

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Vilma Kisnierienė

ACETILCHOLINO ĮTAKA MENTURDUMBLIŲ LĄSTELIŲ MEMBRANŲ
PERNAŠOS SISTEMOMS

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, biofizika (02 B)

Vilnius, 2009

Disertacija rengta 2005 – 2009 metais Vilniaus universitete

Mokslinis vadovas:

prof. dr. Osvaldas Rukšėnas (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biofizika
– 02 B)

Konsultantas:

prof. dr. Vladimir Jurin (Baltarusijos valstybinis universitetas, Minskas, biomedicinos
mokslai, biofizika – 02 B)

SANTRUMPOS	6
1. ĮVADAS	7
1.1. Darbo tikslas ir užduotys	10
1.2. Darbo naujumas ir reikšmė	11
1.3. Ginamieji disertacijos teiginiai.....	11
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
2.1. Menturdumblių naudojimas elektrofiziologiniuose tyrimuose	12
2.2. Augalinių ląstelių membranų jonų pernašos sistemos	14
2.2.1. Augalų jonų kanalai	14
2.2.1.1. Kalio jonų kanalai.....	14
2.2.1.2. Ca²⁺ kanalai	17
2.2.1.3. Anijonų kanalai.....	20
2.2.2. Jonų siurbliai.....	21
2.2.2.1. Protonų siurbliai	21
2.2.2.2. Ca²⁺ jonų siurbliai.....	22
2.3. Augalinių ląstelių ramybės potencialo joninis mechanizmas	23
2.4. Augalų veikimo potencialai.....	26
2.4.1. Augalinių ląstelių veikimo potencialo joninis mechanizmas	27
2.4.2. Augalų veikimo potencialų fizikinės savybės	30
2.4.3. Veikimo potencialų signalinė funkcija augaluose.....	33
2.5. Cholinerginė sistema augaluose.....	35
2.5.1. ACh receptorių klasifikacija.....	35
2.5.2.1. Acetilcholino paplitimas augaliniame pasaulyje.....	37
2.5.2.2. Fiziologinis ACh vaidmuo augaluose	39
2.5.2.3. ACh poveikis augalinių membranų jonų pernašos sistemoms. 41	
2.5.3. Acetilcholinesterazė augaluose	41
2.5.3.1. AChE nustatymo augaluose metodai	42
2.5.3.2. AChE paplitimas augaliniame pasaulyje	43
2.5.3.3. AChE inhibavimas.....	45
3. DARBO METODIKA	47
3.1. Tyrimų objektai	47

3.2. Elektrofiziologiniai matavimai	48
3.3. Eksperimentų eiga	51
3.4. Eksperimentuose naudotos medžiagos ir tirpalai.....	53
3.5. Naudotos programos ir statistiniai metodai.....	53
4. REZULTATAI.....	54
4.1. Acetilcolino poveikis membranos laidumui	54
4.2. Acetilcolino poveikis membranos ramybės potencialui	55
4.3. Acetilcolino poveikis vienetiniam veikimo potencialui	56
4.4. Acetilcolino poveikis membranos potencialo dinamikai veikimo potencialų serijos metu.....	58
4.5. Acetilcolino poveikis membranos potencialams, užblokavus metabolinę komponentę	60
4.6. Acetilcolino poveikis ląstelių, natūraliai esančių K^+ būsenoje, veikimo potencialams	63
4.7. Acetilcolino poveikis ląstelių, 1mM ACh tirpale išbuvusių 16 valandų, veikimo potencialams.....	65
4.8. Suminis fosforo organinių junginių ir acetilcolino poveikis <i>Nitella flexilis</i> ląstelių bendrajam laidumui.....	66
4.9. Kadmio poveikis <i>Nitellopsis obtusa</i> ląstelių membranų elektrogenezei.....	67
4.10. Suminis kadmio jonų ir acetilcolino poveikis <i>Nitellopsis obtusa</i> ląstelių membranos potencialams	68
4.11. Suminis neostigmino bromido ir acetilcolino poveikis <i>Nitellopsis obtusa</i> ląstelių membranos potencialams.....	71
4.12. Nikotino poveikis <i>Nitellopsis obtusa</i> ląstelių membranos potencialams	74
4.13. Acetilcolino poveikis <i>Nitellopsis obtusa</i> ląstelių jaudrumui.....	77
4.14. Acetilcolino poveikis <i>Nitellopsis obtusa</i> ląstelių Cl^- srovei	78
4.15. Acetilcolino poveikis <i>Nitellopsis obtusa</i> ląstelių Ca^{2+} srovei	80
4.16. Acetilcolino poveikis <i>Nitella flexilis</i> ląstelių K^+ kanalams	81
4.17. Acetilcolino poveikis H^+ ATPazės aktyvavimui.....	83

5. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS IR APTARIMAS.....	85
5.1. Acetilcholino poveikis menturdumblių membraninio potencialo elektrogenezei	85
5.2. Acetilcholinesterazės aktyvumas menturdumblių ląstelėse.....	88
5.3. Augalų cholinerginės sistemos dalyvavimas signalų perdavime	90
6. IŠVADOS.....	92
7. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	93
8. PUBLIKACIJOS	110
9. PADĖKA	113
10. CURRICULUM VITAE	114

SANTRUMPOS

(Ag/AgCl₂) - chlorsidabriniai (Ag/AgCl₂) elektrodai
(Hg/HgCl) - kalomelio (Hg/HgCl) standartinis pusiauelementas
ACh - acetilcholininas
AChE - acetilcholinesterazė
APW - kontrolinis tirpalas (*angl.* Artificial Pond Water)
ATCh - acetilcholintransferazė
DCCD - dicikloheksilcarbadiimidazė
DIM - insekticidas dimetoatas
 E_k - pusiausvyrinis kalio potencialas
 E_m - membranos potencialas
 H^+ -ATPazė - protonų siurblys
HEPES - 4-(2-hidroksietil)piperazinil-1-etansulfonrūgštis (buferis)
IP₃ - inozitolio 1,4,5-trisfosfatas
 K_{in} - įeinančios krypties kalio kanalai
 K_{out} - išeinančios krypties kalio kanalai
mAChR - muskarininiai acetilcholino receptoriai
MP - membranos potencialas
Na, K, Cl, Ca, Cd - cheminiai elementai
 Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Cd^{2+} - jonai
nAChR - nikotininiai acetilcholino receptoriai
NB - neostigmino bromidas
RP - ramybės potencialas
SE - vidutinė standartinė paklaida
Tris - hydroxymethylaminometanas (buferis)
VP - veikimo potencialas

1. ĮVADAS

Visos biologinės sistemos yra veikiamos jas supančios aplinkos. Tam, kad išgyventų, gyvieji organizmai turi sugebėti priimti besikeičiančią informaciją ir reikšmingų signalų poveikyje keisti savo struktūros elementus ar elgesį. Lygindami augalines ir gyvūnines ląsteles stimulus - atsakas ryšio lygmenyje galime stebėti daug panašumų. Augalai gauna, perduoda, apdoroja didžiulį kiekį sudėtingos informacijos apie juos supančią aplinką. Informacijos kodavimui ir valdymui yra naudojami panašūs signaliniai keliai ir procesai tiek gyvūninėse, tiek augalinėse ląstelėse. Signalų perdavime dalyvauja ne tik cheminės medžiagos - nukleorūgštys, oligonukleotidai, baltymai, peptidai, augimo reguliatoriai, kai kurios amino rūgštys, bet ir fiziniai signalai - mechaniniai (ypatingai hidrauliniai), bei elektriniai. Vienas iš informacijos apie pasikeitusią aplinką perdavimo būdų tiek viduląstelinėje, tiek tarpląstelinėje augalų komunikacijoje gali būti sužadavimo banga arba veikimo potencialas (Davies, 2004). Plazminė membrana leidžia ląstelėms, audiniams ir organams perduoti elektrinius signalus tiek trumpu, tiek ir ilgu atstumu, o visi žinomi augalus veikiantys fizikiniai faktoriai gali būti elektrinių signalų augaluose priežastimi.

