

УДК 593.1:591.1

ДЕЙСТВИЕ ПРЯМОУГОЛЬНЫХ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ИМПУЛЬСОВ НИЗКОЙ ЧАСТОТЫ НА ТРИХОПЛАКСА (ТИП PLASOZOA)

© 2020 г. А. В. Кузнецов^{1,3}, О. Н. Кулешова¹, А. Ю. Пронозин²,
О. В. Кривенко¹, О. С. Завьялова³

¹Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Российская Федерация

³Севастопольский государственный университет, Севастополь, Российская Федерация
E-mail: kuznet61@gmail.com

Поступила в редакцию 24.09.2019; после доработки 25.03.2020;
принята к публикации 26.06.2020; опубликована онлайн 30.06.2020.

Влияние низкочастотного электромагнитного излучения (НЭМИ) на растения и животных, включая человека, достаточно спорно. Мало известно и о воздействии НЭМИ на гидробионтов. Мы изучили действие прямоугольных импульсов напряжения различной амплитуды, длительности и скважности, пропущенных через морскую воду, на трихопласа (тип Placozoa) как на возможную тестовую лабораторную модель. В опытах использовали три штамма Placozoa, *Trichoplax adhaerens* (H1), *Trichoplax* sp. (H2) и *Hoilungia hongkongensis* (H13), отобранных на стационарной стадии роста культуры. Для генерации последовательности прямоугольных импульсов заданной длительности и скважности с частотой до 2 кГц применяли аппаратную платформу Arduino Uno. Среднее значение напряжения до 500 мВ регулировали с помощью схемы делителя напряжения. Для доказательства специфичности действия электрических импульсов на потенциалзависимые кальциевые каналы трихопласа использовали ингибитор активности кальциевых каналов амлодипин. Животных стимулировали электрическим током под стереомикроскопом. Electrodes располагали в непосредственной близости от животного. Исследовали сопутствующие изменения поведения и морфологии пластинки трихопласа. Выделяли стимулирующие и подавляющие воздействия. Наблюдения документировали с помощью фото- и видеосъемки. Отслеживали траектории движения отдельных особей. Увеличение напряжения на электродах при фиксированной частоте 20 Гц приводило к тому, что животные штамма H2 покидали «зону электродов» в течение нескольких минут при 25 мВ, однако теряли подвижность пропорционально росту напряжения и обездвиживались при 500 мВ. Именно поэтому в дальнейших опытах применяли напряжение 50 мВ. В экспериментах с двумя электродами, находящимися с одной стороны трихопласа, у животного было больше возможностей перемещаться в разных направлениях, чем в случае расположения электродов по обеим сторонам пластинки. Направление движения использовали как характеристический признак. Отмечено, что трихоплаксы мигрируют в области с низкой плотностью линий электрического поля, которые расположены вдали или за электродами. Животные из старой культуры отличались меньшей чувствительностью к электрическому раздражителю. Штамм H2 был наиболее чувствительным и демонстрировал более выраженные физиологические реакции на частотах 2 Гц и 2 кГц с напряжением 50 мВ, чем штамм H1 и особенно штамм H13. В зависимости от длительности стимулирующих прямоугольных импульсов, их числа, амплитуды и варьирующей частоты менялись двигательные реакции и морфология животных: от направленной или стохастической миграции в сторону анода/катода или от него до обездвиживания животных, увеличения оптической плотности по периферии и в центре пластинки и до сворачивания трихопласа и отделения его от субстрата. В дополнительных опытах на *Trichoplax* sp.

Н2 показано, что при длительности импульсов 35 мс и задержке импульсов от 1 мс до 10 с доля обездвиженных животных увеличивается до 80 % при минимальной задержке. Тем не менее в случае применения амлодипина в концентрации 25 нМ практически все трихоплаксы в течение нескольких минут сохраняли подвижность несмотря на обработку электрическими импульсами. Между тем при использовании амлодипина в концентрации 250 нМ животные двигались дискоординированно и не могли покинуть «электродную ловушку». Далее пластинка трихоплакса становилась ригидной, что выражалось в неизменности формы животного при движении. Наконец, амлодипин в концентрации 50 мкМ вызывал быстрое сворачивание краёв трихоплакса в розетку в вентрально-дорсальном направлении и последующую диссоциацию пластинки на отдельные клетки. В целом применяемое электрическое воздействие имело кумулятивный, но обратимый эффект, который, как предполагается, может быть связан с работой потенциалзависимых кальциевых каналов. Амлодипин в большой концентрации (50 мкМ) вызывал разрушение трихоплакса, в умеренной (250 нМ) он нарушал, вероятно, распространение волн активации, что приводило к дискоординации движений животного, а в малой (25 нМ) предотвращал электрошок.

Ключевые слова: прямоугольные электрические импульсы, трихоплакс, пластинчатые, потенциалзависимые кальциевые каналы

Электромагнитное излучение в диапазоне от единиц до нескольких тысяч Гц не оказывает прямого теплового воздействия на живую ткань, а действует опосредованно через определённые клеточные механизмы и вызывает соответствующие физиологические эффекты [18 ; 29]. Обнаружено, что низкочастотные электромагнитные излучения (далее — НЭМИ; extremely low frequency electric and magnetic fields, ELF-EMF) могут индуцировать экспрессию генов [41 ; 48] и вызывать пролиферацию клеток [43]. Лабораторные исследования показали, что НЭМИ влияют на клеточные мембраны и ионные каналы [22], в особенности на потенциалзависимые кальциевые каналы [12].

Интересно, что блокаторы кальциевых каналов значительно снижают различные эффекты НЭМИ [26]. Кроме того, биофизические свойства потенциалзависимых каналов могут объяснить молекулярные механизмы биологических эффектов НЭМИ. Например, нисходящий регуляторный клеточный ответ на такие воздействия может быть опосредован через Ca^{2+} /кальмодулин стимуляцию синтеза оксида азота (NO), физиологические реакции могут быть результатом стимуляции NO-зависимой cGMP-протеинкиназы G, а патофизиологические процессы — следствием NO-пероксинитрит-окислительного стресса. Описаны и другие опосредованные Ca^{2+} регуляторные пути, которые не зависят от оксида азота [11 ; 16 ; 25].

Существует несколько типов кальциевых каналов: высокопороговые каналы, с промежуточным порогом активации, низкопороговые [27]. Кальциевые каналы L-, P- и N-типов активируются при высоких значениях мембранного потенциала. К каналам L-типа принадлежат четыре протеина с множеством изоформ $\text{Ca}_v1.1$ – $\text{Ca}_v1.4$, кодирующиеся у человека генами *CACNA1S*, *CACNA1C*, *CACNA1D* и *CACNA1F*; они экспрессируются главным образом в скелетных мышцах и отвечают за сокращение сердечной и гладких мышц [21]. Каналы P- и N-типов представлены в нейронах белками $\text{Ca}_v2.1$ и $\text{Ca}_v2.2$ соответственно; они отвечают за высвобождение нейромедиаторов. К кальциевым каналам R-типа с промежуточным порогом активации относится протеин $\text{Ca}_v2.3$ [24 ; 35]. Низкопороговые кальциевые каналы принадлежат к T-типу. Ими обладают клетки с пейсмекерной активностью, например водители ритма сердца человека [5]. Эти каналы представлены белками $\text{Ca}_v3.1$ – $\text{Ca}_v3.3$ и кодируются генами *CACNA1G*, *CACNA1H* и *CACNA1I* соответственно [46]. Очевидная роль Ca_v3 -каналов T-типа проявляется в клеточной возбудимости, где их низкие напряжения активации позволяют легко осуществить деполяризацию мембраны. Также каналы T-типа играют роль в запуске механизма экзоцитоза у позвоночных и беспозвоночных [32 ; 45]. Ca_v3 -каналы присутствуют у примитивных животных и в одноклеточных организмах [23 ; 40].

