая схема микроскопа «Леонардо 3.0» представлена на рис.1.

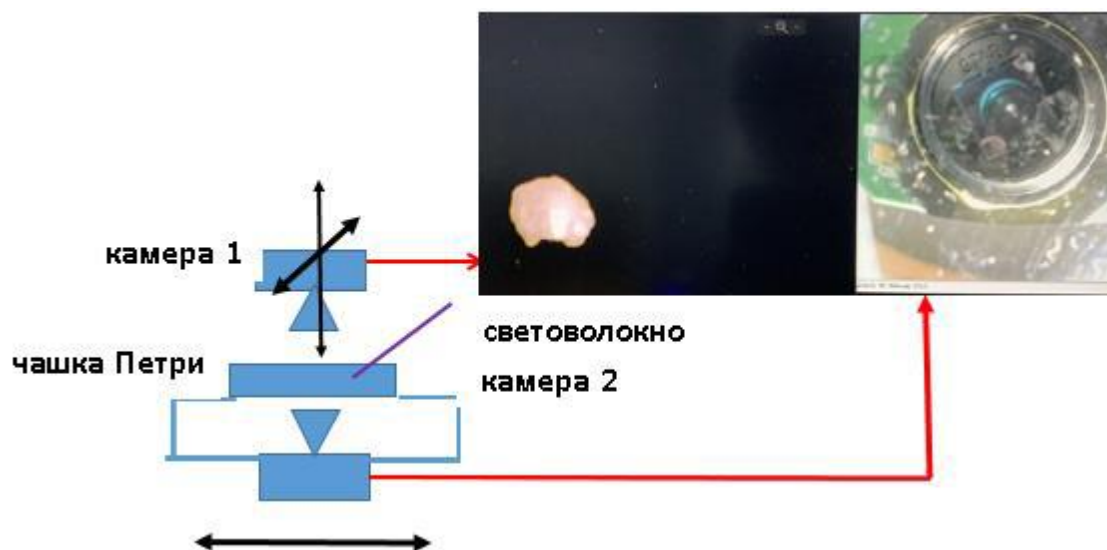


Рис.1. Общая схема микроскопа «Леонардо 3.0»

Оптический микроскоп «Леонардо 3.0» (специально разработанный для проведения исследования по обнаружению RGB-таксиса у Trichoplax), позволяет одновременно наблюдать поведение группы Trichoplax и каждого Trichoplax этой группы при низком уровне освещенности и стабильной температуре водной среды его обитания. В микроскопе применены две веб-камеры (верхняя - с матрицей 1,9 МП и нижняя – с матрицей 5МП, оптические оси их совмещены). Микроскоп оборудован манипулятором для подачи световых стимулов по оптоволокну. Изображение выводится с двух камер на экран ноутбук HP Laptop Model14-dk0028ur.

Обобщенные результаты первой серии опытов приведены в таблице 2.

Таблица 2. Обобщенные результаты испытаний на оптическом микроскопе «Леонардо 3.0»

| Источник света | Экспертная оценка поведенческой реакции трихоплекса | Результаты наблюдения |
|---|---|--------------------------------|
| Лампа накаливания | Форма тела интенсивно изменяется. Интенсивно уходит от источника света | Отрицательный фототаксис |
| Белый светодиод 6500К, (подсветка столика микроскопа Лаборатории) | Интенсивно убегает на края чашки Петри | Отрицательный фототаксис |
| Лазерная указка, зеленый лазер 532нм | Останавливается. На краях пластины наблюдается эффект кленового листа. Заострения по линии края. | Фототаксис, остановка движения |
| Светодиодный фонарь синий (фиолетовый) 395нм | После остановки форма животного округлая (круглая), изменяется с малой интенсивностью. Плавно двигается в сторону источника света | Положительный фототаксис |
| Лазерная указка с красным лазером 630-650нм | Останавливается. Не меняет форму и после непродолжительной остановки медленно уходит от источника света | Отрицательный фототаксис |

На основе отработанной методики на оптическом микроскопе «Леонардо 3.0» для подтверждения повторяемости выявленного RGB-таксиса были проведены работы на оптическом микроскопе Nikon SMZ-1270 без подсветки предметного столика в условиях лаборатории при выключенном освещении и затемненных окнах с использованием разработанных манипуляторов для подачи световых стимулов по оптоволокну (рис.2).