Molekulinės biologijos, genetikos ir elektrofiziologijos tyrimų metodų pažanga leidžia nustatyti ir patvirtinti atskirų membranos pernašos sistemų vaidmenį priimant informaciją apie žinomų aplinkos faktorių poveikį ir sąlygojant tolimesnius signalo perdavimo kelius ar lemiant atsakomąją reakciją (Zimmermann & Sentenac, 1999). Atskirų pernašos sistemų aktyvumo ir valdymo tyrimų dirbtinėje aplinkoje rezultatai ne visada atitinka rezultatus, gautus tiriant visą ląstelę, kur yra nepažeista sudėtinga kompleksinė įvairių signalų reguliavimo sistema. Elektrofiziologinių metodų privalumas yra galimybė tirti fiziologines reakcijas gyvos ląstelės lygmenyje. Tas faktas, kad daugumos augalų joninių kanalų homologai yra randami gyvūninėse sistemose, padidino susidomėjimą augalais, kaip modelinėmis sistemomis, kuriose galimi

joninių kanalų savybių tyrimai. Svarbiausios joninių kanalų savybės - selektyvumas, kinetika, valdymas ir reguliavimas yra bendros tiek augalams, tiek gyvūnams. Todėl augalų pernašos sistemų tyrimų rezultatai gali būti pritaikomi ir patvirtinami gyvūninėse ląstelėse. Paprastesnių sistemų tyrimai leidžia suformuluoti tam tikrus dėsnius bei sukurti modelius tam, kad galėtume suprasti procesus, vykstančius sudėtingesnėse sistemose. Tuo pačiu yra skatinama tyrimo metodų pažanga ir technologijų vystimasis sudėtingesnių sistemų analizei.

Menturdumbliai yra viena iš dažniausiai pasirenkamų augalų modelinių sistemų, naudojamų pagrindiniams augalų fiziologiniams ir biofizikiniams reiškiniams analizuoti. Tyrinėjami didelės menturdumblių ląstelės, galime suprasti sudėtingesnius aukštesniųjų augalų bei gyvūnų augimo, funkcionavimo, adaptacijos ir informacijos valdymo dėsningumus. Menturdumbliai *Nitellopsis obtusa* bei *Nitella sp.* dėl tam tikrų sandaros ir fiziologinių ypatumų (didelių ląstelės matmenų, ryškios struktūrinės diferenciacijos, pagrindinių gyvybinių procesų stabilumo, nesunkaus kultivavimo laboratorinėse sąlygose) bei savybės lengvai generuoti veikimo potencialus plačiai taikomi elektrofiziologiniuose tyrimuose. Menturdumblių membranos elektrinio aktyvumo tyrimas yra vienas iš adekvačiausių metodų membranos funkcionavimui tirti *in vivo*. Tarpbamblynės menturdumblių ląstelės galime tirti ne tik atskirų sistemų, ląstelės, bet ir viso organizmo lygmenyje.

Elektriniai signalai augaliniame pasaulyje registruojami jau daugiau kaip šimtą metų, tačiau iki šiol bandoma atsakyti į klausimus - ar turi veikimo potencialai augaluose funkcinę prasmę ir kokia ji yra (Fromm & Lautner, 2005), ar veikimo potencialai gali sukelti pastebimus augalų atsakus ir paveikti gyvybiškai svarbių sistemų veiklą. Nustatyta, kad įvairių evoliucijos lygių augalai veikimo potencialo pagalba gali kontroliuoti tokius gyvybiškai svarbius fiziologinius procesus kaip kvėpavimas, fotosintezė, gali aktyvinti fermentų veiklą ar inicijuoti tam tikrų genų raišką (Dziubinska et al., 2003; Fisahn et al., 2004; Grams et al., 2009). Lygindami augalų ir gyvūnų veikimo potencialus

bei jų sklaidimo ypatybes, geriau galime suprasti nervų sistemos evoliuciją. Evoliuciniu požiūriu įdomu ir tai, kad augaluose randama daugelis neurotransmiterių, neuroregulatorių ir neurotoksinų, reikalingų aukštesnio evoliucinio lygmens nervinės sistemos veiklai. Acetilcholinai yra viena seniausių molekulių, plačiai paplitusi ne tik nervų sistemoje, bet ir prokariotinėse bakterijų ląstelėse bei neneuroninėse eukariotinėse ląstelėse – pirmuonyse, grybuose, augaluose ir gyvūnuose (Roshchina, 2001; Wessler et al., 2001). Acetilcholinui dažniausiai yra priskiriama neurotransmiterio funkcija, tačiau ACh molekulės, ją sintetinančių bei skaidančių fermentų egzistavimas visose gyvybės formose palaiko idėją, kad ACh, kaip vietinis mediatorius, galėjo moduluoti svarbias fiziologines funkcijas pačioje gyvybės atsiradimo pradžioje (Horiuchi et al., 2003). Yra parodyta, kad kaip signalinė molekulė ACh gali dalyvauti tokiuose esminiuose procesuose kaip ląstelių dauginimasis, diferencijavimasis, citoskeleto ir tarpląstelių kontaktų formavimasis (Wessler et al., 2001).