Полезной моделью для изучения эффектов НЭМИ могут быть представители типа Placozoa, в частности *Trichoplax adhaerens* [30]. Трихоплакс имеет тело неправильной формы (размер — около 1 мм); оно сформировано двумя слоями эпителия, между которыми находится рыхлый

клеточный слой. Это крошечное морское животное построено из шести основных типов клеток [7 ; 39]. После первоначального описания, сделанного Ф. Э. Шульце в 1883 г. [31], трихоплакс вызвал интерес с точки зрения минимальных требований к метазоа. Отсутствие симметрии органов, нервных и мышечных клеток, базальной пластинки и внеклеточного матрикса не оставляло сомнений в древности происхождения этого животного. Однако, несмотря на примитивное строение, трихоплаксы способны координировать двигательную активность при кормлении [37] и демонстрировать хемотаксис [13], подтверждая существование сложных механизмов межклеточного взаимодействия и интеграции. Обнаружены быстрые ритмические сокращения дорсального эпителия трихоплакса [2] и предложена модель движения животного, основанная на диаграммах Вороного [38]. Структура, функция и ионная селективность одиночного кальциевого канала Т-типа из трихоплакса (TCa_v3) были охарактеризованы с помощью методики patch-clamp после его клонирования в эмбриональных клетках почки человека линии НЕК-293Т [36]. С учётом того, что Ca_v -каналы играют решающую роль как во внутриклеточной, так и в межклеточной передаче сигналов [23], и того, что трихоплакс имеет в своём геноме полный набор генов Ca_v1 , Ca_v2 и Ca_v3 , кодирующих Ca_v -каналы [15 ; 40], появилась возможность изучения молекулярных мишеней и механизмов, лежащих в основе эффектов НЭМИ на многоклеточные организмы.

Целью данной работы было изучить реакцию трихоплаксов на последовательности п-образных электрических импульсов, имитирующих воздействия, необходимые для открывания кальциевых каналов *in vivo*. Импульсы прямоугольной формы выбраны для воздействия на трихоплаксы потому, что они вызывают большее раздражение у биологических объектов, чем колебания любых других форм. Мы также сочли уместным использовать прямоугольные импульсы как идеализированную, «дискретную» модель электромагнитного излучения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Культивирование. В работе использовали три штамма Placozoa, такие как *Trichoplax adhaerens* (гаплотип H1), *Trichoplax* sp. H2 (гаплотип H2) и *Hoilungia hongkongensis* (гаплотип H13), из которых последний штамм можно отнести к отдельному виду [8 ; 9]. Животных культивировали в стеклянных чашках Петри диаметром 90 см на матах одноклеточной зелёной водоросли *Tetraselmis marina* в искусственной морской воде (ASW, Red Sea Salt, Red Sea Fish Pharm LTD, Израиль) с солёностью 35 ‰ при температуре +25 °C по стандартному протоколу [17]. Морскую воду меняли не реже одного раза в неделю. Значение pH поддерживали в диапазоне 7,8–8,0. За 1 час до начала эксперимента животных отсаживали в ASW на пластиковые чашки без водорослей.

Подготовка амлодипина. Добавляли производное дигидропиридина амлодипин ($\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{ClN}_2\text{O}_5$, 2-[(2-аминоэтокси)метил]-4-(2-хлорфенил)-1,4-дигидро-6-метил-3,5-пиридин дикарбоновой кислоты 3-этил 5-метиловый эфир в виде безилата, Тева) в 96%-ный этиловый спирт или в воду (ASW) и пересчитывали концентрацию согласно растворимости этого соединения в указанных растворителях.

Электростимуляция. Для генерации последовательности прямоугольных импульсов заданной длительности и скважности применяли стандартную платформу Arduino Uno R3 на базе 8-битного микроконтроллера AVR ATmega328P. Для визуального контроля использовали светодиод LED1, для предотвращения случайного короткого замыкания встроили последовательно диод (D1, 1N4001). Среднее значение напряжения регулировали с помощью потенциометра R2 (10 кОм) от +10 мВ до +1,5 В на делителе напряжения, как показано на рис. 1. Электроды помещали в морскую воду в непосредственной близости от животного на расстоянии примерно 1 мм друг от друга. В качестве тест-контроля возможного влияния посторонних предметов на изменение поведения животного использовали пластиковые или деревянные палочки либо металлические электроды, отключённые от контроллера.

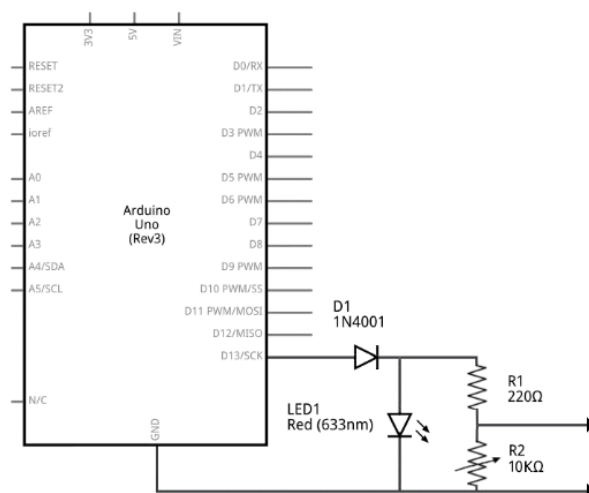


Рис. 1. Электронная схема для электростимуляции трихоплаксов

Fig. 1. Electronic circuit for *Trichoplax* electrical stimulation

Программный меандр. Продолжительность (длительность) импульсов и задержку (скважность) задавали программно в интервале от 0,5 мс до 10 с; программа выполнялась на контроллере в бесконечном цикле (см. Приложение 1: <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.05>). Пересчёт временных интервалов (мс) в частоту (Гц) проводили с учётом того, что 1 Гц соответствует 1000 мс. Для создания пакетов п-образных импульсов с изменяющейся длительностью и задержкой внутри пакета использовали инкрементирующий и декрементирующий программные циклы с шагом 1 мс (см. Приложение 2: <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.05>).

Микроскопия и обработка данных. Животных стимулировали электрическим током под стереомикроскопом ZEISS Stemi 305 при увеличении $\times 8$ и $\times 40$. Оценивали изменение поведения (двигательная активность, направление и траектория движения) и морфологических характеристик тела (опалесценция, форма). Выделяли стимулирующие и подавляющие воздействия, т. е. ведущие к повышению двигательной активности животного или к его обездвиживанию, шоку и параличу. Строевые трихоплаксы изучали под инвертированным микроскопом Nikon Eclipse Ts2R с ДИК-оптикой при максимальном увеличении $\times 600$. Общий вид и поведенческую активность животных документировали с помощью фото- и видеосъёмки. Обработку видеоматериала провели с помощью утилиты FFmpeg на сервере Huawei Fusion Server RH2288 V3. Траектории движения трихоплаксов отслеживали с помощью плагина wrMTrack программы ImageJ (National Institutes of Health, USA) на графической станции Dell Precision T5810.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика роста культуры. После пересева животных на свежие маты из водорослей культура трихоплаксов в течение нескольких дней находилась в состоянии адаптации к новым условиям, что выражалось в отсутствии прироста численности и размеров особей. По прошествии такой лаг-фазы трихоплаксы начинали расти с последующим делением. На следующем этапе, который можно соотнести с экспоненциальной фазой роста культуры, трихоплаксы активно росли и делились пополам один раз в три-четыре дня путём образования перетяжки с уменьшением размеров дочерних особей. Переход в стационарную фазу роста культуры отмечали через две-три недели, что сопровождалось двукратным уменьшением средних размеров животных и резким замедлением темпов прироста их численности. В стареющих культурах наблюдали измельчание особей, изменение их формы (вытягивание либо, наоборот, образование мелких сфер, которые открепляются от субстрата

и всплывают), а также отмирание животных. Именно поэтому через пять-шесть недель культивирования трихоплаксов пересаживали на свежие маты из водорослей в количестве 10–20 особей на чашку, и процесс культивирования повторялся. Для экспериментов использовали преимущественно животных, отобранных на стационарной стадии роста культуры.

Эксперименты с одним электродом. В тестах с применением маленьких стержней из пластика, древесины или металла не было замечено ярко выраженной реакции животных на посторонние предметы. В случае использования электродов, подключённых к контроллеру Arduino Uno, из которых один (анод или катод) располагался вблизи трихоплакса (штамм Н2), а другой — на значительном расстоянии (более 1 см), животное обычно удалялось от электрического раздражителя на дистанцию длиной от одного до трёх размеров своего тела (1–3 мм) и продолжало медленно перемещаться в случайном направлении. При продолжительности импульсов 100 мс и задержке 1 мс трихоплаксы убегали сразу, а в случае задержки 1 с — отползали от электродов с запаздыванием в несколько десятков секунд. Отмечено, что животные, взятые в эксперимент из старой культуры, отличались меньшей чувствительностью к электрическому раздражителю, что выражалось в увеличении времени задержки реакции и в уменьшении расстояния, на которое они передвигались.

Эксперименты с двумя электродами. В случае размещения двух стержней из металлов с разным электрохимическим потенциалом, образующих гальваническую пару возле трихоплакса, животное проявляло двигательную активность — начинало «исследовать» пространство, приближаясь и удаляясь от электродов, пока не находило «комфортное» положение в образовавшемся слабом электрическом поле (рис. 2).