Рис.2. Подготовка оптоволоконных манипуляторов для микроскопа Nikon SMZ-1270 для проведения исследования на *Trichoplax*.

Результаты проведенных исследований по подтверждению RGB-таксиса у *Trichoplax* на оптическом микроскопе Nikon SMZ-1270 представлены в таблице 3.

Таблица 3. Воспроизводимость и повторяемость эффекта управления Trichoplax

| Испытуемый Trichoplax хранился в стандартных условиях лаборатории, при пересадке в чашку Петри перекрутил тело по типу «восьмерки». | | | |
|---|-------------------------------|--|-------------------|
| № цикла | Длина волны светового стимула | Реакция испытуемого Trichoplax | Время воздействия |
| 1 цикл | 532 нм | Замер и сохранял перекрученную форму | 58 сек |
| | Led6500K | Форма восьмерки сохранилась | 12 сек |
| | 395 нм | Начал интенсивно двигаться раскручивая восьмерку | 60 сек |
| 2 цикл | 532 нм | Процесс раскручивания остановлен, замер и на краях пластинки появились зубцы –эффект кленового листа | 37 сек |
| | 395 нм | Начался активный процесс раскручивания восьмерки до полного восстановления формы тела до стандартной, мгновенный переворот на 50-й секунде | 50 сек |
| | | Начал активно двигаться в сторону источника света | 15 сек |
| 3 цикл | 532 нм | Остановлено активное движение, на краях пластинки появились зубцы | 34 сек |
| | 395 нм | Восстановилась активность движения, края пластинки округлились | 82 сек |
| 4 цикл | 532 нм | Активность снизилась до остановки, края пластинки заострились | 60 сек |
| | 395 нм | Края округлились, активность движения возросла | 55 сек |
| 5 цикл | 532 нм | Остановлен, края пластинки заострились | 33 сек |
| | 395 нм | Началось активное движение, края пластинки округлились | 100 сек |

Остановка движения Trichoplax зеленым светом и запуск его движения УФ 395 нм говорят о том, что у него есть сенсорные каналы, чувствительные к свету с различным спектром, а также говорят о том, что его нейропептидная сеть выполняет логические команды по управлению клетками, обеспечивающими его движение.

Вторая группа испытаний была проведена с целью определения чувствительности сенсорной системы Trichoplax к монохромным световым стимулам после обработки Trichoplax наноцинком. Обработка наноцинком снижает эффективность работы ионных каналов кальция Ca²⁺, а также в значительной степени влияет на форму пластинки Trichoplax. Результаты световых испытаний Trichoplax, обработанного наноцинком сведены в таблицу 4.

Таблица 4. Результаты эксперимента с Trichoplax, обработанным наноцинком

| Дата | Информация о испытуемом трихоплексе | Характеристика источника света | | Реакция трихоплекса | Длительность воздействия по фильму |
|----------|--|---|---|--|------------------------------------|
| 24.01.21 | Животное после обработки Zn (нарушена форма тела) | УФ 365 нм | | Режим реанимации. Форма тела округлялась. Вся чашка освещалась | Испытания прекратили |
| | | В Ц И К Л Е | Зеленый 532 нм (оптоволокно) | Стоит в поле зрения микроскопа | 2 мин 6 сек |
| | Белый LED 6500K | | Убегает из поля зрения микроскопа. Форма тела вытянулась | 12 сек | |
| | УФ 365 нм | | Стоит в поле зрения микроскопа, форма тела округлая. Вся чашка освещалась | 1 мин 20 сек | |
| | Белый LED 6500K | Активно покидает поле зрения микроскопа. Вся чашка освещалась | | | |
| 27.01.21 | Животное на вторые сутки после воздействия обработки тела цинком | Зеленый 532 нм (оптоволокно) | | Стоит в поле зрения микроскопа, коробит ободок тела | 45 сек |
| | | УФ 365 нм | | Стоит спокойно в поле зрения микроскопа, не меняя форму тела. Вся чашка освещалась | 47 сек |
| | | Красный 630 нм – 650 нм | | Энергично убегает из поля зрения, не меняя форму. Возвращали в поле зрения, докручивая столик с чашкой | 31 сек |

Несмотря на обработку наноцинком животное сохранило способность реагировать на световые стимулы с разной длиной волны, что свидетельствует о наличии у Trichoplax функционального резервирования.