Augaluose cholinerginė sistema tyrinėjama daugiau kaip 30 metų (Tretyn & Kendrick, 1991). Tačiau dažniausiai atliekami medžiagų cheminės sudėties (ypatingai vaistinių augalų) tyrimai, patvirtinantys cholinerginės sistemos elementų egzistavimą atskiruose augaluose. Kadangi iki šiol nėra išskirti augalų ACh receptorių baltymai, dažniausiai yra kalbama apie taip vadinamąsias ACh prisijungimo vietas (angl. *ACh-binding sites*) (Hartmann & Gupta, 1989). Nėra žinoma koku būdu ACh yra kaupiamas augalų ląstelėse ir kaip nusistovi pusiausvyra tarp ACh sintezės, difuzijos ir hidrolizės. Be to yra mažai mokslinių duomenų apie cholinerginės sistemos funkcinę prasmę ir veikimo mechanizmus augaliniame pasaulyje. Pastaruoju metu atliekama vis daugiau tyrimų, patvirtinančių, kad ACh veikia kaip ląstelės signalinė molekulė (Kawashima et al, 2007). Taip pat buvo nustatyta kad ACh dalyvauja augalų vandens homeostazės ir fotosintezės reguliavime (Wessler et al., 2001). ACh kiekio padidėjimas yra fiksuojamas kaip atsakas į gravitacijos ar karščio poveikį (Momonoki, 1992; 1997). Manoma, kad acetilcholinai augaluose, kaip ir gyvūnuose, atlieka membranos laidumo regulatoriaus vaidmenį, pvz.

aktyvuoja protonų siurblius, modifikuoja joninių kanalų veiklą (Hartmann & Gupta, 1989).

Daugumoje augalų cholinerginės sistemos tyrimų dominuoja atskirų jos komponentų išskyrimas ir struktūrinė analizė, bet labai trūksta atskirų tos sistemos dalių ir jų koordinuoto veikimo funkcinio tyrimo *in vivo*. Tokio pobūdžio tyrimams labai tinka elektrofiziologiniai tyrimo metodai, kuriuos naudojant galima būtų nustatyti acetilcholino poveikį augalinių ląstelių jonų pernašos dinamikai ir joninių kanalų veiklai, patvirtinti ACh dalyvavimą signalų perdavime.

1.1. Darbo tikslas ir užduotys

Darbo tikslas - nustatyti acetilcholino poveikį menturdumblių plazminės membranos pernašos sistemų funkcionavimui ir veikimo potencialų generavimo dinamikai.

Darbo užduotys:

1. Ištirti, kaip acetilcholinai veikia:
 - menturdumblių (*Nitella flexilis* ir *Nitellopsis obtusa*) bendruosius elektrinius parametrus;
 - atskirus menturdumblių *Nitellopsis obtusa* veikimo potencialus ir jų serijas;
 - menturdumblių *Nitella flexilis* K⁺ kanalus ramybės būsenoje;
 - menturdumblių *Nitellopsis obtusa* Cl⁻ bei Ca²⁺ kanalus sužadavimo metu;
 - menturdumblių *Nitella flexilis* H⁺-ATPazės aktyvaciją.
2. Ištirti, kaip acetilcholinesterazės inhibitoriai keičia acetilcholino poveikį menturdumblių ląstelių elektrofiziologiniams parametrų.
3. Ištirti nikotino poveikį *Nitellopsis obtusa* ląstelių elektrofiziologiniams atsakams.