При использовании источника постоянного тока (200 мВ) трихоплаксы избегали катод, но не приближались к аноду, а отползали в сторону, иногда бродили между электродами. Если животные подползали слишком близко к аноду, они оставались возле него и через некоторое время сморщивались. Во многом скорость реакции и направление движения зависели от начального положения животного и от расстояния между электродами. Напряжение 1,2 В было летальным для животных, т. е. они обездвиживались, кардинально меняли морфологию, откреплялись от субстрата и в дальнейшем разрушались.

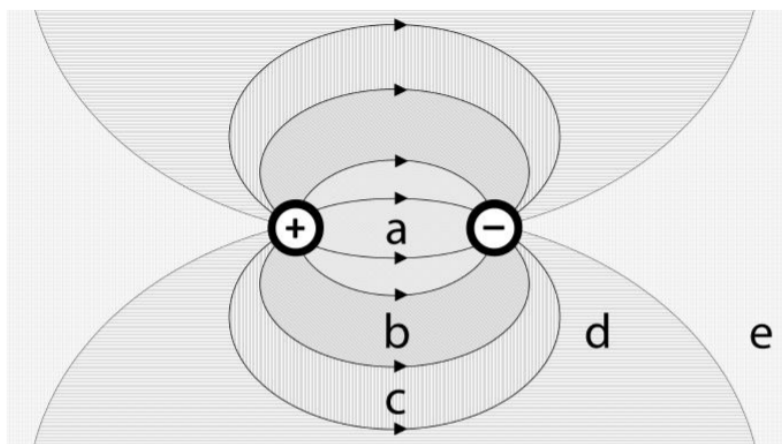


Рис. 2. Линии электрического поля в «электродной ловушке» для трихоплаксов: (а) «зона электродов» с расстоянием между электродами не более 1 мм; (б) зона обездвиживания соответствует расстоянию в один корпус трихоплакса (1 мм) от центра ловушки; (с) промежуточная зона; (d) зона вдали от электродов; (е) «зона комфорта» непосредственно за электродами (см. текст)

Fig. 2. Electric field lines in “electrode trap” for *Trichoplax*: (a) “electrode zone” with electrode gap no more than 1 mm; (b) immobilization zone corresponds to one *Trichoplax* body size (1 mm) from the center of the trap; (c) intermediate zone; (d) zone away from electrodes; (e) “comfort zone” just behind the electrodes (see the text for details)

Тестовые исследования проводили в морской воде с солёностью 35 ‰; применяли длительность и задержку импульсов по 35 мс (~ 30 Гц) со средним значением напряжения 50 мВ. Интересно, что в случае промышленной частоты (50 Гц) трихоплаксы не меняли существенно свою морфологию, начинали двигаться, предпочитали анод, отползали в сторону от электродов, иногда возвращались и снова удалялись от электродов.

Действие напряжения на трихоплаксов оценивали, варьируя амплитуду импульсов с помощью делителя напряжения при фиксированной частоте 20 Гц (см. Приложение 1: <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.05>). Основным критерием оценки служила доля обездвиженных животных, которые не покинули «зону электродов» в течение нескольких минут. Дополнительным критерием были патологические изменения морфологии животных — утолщение ободка пластинки, округление формы и уменьшение опалесценции. Доля таких животных увеличивалась пропорционально росту напряжения (рис. 3). При напряжении 25 мВ практически все животные в конечном итоге покидали «зону электродов», а при напряжении 500 мВ они, напротив, оставались в её границах, приобретая патологические признаки, хотя на следующий день после снятия воздействия восстанавливали интактный вид. На основании полученных результатов в дальнейших опытах применяли напряжение 50 мВ.

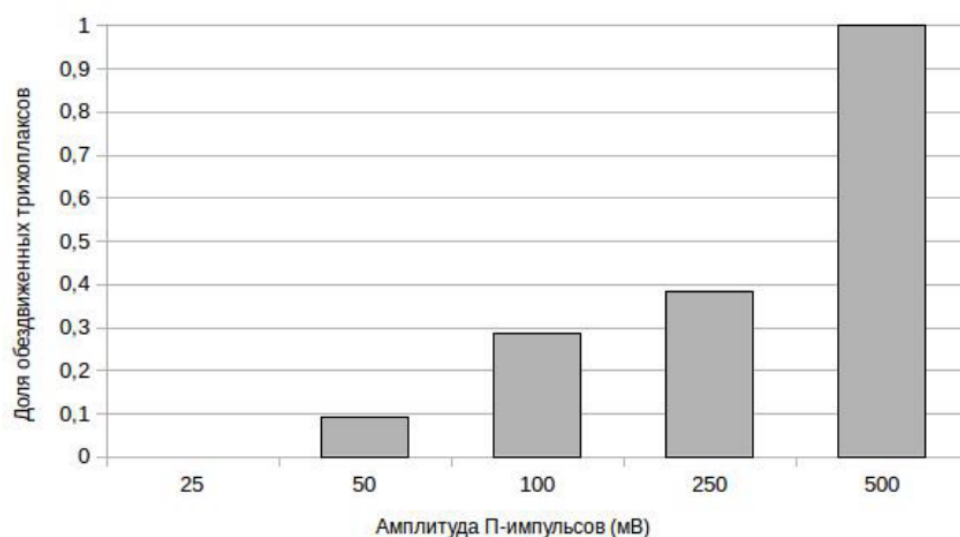


Рис. 3. Доля обездвиженных трихоплаксов *Trichoplax* sp. H2 по отношению к подвижным животным при различных значениях напряжения прямоугольных импульсов на частоте 20 Гц. В эксперименте использовано 59 животных

Fig. 3. Fraction of immobilized *Trichoplax* sp. H2 versus active animals at various voltage values of rectangular pulses at a frequency of 20 Hz. Totally 59 animals were used in the experiment

В основном мы использовали два активных электрода, расположенных в непосредственной близости по обе стороны пластинки трихоплакса. В качестве одного из действенных вариантов применяли импульсы с продолжительностью 100 мс и задержкой от 1 мс до 10 с. Для экспериментов использовали 139 животных штамма H2. В среднем для разных значений скважности в 67 % случаев наблюдали обездвиживание животных, помутнение по периферии и в центре пластинки с последующим уменьшением размеров и сморщиванием или сворачиванием трихоплакса. Данные изменения физиологического состояния и морфологи животного не были летальными. Трихоплаксы восстанавливались через несколько десятков минут после снятия воздействия раздражителя, что проявлялось в их распластывании на субстрате и в приобретении двигательной активности.

В опытах с двумя электродами, находящимися с одной стороны пластинки, вероятность покинуть зону стимулирующих электродов увеличивалась, причём у животного появлялась возможность движения в разных направлениях. Этот факт позднее использовали как характеристический признак для разных штаммов. В зоне обездвиживания возле электродов оставалось в среднем 56 % трихоплаксов.

Для уточнения полученных данных была проведена дополнительная серия опытов на 121 животном с использованием двух значительно отличающихся значений скважности, а именно задержки в 1 мс и 1 с, при длительности импульсов 100 мс. В случае размещения электродов на обеих сторонах пластинки трихоплакса доля уползших из зоны воздействия животных была незначительной и составляла 30 % при задержке 1 мс и 52 % — при задержке 1 с. В случае расположения электродов с одной стороны пластинки трихоплакса доля убежавших животных была больше и составляла 47 % для задержки каждого импульса в 1 мс и 76 % — для 1 с (рис. 4). Стоит отметить, что в опытах с двумя электродами по обе стороны животного трихоплаксу требовалось время для «принятия решения» о том, в каком направлении уползть из «электродной ловушки». Чаще трихоплакс двигался в сторону большей части своего тела, расположенной за пределами электродов.