Проведенные исследования по управлению Trichoplax с помощью световых стимулов разной длины волны позволили сформировать сигналы светофора для управления Trichoplax. Наличие RGB-таксиса у Trichoplax подтверждено многочисленными испытаниями с видео фиксацией испытаний.

Предложена гипотетическая схема для создания светочувствительного нанодатчика для нанороботов типа ксеноботов, которая будет функционировать на основе выращенных нанокристаллов арагонита, гуанина и молекул L-аргинина. (рис.3)

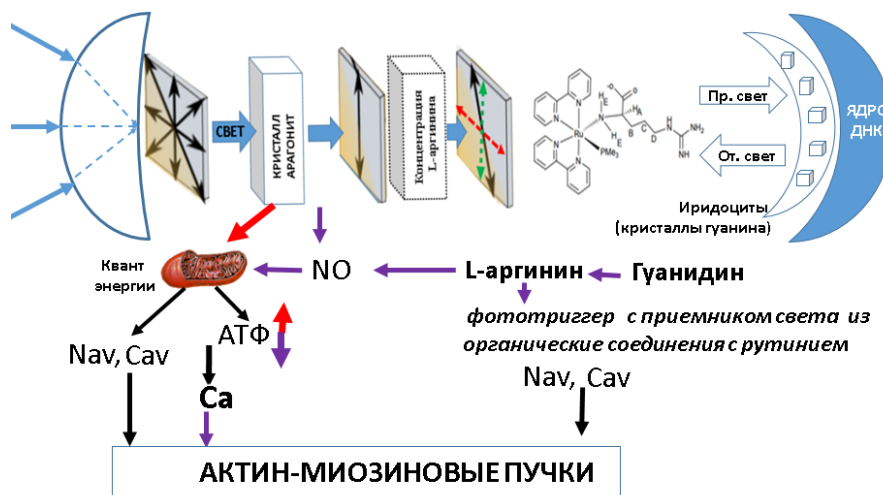


Рис.3. Гипотетическая схема светочувствительного нанодатчика для нанороботов типа ксеноботов.

Исследования эффективности работы предложенной гипотетической модели будут продолжены в рамках работы «Трихоплакс для бионики» в лаборатории «Биоразнообразие и функциональной геномики Мирового океана» ФИЦ ИНБЮМ им. А. О. Ковалевского РАН.

Выводы, заключение, перспективы

Выводы:

1. Проведен анализ литературных источников о среде обитания и строении Trichoplax. Анализ источников [2] показал, что работы по выявлению светочувствительной сенсорной системы Trichoplax совсем не освещены, а материалы по определению спектра света для управления Trichoplax отсутствуют, так как считается что размеры кристаллов арагонита у Trichoplax намного меньше, чем кристаллы арагонита у хитона, который имеет поляризационное зрение.
2. Автором впервые была выдвинута гипотеза о наличии RGB-таксиса у Trichoplax.
3. На основе особенностей среды обитания, генома и клеточного строения автором была разработана методика для обнаружения RGB-таксиса у Trichoplax и сформирован перечень световых сигналов для Trichoplax.
4. В ходе исследований на разработанном оптическом микроскопе с двумя веб-камерами получен и зарегистрирован эффект управления Trichoplax с помощью цветных световых стимулов с разными длинами волн. Эффект имеет устойчивое проявление и повторяемость, что подтверждает выдвинутую гипотезу о наличии RGB-таксиса у Trichoplax.
5. Разработано и создано дополнительное оборудование для обеспечения проводимых экспериментальных исследований. Серийные оптические микроскопы не позволяют одновременно наблюдать за поведением группы и одиночной особи из этой группы. В связи с этим был разработан двухкамерный оптический микроскоп для одновременной фиксации поведения группы и одиночной особи из этой группы при низких уровнях освещенности и при соблюдении постоянства комфортной температуры водной среды чашки Петри.
6. Проведены экспериментальные исследования по подтверждению высказанной гипотезы с видео регистрацией результатов, которые подтвердили с достаточным уровнем повторяемости результаты управления Trichoplax с помощью монохромных световых стимулов.
7. Предложена гипотетическая модель светочувствительного наносенсора на основе нанокристаллов арагонита, гуанина, молекул L-аргинина для нанороботов.