1.2. Darbo naujumas ir reikšmė

1. Pirmą kartą atlikta ACh poveikio visoms pagrindinėms menturdumblių, kaip modelinės augalinių ląstelių sistemos, membraninio potencialo genezėje dalyvaujančioms jonų pernašos sistemoms analizė.
2. Pirmą kartą atlikti acetilcholinesterazės inhibitorių bei nikotino poveikio augalinių ląstelių veikimo potencialams tyrimai.
3. Pirmą kartą, įvertinant cheminių medžiagų poveikį *Nitellopsis obtusa* ląstelių membraninių procesų funkcionavimui, buvo panaudotos veikimo potencialų serijos.

Praktinis darbo taikymas

Parodyta, kad menturdumblių membraninio potencialo dinamikos analizė veikimo potencialų serijos metu gali būti naudojama vykdant ekologinę aplinkos užterštumo stebėseną.

1.3. Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Veikiant 5 mM acetilcholinu aktyvinamos pagrindinės menturdumblių membraninio potencialo genezėje dalyvaujančios jonų pernašos sistemos.
2. Tiek acetilcholinai, tiek nikotinas pasižymi depoliarizuojančiu poveikiu menturdumblių *Nitella flexilis* ir *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranoms.
3. Acetilcholinai didina menturdumblių *Nitellopsis obtusa* ląstelių jaudrumą.
4. Elektrofiziologiniais tyrimo metodais galima parodyti acetilcholinesterazės veikimą menturdumblių ląstelėse *in vivo*.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Menturdumblių naudojimas elektrofiziologiniuose tyrimuose

Platus menturdumblių naudojimas elektrofiziologiniuose eksperimentuose didžia dalimi yra apspręstas unikalia jų sandara (Andjus, 1998). Menturdumblių gniužulas dvišakai ir menturiškai šakotas, suskirstytas į bamblius ir tarpubamblius, diferencijuotas į pagrindinę ašį ir šonines menturiškas šakeles (**3.1 pav.**). Pagrindinės ašies pamate yra bespalviai rizodai. *Nitellopsis obtusa* talomo ilgis gali siekti keliasdešimt centimetrų. Bambliai yra daugialąsteliniai, sudaryti iš dviejų trumpų vidinių ir kelių periferinių vienbranduolių ląstelių. Ašies tarpubamblis yra didžiulė daugiabranduolė ląstelė, kurios skersmuo iki 1 mm, o ilgis priklausomai nuo rūšies gali siekti iki 20 cm. Iki 90% tarpubamblio ląstelės tūrio užima vakuolė (Shimmen et al., 1994). Protoplazma sudaryta iš nejudraus chloroplastų sluoksnio – ektoplazmos ir aplink vakuolę judančios citoplazmos sluoksnio - endoplazmos. Mitochondrijos ir peroksisomos juda kartu su citoplazma (Braun et al., 2007). Citoplazmos storis siekia apie 15 μm. Ląstelės membrana – plazmalema - skiria citoplazmos vidinį turinį nuo ląstelės sienelės, o vidinė membrana – tonoplastas atskiria vakuolę nuo citoplazmos. Ląstelės citoplazma 100 μm/s (36 cm/h) greičiu cirkuliaciniu būdu juda aplink vakuolę. Tokiu būdu yra išnešiojamos ląstelei reikalingos maisto medžiagos ir juda organelės, pavyzdžiui branduoliai. Ląstelės sienelės storis nėra pastovus ir priklauso nuo ląstelės amžiaus. *Nitella sp.* jaunų ląstelių sienelės storis siekia 0,8 μm, o senų ląstelių - 4 μm (Johnson et al., 2002). *Nitellopsis obtusa* sienelėje, kurios storis siekia 10 – 15 μm, yra sukauptos didelės Ca²⁺ jonų atsargos.

Menturdumbliai nereiklūs apšvietimui, auga vidutinės temperatūros vandenyse. Juos nesudėtinga ir pigu kultivuoti laboratorinėmis sąlygomis. Menturdumbliai yra jautrūs gana mažoms toksinių medžiagų koncentracijoms,

todėl modifikuojantis įvairių medžiagų poveikis gali būti stebimas gana greitai (Юрин et al., 1991).