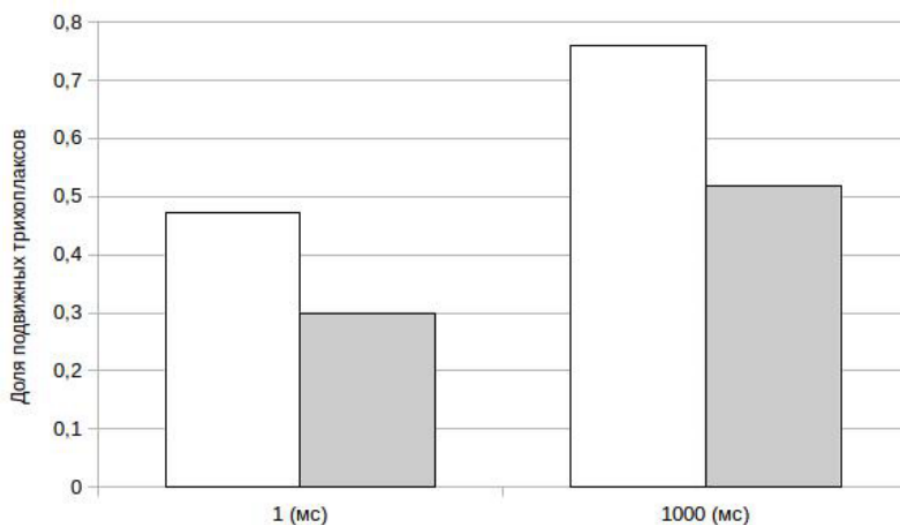


Рис. 4. Доля подвижных трихоплаксов *Trichoplax* sp. H2 по отношению к обездвиженным животным при длительности импульсов 100 мс и задержке 1 мс или 1 с; белый цвет — электроды на одном краю пластинки трихоплакса; серый цвет — электроды на противоположных краях пластинки трихоплакса. В эксперименте использовано 121 животное

Fig. 4. Fraction of active *Trichoplax* sp. H2 versus immobilized animals at pulse duration of 100 ms and delay of 1 ms or 1 s; white color indicates the electrodes on one side of *Trichoplax* plate; gray color indicates the electrodes on opposite sides of *Trichoplax* plate. Totally 121 animals were used in the experiment

Тестирование разных штаммов трихоплакса. В сравнительных опытах по воздействию прямоугольными импульсами со средним значением напряжения 50 мВ, коэффициентом заполнения 0,5 и частотой 2 Гц и 2 кГц на разные штаммы трихоплакса выявлено разнообразие паттернов поведения животных. Подсчитывали количество особей, передвигающихся от анода к катоду или наоборот — от катода к аноду. В экспериментах использовали 143 особи трихоплаксов; из них: штамм Н1 — 51 особь, штамм Н2 — 47, штамм Н13 — 45. В каждом опыте животному предстояло выбраться из «электродной ловушки», представляющей собой два электрода на противоположных краях тела (рис. 2). Проводили длительное наблюдение за изменением формы и за траекторией движения трихоплаксов (см. Приложение 3: <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.05>). Представители штаммов Н1 и Н13 перемещались в сторону уменьшения плотности силовых линий напряжённости

электрического поля и иногда вытягивались вдоль этих воображаемых линий (рис. 5). Животные штамма Н2, не удаляясь значительно от электродов, переползали на их обратную сторону — в «зону комфорта» с малой плотностью силовых линий электрического поля (табл. 1). Так, при низкой частоте (2 Гц) особи штамма Н1 в большинстве случаев удалялись от электродов по вытянутой траектории и часто заползали за один из электродов в «зону комфорта». Животные штамма Н2 предпочитали перемещаться за катод, хотя иногда блуждали между электродами и отползали в итоге на небольшое расстояние или уходили за анод. Представители штамма Н13 чаще удалялись от анода в сторону катода и перемещались за него. При использовании высокой частоты (2 кГц) особи штамма Н1 предпочитали анод, часто оставались в «зоне электродов», теряли двигательную активность и сморщивались. Особи штамма Н2 быстро подползали к аноду или оставались недалеко от электродов, что нередко приводило к их обездвиживанию. Особи штамма Н13 обычно удалялись от анода к катоду и заползали за катод. Для них также отмечены замедление реакции, обездвиживание и сморщивание при частоте 2 кГц.

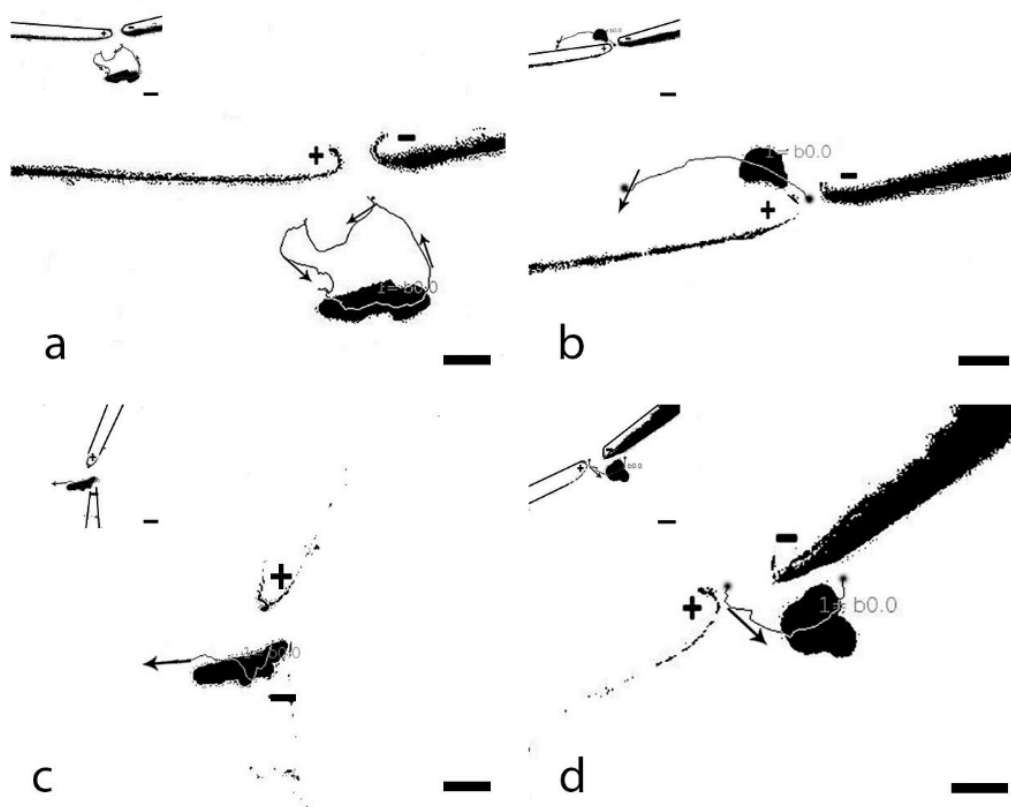


Рис. 5. Изменение формы *Trichoplax adhaerens* Н1 и траектории движения из «электродной ловушки»: (а) поисковое движение и вытягивание трихоплакса вдоль линии напряжённости электрического поля; направленное движение трихоплаксов в «зону комфорта», расположенную: (b) за анодом, (c) в отдалении от электродов, (d) за катодом. Стрелки указывают направление движения трихоплакса; цифры на рисунке обозначают присвоенную животному метку; «+» — анод; «-» — катод; длина отрезка — 1 мм; графическая вставка в левом верхнем углу объясняет изображение

Fig. 5. Change of *Trichoplax adhaerens* H1 shape and motion trajectory from the “electrode trap”: (a) seeking activity and elongation of *Trichoplax* along the line of electric field intensity; the directed motion of *Trichoplax* into the “comfort zone” located: (b) behind the anode, (c) far from the electrodes, and (d) behind the cathode. Arrows demonstrate *Trichoplax* motion direction; numbers in the figure indicate identification code assigned to the animal; “+” is the anode; “-” is the cathode; every bar length = 1 mm; graphic insert in the upper left corner explains the image

Таблица 1. Паттерны поведения трихоплаксов между электродами при воздействии прямоугольными импульсами разной частоты

Table 1. Behavioral patterns of *Trichoplax* between electrodes when exposed to rectangular pulses of various frequencies

Гаплотип	Частота прямоугольных импульсов	
	2 Гц	2 кГц
H1	движется по удалённой траектории за один из электродов	удаляется от катода в направлении анода либо остаётся в «зоне электродов»
H2	блуждает между электродами, перемещается за катод или анод, отползает	быстро приближается к аноду, блуждает, располагается близко к электродам
H13	отползает от анода и иногда переползает за катод	отчётливо удаляется от анода, заползает за катод

Эксперименты в режимах функционирования кальциевых каналов. Чтобы предположительно открыть кальциевые каналы трихоплакса TCa_v3 *in vivo*, мы применяли прямоугольные импульсы со средним напряжением 50 мВ, с коэффициентом заполнения 0,5 и частотами 2,5 Гц, 5 Гц и 2 кГц. Частоты заимствованы из работ [3 ; 20 ; 33]. Выраженные различия в эффектах обнаружены на частотах 2,5 Гц и 2 кГц. При частоте 2,5 Гц трихоплаксы не меняли морфологию, медленно отползали от анода в сторону катода и перемещались за катод. При частоте 2 кГц, напротив, трихоплаксы, преимущественно двигались к аноду, однако не удалялись далеко от электродов, меняли общий вид клеточной массы с прозрачного и блестящего на непрозрачный и тусклый, в конечном итоге уменьшались в размере, сворачивались и отделялись от субстрата.