Заключение:

В ходе исследования автором открыт RGB-таксис у первого многоклеточного животного *Trichoplax*. С помощью зеленого света (532нм) останавливается движение *Trichoplax*, замирает движение клеток в его внутренней структуре, тело расплзается, а края заостряются. Под воздействием ультрафиолетового света (395нм) возникают вихревые движения внутренних клеток с последующим изменением формы *Trichoplax* и началом его движения в сторону источника ультрафиолетового света, который является преобладающим в световой среде на глубине обитания *Trichoplax*. При воздействии красного света (650нм) уменьшается скорость движения *Trichoplax*, происходит замирание движения внутренних клеток на время паузы, через некоторое время *Trichoplax* начинает движение от источника красного света. Данные результаты получены при комфортной для *Trichoplax* температуре водной среды.

Перспективы:

Изучение клеточного строения простейшего многоклеточного *Trichoplax* позволит сформулировать биологические основы для создания световых RGB-нано датчиков для нанороботов, имеющих клеточное строение и сконструированных на природоподобных технологиях, которые позволяют с поразительной точностью создавать оптические приборы из нанокристаллов арагонита и гуанина. Данные нанокристаллы, встроенные в органические структуры клеток, расширят функциональные возможности нанороботов из биологических клеток. Понимание процессов, протекающих в *Trichoplax* расширяет эволюционные знания об эволюции цветного зрения у многоклеточных. Работы в данном направлении продолжаются в рамках проекта «Трихоплакс для бионики» (<https://www.youtube.com/watch?v=rkszDLEv3U0>)

Список цитированных источников

1. Серавин Л. Н., Гудков А. В. *Trichoplax adhaerens* (тип Placozoa) – одно из самых примитивных многоклеточных животных. Санкт-Петербург ТЕССА, 2005. 69 с.
2. 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>.
3. Д.Ю. Романова Разнообразие клеточных типов у гаплотипа H4 PLACOZOA SP. Романова Морской биологический журнал, 2019, том 4, № 1, с. 81–90.
4. Михаил Никитин. Нейротрансмиттеры и их функции у трихоплакса - животного без нервной системы <https://www.youtube.com/watch?v=OwnA4oFro0w>
5. Ксеноботы: живые нанороботы из клеток лягушки <https://habr.com/ru/company/ua-hosting/blog/484182/>
6. C. Smith et al., 2014. Novel Cell Types, Neurosecretory Cells and Body Plan of the Early-Diverging Metazoan, *Trichoplax adhaerens* [https://www.cell.com/article/S0960-9822\(14\)00611-3/fulltext](https://www.cell.com/article/S0960-9822(14)00611-3/fulltext)
7. Carolyn L. Smith, Frédérique Varoqueaux, Maike Kittelmann, Rita N. Azzam, Benjamin Cooper, Christine A. Winters, Michael Eitel, Dirk Fasshauer, and Thomas S. Reese Novel Cell Types, Neurosecretory Cells, and Body Plan of the Early-Diverging Metazoan *Trichoplax adhaerens* *Current Biology*, Volume 24 Supplemental Information.
8. N Neumann-Micheau and H Tributsch Luminescence light collection technology in the aragonite of stone corals 2018 *Bioinspir. Biomim.* 13066006 <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-3190/aae1bf>