Menturdumblius, kaip eksperimentinę sistemą, tikslinga naudoti ne tik dėl objekto patogumo, tyrimų ir eksperimentinių duomenų gausos pasaulyje, bet ir dėl joninių mechanizmų reguliavimo panašumo įvairiuose gyvuosiuose organizmuose. Genetiniai tyrimai patvirtino, kad evoliuciniu požiūriu menturdumbliai yra patys artimiausi aukštesniųjų augalų protėviai (McCourt, 2004). Atskirtas nuo talomo menturdumblių ląsteles galima tirti ne tik ląstelės lygmenyje, bet ir laikyti atskiru organizmu, išsaugančiu pagrindines gyvybines funkcijas ilgą laiką. Svarbu pažymėti, kad menturdumblių elektrofiziologiniai tyrimai atliekami gamtiškai jiems įprastoje vandeninėje terpėje. Tiriant menturdumblius, pasitelkiami įvairūs metodai - išorinė ir viduląstelinė mikroelektrocinė technika, fiksuotos įtampos metodas, fiksuotos įtampos/srovės (angl. *patch-clamp*) technika ir kt. Elektrofiziologinių tyrimo metodų pagalba, tirdami menturdumblių elektrines savybes, galime įvertinti įvairių medžiagų poveikį atskirų jonų transporto sistemų - jonų kanalų bei siurblių - veiklai *in vivo* (Tester, 1990).

Kadangi menturdumblių tarpubamblinės ląstelės yra didelės, nesunku į jas įvesti mikroelektrodus. Gali būti atliekamos tam tikros operacijos, pvz. pašalinama citoplazma, keičiama vakuolės joninė sudėtis, pašalinamas tonoplastas, integruojami tam tikri dirbtiniai kanalai. Kadangi iš ląstelių gana nesunkiai formuojami elektrofiziologiškai aktyvūs citoplazmos lašai, menturdumbliai gali būti tiriami, naudojant fiksuotos įtampos/srovės metodiką (Shimmen, 1994). Elektriniu impulsu nesunku sukelti šiose ląstelėse didelės amplitudės veikimo potencialus, kurie trunka keletą sekundžių. Galime tirti tiek atskiro veikimo potencialo dinamiką, tiek sklidimą visu talomu (Beilby, 2007). Menturdumbliai plačiai naudojami VP sklidimo ypatybių ir perdavimo iš vienos ląstelės kitai tyrimuose. Be elektrofiziologinių tyrimų, menturdumbliai pasitelkiami tirti osmoreguliaciją, citoplazmos judėjimo greitį, citoskeleto sandarą, gravitropizmą bei daugelį kitų biologiškai svarbių reiškinių ir savybių.

2.2. Augalinių ląstelių membranų jonų pernašos sistemos

2.2.1. Augalų jonų kanalai

Augaluose randami tiek nuo įtampos priklausomi, tiek ir ligandų valdomi joniniai kanalai (Blatt, 2004). Individualios atskirų plazminės membranos ir vakuolės membranos kalio, anijoninių, kalcio kanalų ypatybės buvo atrastos naudojant fiksuotos įtampos/srovės metodą (Ward et al., 2009). Pilnai nusekvenavus baltažiedžio vairo (*Arabidopsis thaliana*) genomą, atsivėrė didesnės galimybės sujungti elektrofiziologijos ir molekulinės biologijos žinias tam, kad būtų nustatytos augalų joninių kanalų savybės ir funkcijos, dalyvavimas augalų signalų genezėje ir reguliavime. Joniniai kanalai yra svarbūs užtikrinant ląstelių homeostazę, turgoro reguliavime, signalų perdavime, membraninio potencialo susidaryme ir veikimo potencialo generacijoje (Hodick & Sievers, 1988; Zimmermann & Sentenac, 1999).

Joniniai kanalai gali būti apibūdinami ir klasifikuojami pagal kelias pagrindines savybes - kanalų laidumą, selektyvumą, valdymo bei blokavimo mechanizmą, kinetines kanalo savybes. Įvairūs kanalai skirtingai reaguoja į įvairias chemines medžiagas, kurios gali būti tiek kanalų blokatoriai, tiek aktyvintojai. Matuojamasis tekančios srovės dydis priklauso nuo kanalų tankumo, atskiro atviro kanalo laidumo, ir laiko, kurį kanalas būna atidarytas.