При применении частот, использованных в методике patch-clamp [33], а именно при длительности и задержке импульсов по 2 мс (500 Гц) или 500 мс (2 Гц), трихоплаксы в случае частоты 2 Гц не меняли видимой морфологии и ползли от анода к катоду, а в случае частоты 500 Гц они преимущественно двигались от катода за анод либо оставались неподвижными и скручивались.

Для того чтобы предположительно открыть кальциевые каналы трихоплакса TCa_v3 *in vivo*, мы применяли прямоугольные импульсы со средним напряжением от 10 до 120 мВ, соответствующие задержкам от 10 с до 1 мс. Длительность импульсов составляла 35 мс, как в работе [36]. Для оценки кумулятивного действия п-образных импульсов на трихоплакса *Trichoplax* sp. H2, опосредованного каналом TCa_v3 , использованы задержки от 1 мс до 10 с. Физиологический эффект от суммарного действия импульсов проявлялся через несколько десятков секунд и выглядел как зависимость подвижности животных от скажности в последовательности импульсов. При низкой скажности, т. е. при высокой частоте и большом количестве поступающих сигналов, доля бездвиженных животных была велика — 78 и 80 % для задержек 1 и 10 мс соответственно (рис. 6). По мере роста скажности доля парализованных трихоплаксов понижалась до 44 % и 17 % в случае одного импульса в 1 с и одного импульса в 10 с соответственно. В контрольных экспериментах без электрического воздействия бездвиженные трихоплаксы отсутствовали.

Блокировка кальциевых каналов. Для доказательства специфичности действия импульсных токов на потенциалзависимые кальциевые каналы трихоплакса TCa_v3 использован ингибитор активности этих каналов амлодипин.

При наличии малого количества амлодипина (25 нМ), несмотря на обработку электрическими импульсами длительностью 35 мс с задержкой 10 мс, практически все трихоплаксы (штамм H2) в течение нескольких минут сохраняли нативную морфологию и подвижность, предпочитая двигаться к аноду, а потом удаляться от него, что свидетельствовало о предотвращении электрошока, наблюдаемого при низкой скажности (рис. 6). Для выявления возможных мишеней мы воздействовали на трихоплаксов пакетами прямоугольных импульсов переменной ширины и скажности с шагом 1 мс, охватывающими диапазон частот от 1 Гц до 1 кГц (см. Приложение 2:

<https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.05>). Отмечены обездвиживание животных и образование розеток, доля которых уменьшалась при наличии 25 нМ амлодипина. Между тем через несколько часов все трихоплаксы диссоциировали под действием амлодипина на отдельные клетки.

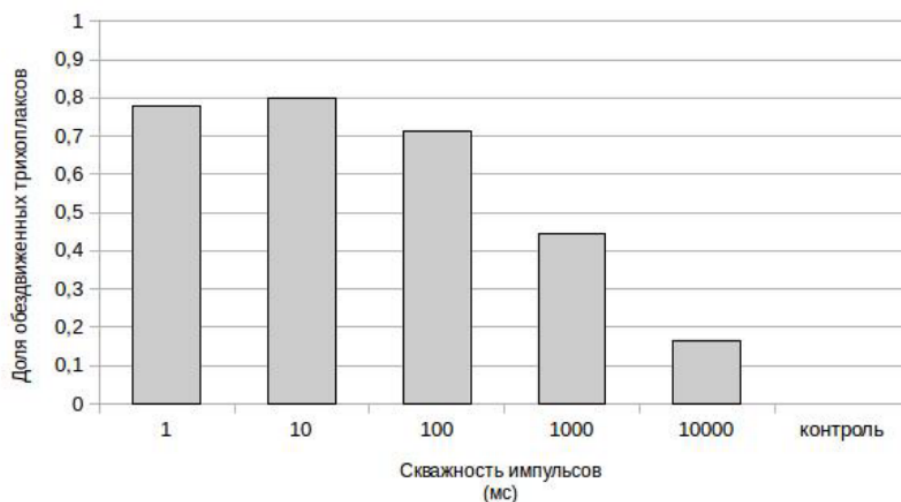


Рис. 6. Доля обездвиженных трихоплаксов *Trichoplax* sp. H2 по отношению к подвижным животным при длительности импульсов 35 мс и задержке от 1 мс до 10 с. В эксперименте использовано 65 животных

Fig. 6. Fraction of immobilized *Trichoplax* sp. H2 versus active animals at pulse duration of 35 ms and delay of 1 ms to 10 s. Totally 65 animals were used in the experiment

В заключительной серии опытов изучали влияние на трихоплаксов амлодипина в больших дозах. Амлодипин в концентрации 50 мкМ вызывал быстрое сворачивание краёв трихоплаксов в розетку в вентрально-дорсальном направлении и последующую диссоциацию пластинки на отдельные клетки (рис. 7). При понижении концентрации амлодипина до 2,5 мкМ формирование розеток продолжалось в течение нескольких минут; это позволило зарегистрировать движение животных к аноду при длительности и задержке импульсов по 35 мс [36], что соответствует частоте 28,57 Гц. При использовании концентрации амлодипина 250 нМ наблюдали постепенное потемнение трихоплаксов — сначала по периферии, а потом и в центре пластинки. Наружный ободок утолщался, трихоплаксы округлялись, образуя изрезанный фестончатый край, лопасти которого отрывались от субстрата, загибались вверх и формировали розетку. Находясь в «электродной ловушке», животные двигались дискоординированно и не могли покинуть электронную западню. Далее наступала ригидность пластинки трихоплаксов, что выражалось в постоянстве формы животных при движении. Паттерны перемещения отдельных особей в электрическом поле тем не менее сохранялись: трихоплаксы двигались преимущественно к аноду. Позднее края пластинки, напоминавшие лопасти, загибались вверх и внутрь. Примерно через 1 ч после добавления амлодипина происходила диссоциация животных на отдельные клетки, сначала по периферии, а потом — и всего организма.

Штаммы трихоплакса Н1 и Н13 показывали, подобно штамму Н2, изменение морфологии под действием 25 нМ амлодипина и нарушение амёбоидного движения с течением времени. В экспериментах без амлодипина аналогичных явлений не наблюдали. В отсутствие химических воздействий животные блуждали между электродами, размещались в «зоне комфорта» или удалялись на безопасное расстояние от электродов. Следует отметить, что недигидропиридиновые блокаторы Са-каналов, такие как верапамил и дилтиазем в концентрации 100 мкМ, не оказывали заметного воздействия на трихоплаксов штамма Н2, которые сохраняли жизнеспособность при наличии этих веществ в течение суток [данные не представлены].

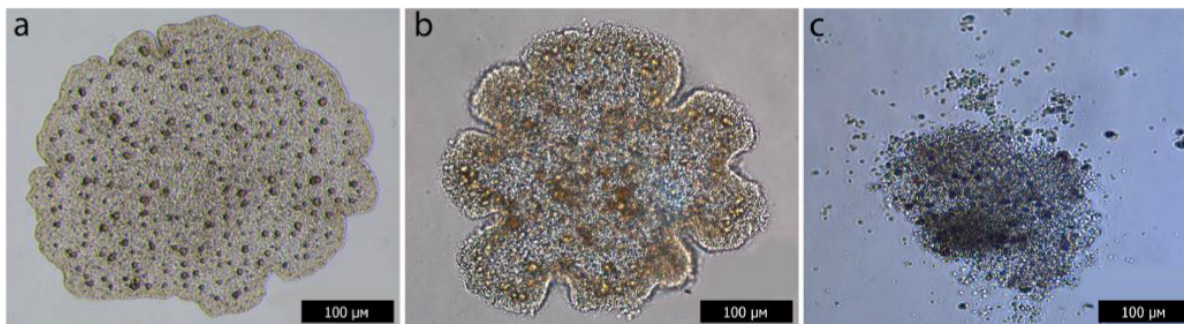


Рис. 7. Последовательное действие амлодипина (50 мкМ) на *Trichoplax* sp. H2: (a) интактное животное; (b) сворачивание трихоплакса в розетку через 30 мин.; (c) диссоциация трихоплакса на отдельные клетки через 60 мин.; длина отрезка — 100 мкм

Fig. 7. Time-dependent effect of amlodipine (of 50 μ M) on *Trichoplax* sp. H2: (a) intact animal; (b) folding into a pan after 30 minutes; (c) dissociation into individual cells after 60 minutes; bar length = 100 μ m

ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с повсеместным распространением низкочастотных электромагнитных излучений, вызывающих множественные физиологические эффекты у человека [26 ; 44], актуален поиск тест-объектов для изучения механизмов действия НЭМИ. *Trichoplax adhaerens* был предложен в качестве тестовой лабораторной модели недавно [1]. Нами изучено действие прямоугольных электрических импульсов различной амплитуды, длительности и скважности на три лабораторных штамма трихоплакса (Н1, Н2, Н13).

В контрольных тестах с использованием стержней из дерева, пластика или металла не было замечено реакции животного на посторонние предметы, размещённые возле него, за исключением случаев образования гальванической пары. Под воздействием слабого постоянного тока с напряжением 200 мВ трихоплаксы штамма Н2 отползали от электродов, однако быстрота реакции и траектория движения во многом зависели от первоначального положения животного по отношению к электродам. Когда применяли активные электроды, один из которых (анод или катод) располагали вблизи трихоплакса, животное обычно удалялось от раздражителя. При позиционировании обоих электродов возле пластинки трихоплакса зарегистрированы различные паттерны движения к аноду или катоду в зависимости от режима стимуляции и штамма животного — «положительная» миграция к аноду, «отрицательная» миграция к катоду и «переменная» миграция, когда животное несколько раз меняло предпочтение анод — катод. В случае попадания трихоплакса в зону непосредственной близости к электродам животному не всегда удавалось выбраться из «электродной ловушки», что напрямую зависело от увеличения амплитуды и числа импульсов. Вдали от электродов трихоплаксы иногда вытягивались вдоль линий напряжённости электрического поля и направлялись в предполагаемую «зону комфорта» с наименьшей напряжённостью электрического поля на обратной стороне электродов.

В сравнительных экспериментах по воздействию прямоугольными импульсами частотой 2 Гц и 2 кГц на разные штаммы трихоплакса выявлено, что *Trichoplax* sp. Н2 является более реактивным и демонстрирует более выраженные физиологические ответы на частотах 2 Гц и 2 кГц, чем штамм Н1 и особенно штамм Н13, в основном мигрирующий от анода к катоду. Именно поэтому большинство экспериментов проведено на штамме Н2. Несмотря на предпочтительное движение трихоплаксов штамма Н2 в сторону катода при низких частотах импульсного тока (около 2 Гц), отмечена тенденция постепенного изменения направления миграции в сторону анода при повышении частоты импульсов (до 2 кГц). Тем не менее следует обратить внимание на неожиданно широкую индивидуальную изменчивость в поведении трихоплаксов, что затрудняет подобные интерпретации и требует дальнейших исследований.

Достаточное внимание уделено временным режимам, ранее использованным другими авторами при детальном изучении кальциевых каналов L- и T-типов [3 ; 20 ; 33 ; 34 ; 36]. Мы исследовали воздействия в диапазоне частот от 2 Гц до 2 кГц. Поведенческие реакции трихоплакса не были однозначными: экстремальные частоты порой не оказывали ожидаемого воздействия либо приводили к электрошоку трихоплакса, выражающемуся в отсутствии движения, помутнении пластинки, уменьшении размера и сморщивании животного, что связано, возможно, с физиологическим состоянием трихоплакса и/или с начальным положением животного в «электродной ловушке». Эти воздействия были обратимы; по прошествии времени или после возвращения животного на мат из водорослей трихоплаксы восстанавливали свою двигательную активность.

В зависимости от длительности стимулирующих импульсов и их числа менялись двигательные реакции и морфология животных: от стохастической или направленной миграции к аноду/катоде или от него до обездвиживания животных, увеличения оптической плотности, сначала по периферии, а потом и в центре пластинки, до сморщивания трихоплакса и даже до отделения его от субстрата. Применяемое воздействие имело кумулятивный характер, который связан, вероятно, с работой кальциевых каналов и активностью нисходящих регуляторных каскадов [10]. Известно, что железистые клетки, расположенные на периферии трихоплакса, экспрессируют потенциалзависимые кальциевые каналы [32 ; 39]. Наблюдаемые морфологические изменения в краевом ободке пластинки трихоплакса могут быть связаны с опосредованными кальциевыми каналами ответами секреторных клеток, содержащих регуляторные нейропептиды [42]. С другой стороны, показано, что патофизиологические эффекты НЭМИ сопряжены на молекулярном уровне с путём регуляции Ca^{2+} /оксид азота/пероксинитрит, а положительное физиологическое действие НЭМИ объясняется альтернативным путём Ca^{2+} /оксид азота/cGMP/протеинкиназа G [19]. Взаимоисключающие поведенческие реакции трихоплаксов, как, например, положительная и отрицательная электромиграция, на варьирующие режимы электрического воздействия (табл. 1) могут быть обусловлены вовлечением в поведенческие реакции различных сигнальных путей с участием ионов кальция.

Считается, что амлодипин, связываясь с дигидропиридиновыми рецепторами, блокирует кальциевые каналы L- и T-типов, что приводит к уменьшению переноса Ca^{2+} в клетку. Амлодипин, благодаря регуляции концентрации ионов Ca^{2+} в клетке, также обладает антиоксидантными свойствами и способствует выработке нейромедиатора оксида азота [4 ; 11 ; 14 ; 16 ; 25]. Дополнительные эксперименты с амлодипином показали, что этот блокатор кальциевых каналов способен в низких концентрациях (25 нМ) кратковременно нивелировать шоковый эффект электрических импульсов прямоугольной формы в режиме длительности 35 мс и задержки 10 мс, приводящий обычно к обездвиживанию *Trichoplax* sp. H2 без применения амлодипина. Используя программный меандр с шагом 1 мс и изучая ответы трихоплаксов на пакеты прямоугольных импульсов, мы просканировали потенциальные клеточные мишени в интервале частот от 1 Гц до 1 кГц. Снижение негативного эффекта НЭМИ в этом диапазоне с помощью амлодипина в концентрации 25 нМ может свидетельствовать о том, что НЭМИ действует на кальциевые каналы L- и/или T-типа трихоплакса.

Кроме снятия воздействия электрического раздражителя на животных с помощью амлодипина, мы наблюдали и другие эффекты. Так, применение данного антагониста кальция в высокой концентрации (> 2,5 мкМ) приводило к диссоциации трихоплаксов на отдельные клетки, что непосредственно вызывается разрушением кальциевых мостиков [28]. При использовании этого кальциевого блокатора в умеренной концентрации (< 250 нМ) отмечено нарушение амёбOIDного движения трихоплаксов, что может быть продиктовано падением функциональной активности клеток, иницирующих движения, нарушением распространения волн активации или нарушением синтеза оксида азота, играющего, возможно, определённую роль в быстрых сокращениях дорсального эпителия [2 ; 11 ; 16 ; 25]. Следует заметить, что при этом сохранялась остаточная подвижность ригидных животных, обеспечиваемая ресничками, что указывает на независимость упомянутого процесса от регуляции ионами кальция.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что амлодипин тормозит работу кальциевых каналов у трихоплакса, что проявляется как в снижении реактивности животных при низкой концентрации блокатора Ca^{2+} -каналов, так и в диссоциации клеток, составляющих животное, при высокой концентрации антагониста кальция. Следует отметить, что действие амлодипина сходно с таковым компаунда ML218 — специфического блокатора кальциевых каналов Т-типа у человека. Так, электрофизиологические исследования нейронов субталамического ядра при наличии ML218 выявили ингибирующее действие ML218 на кальциевые каналы Т-типа, подавление низкопорогового ответа и торможение всплеска активности нейронов [47].

Предположение в пользу Ca^{2+} -каналов Т-типа было подтверждено в дополнительных экспериментах на трихоплаксах штамма Н2, где, помимо амлодипина, который является одним из дигидропиридиновых блокаторов кальциевых каналов, испытывали недигидропиридиновые блокаторы кальциевых каналов, такие как верапамил и дилтиазем. Амлодипин приводил к диссоциации трихоплаксов на отдельные клетки, в то время как верапамил и дилтиазем не оказывали такого воздействия на животных. Данный факт служит подтверждением того, что амлодипин блокирует низкопороговый Ca^{2+} -канал TCa_v3 трихоплакса: амлодипин является блокатором кальциевых каналов L- и Т-типов, а верапамил и дилтиазем — блокаторами высокопороговых кальциевых каналов L-типа.

Следует отметить, что движение трихоплаксов не было строго целенаправленным, а напоминало «стохастический» таксис [38], кинезис или движение к цели методом проб и ошибок. Это говорит об отсутствии у трихоплакса некоего центрального регулятора и указывает, возможно, на распределённое управление и коллективное принятие решений между клетками, что в некоторых случаях приводит к затягиванию ответа системы на стимулы [6].

Заключение. Изучение электрофизиологии трихоплакса является важным в связи с широким распространением низкочастотного электромагнитного излучения и вызывает интерес из-за простейшего строения животного и лёгкости его культивирования, что в перспективе даёт возможность понимания механизмов его поведения и движения. Обнаруженные в наших экспериментах разнообразные ответы трихоплакса на электрические раздражители свидетельствуют о скрытых возможностях этого организма, основанных на коллективном действии составляющих его клеток.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна и других районов Мирового океана» (№ гос. регистрации АААА-А18-118020890074-2) и при поддержке гранта Правительства Российской Федерации по Постановлению № 220 (договор № 14. W03.31.0015 от 28.02.2017).

Благодарность. К. А. В. выражает признательность Горбунову Р. В. и Морозу Л. Л. за возможность работать в лаборатории биоразнообразия и функциональной геномики Мирового океана ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»; хранителям коллекций — за штаммы трихоплакса; сотрудникам лаборатории Баяндиной Ю. С., Водясовой Е. А. и Кирину М. П. — за помощь и поддержку; Романовой Д. Ю., Челебиевой Э. С., Пономарёвой А. А., Колесниковой Е. Э. и Карташову Л. Е. — за консультации. Авторы благодарны анонимным рецензентам за полезные замечания, позволившие улучшить рукопись.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. 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, article e6789 (22 p.). <https://doi.org/10.7717/peerj.6789>
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 Science of the USA*, 2018, vol. 115, no. 44, pp. E10333–E10341. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802934115>
3. Bers D. M., Perez-Reyes E. Ca channels in cardiac myocytes: Structure and function in Ca

- influx and intracellular Ca release. *Cardiovascular Research*, 1999, vol. 42, iss. 2, pp. 339–360. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00038-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00038-3)
4. Catterall W. A. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2011, vol. 3, iss. 8, article 003947 (23 p.). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>
5. Chandler N. J., Greener I. D., Tellez J. O., Inada S., Musa H., Molenaar P., Difrancesco D., Baruscotti M., Longhi R., Anderson R. H., Billeter R., Sharma V., Sigg D. C., Boyett M. R., Dobrzynski H. Molecular architecture of the human sinus node: Insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation*, 2009, vol. 119, no. 12, pp. 1562–1575. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.804369>
6. d'Alessandro J., Mas L., Aubry L., Rieu J. P., Rivière C., Anjard C. Collective regulation of cell motility using an accurate density-sensing system. *Journal of the Royal Society Interface*, 2018, vol. 15, iss. 140, article 20180006 (11 p.). <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0006>
7. 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. 36, iss. 5, pp. 966–973. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz025>
8. Eitel M., Francis W. R., Varoqueaux F., Daraspe J., Osigus H. J., Krebs S., Vargas S., Blum H., Williams G. A., Schierwater B., Wörheide G. Correction: Comparative genomics and the nature of placozoan species. *PLoS Biology*, 2018, vol. 16, no. 9, article e3000032 (1 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005359>
9. Eitel M., Francis W. R., Varoqueaux F., Daraspe J., Osigus H. J., Krebs S., Vargas S., Blum H., Williams G. A., Schierwater B., Wörheide G. Comparative genomics and the nature of placozoan species. *PLoS Biology*, 2018, vol. 16, no. 7, article E2005359 (36 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005359>
10. Gao R., Zhao S., Jiang X., Sun Y., Zhao S., Gao J., Borleis J., Willard S., Tang M., Cai H., Kamimura Y., Huang Y., Jiang J., Huang Z., Mogilner A., Pan T., Devreotes P. N., Zhao M. A large-scale screen reveals genes that mediate electrotaxis in *Dictyostelium discoideum*. *Science Signaling*, 2015, vol. 8, iss. 378, pp. ra50 (10 p.). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aab0562>
11. Godfraind T. Discovery and development of calcium channel blockers. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, vol. 8, article 286 (25 p.). <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00286>
12. Grassi C., D'Ascenzo M., Torsello A., Martinotti G., Wolf F., Cittadini A., Azzena G. B. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated Ca²⁺ channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. *Cell Calcium*, 2004, vol. 35, iss. 4, pp. 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2003.09.001>
13. Heyland A., Croll R., Goodall S., Kranyak J., Wyeth R. *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). New York : Humana Press, 2014, chap. 4, pp. 45–61. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-974-1_4
14. Iftinca M. C. Neuronal T-type calcium channels: What's new? *Journal of Medicine and Life*, 2011, vol. 4, iss. 2, pp. 126–138.
15. 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, article 11168 (11 p.). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29400-y>
16. Kopecky B. J., Liang R., Bao J. T-type calcium channel blockers as neuroprotective agents. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*, 2014, vol. 466, iss. 4, pp. 757–765. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1454-x>
17. Kuznetsov A. V., Halaimova A. V., Ufimtseva M. A., Chelebieva E. S. Blocking a chemical communication between *Trichoplax* organisms leads to their disorderly movement. *International Journal of Parallel, Emergent and Distributed Systems*, 2020, vol. 35, iss. 4, pp. 473–482. <https://doi.org/10.1080/17445760.2020.1753188>
18. Lawrence A. F., Adey W. R. Nonlinear wave mechanisms in interactions between excitable tissue and electromagnetic fields. *Neurological Research*, 1982, vol. 4, iss. 1–2, pp. 115–153. <https://doi.org/10.1080/01616412.1982.11739619>
19. Ledoigt G., Belpomme D. Cancer induction molecular pathways and HF-EMF irradiation. *Advances in Biological Chemistry*, 2013, vol. 3, pp. 177–186. <https://doi.org/10.4236/abc.2013.32023>
20. Linz K. W., Meyer R. Control of L-type calcium current during the action potential of guinea-pig ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, 1998, vol. 513,

- pt. 2, pp. 425–442. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.425bb.x>
21. Lipscombe D., Andrade A. Calcium channel $\text{Ca}_v\alpha_1$ splice isoforms – Tissue specificity and drug action. *Current Molecular Pharmacology*, 2015, vol. 8, iss. 1, pp. 22–31. <https://doi.org/10.2174/1874467208666150507103215>
 22. Marchionni I., Paffi A., Pellegrino M., Liberti M., Apollonio F., Abeti R., Fontana F., D'Inzeo G., Mazzanti M. Comparison between low-level 50 Hz and 900 MHz electromagnetic stimulation on single channel ionic currents and on firing frequency in dorsal root ganglion isolated neurons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2006, vol. 1758, iss. 5, pp. 597–605. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2006.03.014>
 23. Moran Y., Barzilai M. G., Liebeskind B. J., Zakon H. H. Evolution of voltage-gated ion channels at the emergence of Metazoa. *Journal of Experimental Biology*, 2015, vol. 218, pt. 4, pp. 515–525. <https://doi.org/10.1242/jeb.110270>
 24. Nanou E., Catterall W. A. Calcium channels, synaptic plasticity, and neuropsychiatric disease. *Neuron*, 2018, vol. 98, iss. 3, pp. 466–481. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.017>
 25. Pall M. L. Electromagnetic fields act via activation of voltage-gated calcium channels to produce beneficial or adverse effects. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2013, vol. 17, iss. 8, pp. 958–965. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12088>
 26. Pall M. L. Microwave frequency electromagnetic fields (EMFs) produce widespread neuropsychiatric effects including depression. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2016, vol. 75, pt. B, pp. 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2015.08.001>
 27. Ritter J. M., Flower R. J., Henderson G., Loke Y. K., MacEwan D., Rang H. P. *Rang & Dale's Pharmacology*. 9th edition. Elsevier, 2019, 808 p.
 28. 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>
 29. Santini M. T., Rainaldi G., Indovina P. L. Cellular effects of extremely low frequency (ELF) electromagnetic fields. *International Journal of Radiation Biology*, 2009, vol. 85, iss. 4, pp. 294–313. <https://doi.org/10.1080/09553000902781097>
 30. Schierwater B. My favorite animal, *Trichoplax adhaerens*. *BioEssays*, 2005, vol. 27, iss. 12, pp. 1294–1302. <https://doi.org/10.1002/bies.20320>
 31. Schulze F. E. *Trichoplax adhaerens*, nov. gen., nov. spec. *Zoologischer Anzeiger*, 1883, vol. 6, pp. 92–97.
 32. Senatore A., Raiss H., Le P. Physiology and evolution of voltage-gated calcium channels in early diverging animal phyla: Cnidaria, Placozoa, Porifera, and Ctenophora. *Frontiers in Physiology*, 2016, vol. 7, article 481. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00481>
 33. Shiels H. A., Vornanen M., Farrell A. P. Temperature dependence of cardiac sarcoplasmic reticulum function in rainbow trout myocytes. *Journal of Experimental Biology*, 2002, pt. 23, pp. 3631–3639.
 34. Shiels H. A., Vornanen M., Farrell A. P. Temperature-dependence of L-type Ca^{2+} channel current in atrial myocytes from rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 2000, pt. 18, pp. 2771–2780.
 35. Simms B. A., Zamponi G. W. Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. *Neuron*, 2014, vol. 82, iss. 1, pp. 24–45. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.016>
 36. Smith C. L., Abdallah S., Wong Y. Y., Le P., Haraksingh A. N., Artinian L., Tamvacakis A. N., Rehder V., Reese T. S., Senatore A. Evolutionary insights into T-type Ca^{2+} channel structure, function, and ion selectivity from the *Trichoplax adhaerens* homologue. *Journal of General Physiology*, 2017, vol. 149, iss. 4, pp. 483–510. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611683>
 37. Smith C. L., Pivovarov N., Reese T. S. Coordinated feeding behavior in *Trichoplax*, an animal without synapses. *PLoS One*, 2015, vol. 10, iss. 9, article e0136098 (15 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136098>
 38. 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 Science of the USA*, 2019, vol. 116, no. 18, pp. 8901–8908. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815655116>
 39. Smith C. L., Varoqueaux F., Kittelmann M., Azam R. N., Cooper B., Winters C. A., Eitel M., Fasshauer D., Reese T. S. Novel cell types, neurosecretory cells, and body plan of the early-diverging metazoan *Trichoplax adhaerens*. *Current Biology*, 2014, vol. 24, iss. 14, pp. 1565–1572. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.046>
 40. Srivastava M., Begovic E., Chapman J., Putnam N. H., Hellsten U., Kawashima T., Kuo A., Mitros T., Salamov A., Carpenter M. L.,

- Signorovitch A. Y., Moreno M. A., Kamm K., Greenwood J., Schmutz J., Shapiro H., Grigoriev I. V., Buss L. W., Schierwater B., Dellaporta S. L., Rokhsar D. S. The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature*, 2008, vol. 454, no. 7207, pp. 955–960. <https://doi.org/10.1038/nature07191>
41. Sun Z. C., Ge J. L., Guo B., Guo J., Hao M., Wu Y. C., Lin Y. A., La T., Yao P. T., Mei Y. A., Feng Y., Xue L. Extremely low frequency electromagnetic fields facilitate vesicle endocytosis by increasing presynaptic calcium channel expression at a central synapse. *Scientific Reports*, 2016, vol. 6, article 21774 (11 p.). <https://doi.org/10.1038/srep21774>
 42. Varoqueaux F., Williams E. A., Grandemange S., Truscetto 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 (10 p.). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.08.067>
 43. Vianale G., Reale M., Amerio P., Stefanachi M., Di Luzio S., Muraro R. Extremely low frequency electromagnetic field enhances human keratinocyte cell growth and decreases proinflammatory chemokine production. *British Journal of Dermatology*, 2008, vol. 158, iss. 6, pp. 1189–1196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08540.x>
 44. Warille A. A., Altun G., Elamin A. A., Kaplan A. A., Mohamed H., Yurt K. K., El Elhaj A., Skeptical approaches concerning the effect of exposure to electromagnetic fields on brain hormones and enzyme activities. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 2017, vol. 5, iss. 4, pp. 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2017.09.002>
 45. Weiss N., Zamponi G. W. Control of low-threshold exocytosis by T-type calcium channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2013, vol. 1828, iss. 7, pp. 1579–1586. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.07.031>
 46. Weiss N., Zamponi G. W. Genetic T-type calcium channelopathies. *Journal of Medical Genetics*, 2019, vol. 57, iss. 1, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106163>
 47. Xiang Z., Thompson A. D., Brogan J. T., Schulte M. L., Melancon B. J., Mi D., Lewis L. M., Zou B., Yang L., Morrison R., Santomango T., Byers F., Brewer K., Aldrich J. S., Yu H., Dawson E. S., Li M., McManus O., Jones C. K., Daniels J. S., Hopkins C. R., Xie X. S., Conn P. J., Weaver C. D., Lindsley C. W. The discovery and characterization of ML218: A novel, centrally active T-type calcium channel inhibitor with robust effects in STN neurons and in a rodent model of Parkinson's disease. *ACS Chemical Neuroscience*, 2011, vol. 2, iss. 12, pp. 730–742. <https://doi.org/10.1021/cn200090z>
 48. Zalata A., El-Samanoudy A. Z., Shaalan D., El-Baiomy Y., Mostafa T. *In vitro* effect of cell phone radiation on motility, DNA fragmentation, and clusterin gene expression in human sperm. *International Journal of Fertility and Sterility*, 2015, vol. 9, iss. 1, pp. 129–136. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2015.4217>

EFFECTS OF LOW FREQUENCY RECTANGULAR ELECTRIC PULSES ON *TRICHOPLAX* (PLACOZOA)

A. V. Kuznetsov^{1,3}, O. N. Kuleshova¹, A. Yu. Pronozin², O. V. Krivenko¹, and O. S. Zavyalova³

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

²Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russian Federation

³Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: kuznet61@gmail.com

The effect of extremely low frequency electric and magnetic fields (ELF-EMF) on plants and animals including humans is quite a contentious issue. Little is known about ELF-EMF effect on hydrobionts, too. We studied the effect of square voltage waves of various amplitude, duration, and duty cycle, passed through seawater, on *Trichoplax* organisms as a possible test laboratory model. Three Placozoa strains, such as *Trichoplax adhaerens* (H1), *Trichoplax* sp. (H2), and *Hoilungia hongkongensis* (H13), were used in experiments. They were picked at the stationary growth phase. Arduino Uno electronics platform was used to generate a sequence of rectangular pulses of given duration and duty cycle with a frequency up to 2 kHz. Average voltage up to 500 mV was regulated by voltage divider circuit. Amlodipine, an inhibitor of calcium channel activity, was used to check the specificity of electrical pulse effect on voltage-gated calcium channels in *Trichoplax*. Experimental animals were investigated under

a stereo microscope and stimulated by current-carrying electrodes placed close to a *Trichoplax* body. Variations in behavior and morphological characteristics of *Trichoplax* plate were studied. Stimulating and suppressing effects were identified. Experimental observations were recorded using photo and video techniques. Motion trajectories of individual animals were tracked. Increasing voltage pulses with fixed frequency of 20 Hz caused H2 haplotype individuals to leave “electrode zone” within several minutes at a voltage of 25 mV. They lost mobility in proportion to voltage rise and were paralyzed at a voltage of 500 mV. Therefore, a voltage of 50 mV was used in further experiments. An animal had more chance to move in various directions in experiments with two electrodes located on one side instead of both sides of *Trichoplax*. Direction of motion was used as a characteristic feature. *Trichoplax* were observed to migrate to areas with low density of electric field lines, which are far from electrodes or behind them. Animals from old culture were less sensitive to electrical stimulus. H2 strain was more reactive than H1 strain and especially than H13 strain; it demonstrated stronger physiological responses at frequencies of 2 Hz and 2 kHz with a voltage of 50 mV. Motion patterns and animal morphology depended on the duration of rectangular stimulation pulses, their number, amplitude, and frequency. Effects observed varied over a wide range: from direct or stochastic migration of animals to the anode or the cathode or away from it to their immobility, an increase of optical density around and in the middle of *Trichoplax* plate, and finally to *Trichoplax* folding and detach from the substrate. Additional experiments on *Trichoplax* sp. H2 with pulse duration of 35 ms and pulse delay of 1 ms to 10 s showed that the fraction of paralyzed animals increased up to 80 % with minimum delay. Nevertheless, in the presence of amlodipine with a concentration of 25 nM, almost all *Trichoplax* remained fast-moving for several minutes despite exposure to voltage waves. Experimental animals showed a total discoordination of motion and could not leave an “electrode trap”, when amlodipine with a concentration of 250 nM was used. Further, *Trichoplax* plate became rigid, which appeared in animal shape invariability during motion. Finally, amlodipine with a concentration of 50 μ M caused a rapid folding of animal plate-like body into a pan in the ventral-dorsal direction and subsequent dissociation of *Trichoplax* plate into individual cells. In general, the electrical exposure applied demonstrated a cumulative but a reversible physiological effect, which, as expected, is associated with activity of voltage-gated calcium channels. Amlodipine at high concentration (50 μ M) caused *Trichoplax* disintegration; at moderate concentration (250 nM), it disrupted the propagation of activation waves that led to discoordination of animal motion; at low concentration (25 nM), it prevented an electric shock.

Keywords: rectangular electric pulses, *Trichoplax*, Placozoa, voltage-gated calcium channels