Svarbi joninių kanalų savybė yra kanalo specifiškumas, kuri sąlygoja selektyvumo filtrą. Atrankaus kanalų laidumo tam tikriems jonams pagrindu augalų, kaip ir gyvūnų, joniniai kanalai yra skirstomi į katijonų K^+ , Na^+ , Ca^{2+} kanalus, ir anijonų kanalus, iš kurių augaluose svarbiausi yra Cl^- kanalai.

2.2.1.1. Kalio jonų kanalai

Kadangi citoplazminės K^+ homeostazės palaikymas yra ypatingai svarbus optimaliam augalinės ląstelės metabolizmui palaikyti, K^+ pernašos sistemos užima labai reikšmingą vietą augaluose (Ward, 2001). K^+ kanalai aptinkami

visuose augalų audiniuose bei ląstelių tipuose ir yra svarbūs membraninio potencialo, osmoso reguliuojamų žiotelių bei lapų judesių, ląstelės tūrio bei turgoro, mineralinės mitybos užtikrinimui ir ląstelės homeostazės palaikymui (Blatt, 2004). *Arabidopsis* genome yra išskirtos septynios didelės genų šeimos (iš viso 75 genai), koduojančios jonų transporto sistemas, užtikrinančias K^+ pernašą per membraną. Sistemą sudaro Shaker tipo K^+ kanalai (9 genai); 2 porų K^+ kanalai (6 genai); ciklinių nukleotidų valdomi K^+ kanalai (20 genų); K^+/H^+ antiporteriai (6 genai); glutamato receptoriai (20 genų), KUP/HAK/KT transporteriai (13 genų); didelio giminingumo K^+ kanalai (angl. *high-affinity K^+ transporter*, 1 genas); (Mäser et al. 2001; Véry & Sentenac 2002, 2003; Shabala, 2003).

Nuo įtampos priklausomi K^+ kanalai yra daugiausiai tyrinėti ir ištirti augalinių ląstelių joniniai kanalai, labiausiai sąlygojantys plazminės membranos laidumą. Shaker-tipo K^+ kanalai yra tipiškiausi K^+ kanalai, kurie gali skirtis pagal laidumo ir laiko charakteristikas (Gambale & Uozumi, 2006). Juos galime apibūdinti kaip lėtai aktyvuojamus kanalus. Šių kanalų atidarymo tikimybė yra reguliuojama membraniniu potencialu. Įtampos valdomų K^+ kanalų baltymo tam tikra sensorinė dalis, kurią sudaro serija teigiamai įkrautų amino rūgščių, taip vadinamas S4 segmentas, yra jautrus membraninio potencialo pokyčiui. Pasikeitus membraniniam potencialui, vyksta baltymo konformacijos pasikeitimas, kuris lemia kanalo atsidarymą arba užsidarymą (Blatt, 2004). Pagal srovės tekėjimo kryptį augalų K^+ kanalus galime suskirstyti į tris funkciškai skirtingas grupes: įtekančios srovės (angl. *inward*), silpnai įtekančios srovės (angl. *weakly-inward*), ir ištekančios srovės (angl. *outward*) K^+ kanalus (Véry & Sentenac, 2003).

Įtekančios srovės kanalai aktyvuojami membranai hiperpolarizuojantis žemiau K^+ pusiausvyrinio potencialo (E_k). Hiperpolarizacijos aktyvuojami K^+ kanalai atsidaro, kai membraninis potencialas (citoplazmoje) yra neigiamesnis už -100 mV, tuo tarpu prie teigiamesnių potencialų jie yra uždaryti (Sokolik & Yurin, 1986, Blatt, 2004). Jie užtikrina K^+ patekimą į ląstelę ir leidžia augalinėms ląstelėms sukaupti didelius kiekius kalio jonų per pakankamai

trumpą laiką. K_{in} kanalai yra multimeriniai baltymai sudaryti iš keturių α -subvienetų (Daram et al., 1997).

Silpnai įtekančios srovės kanalai taip pat aktyvuojami membranos hiperpolarizacijos, fiziologinėse E_m ribose niekada nepasiekia nulinės atidarymo tikimybės. Šie kanalai potencialiai gali užtikrinti tiek K^+ pritekėjimą, tiek ištekėjimą (Czempinski et al., 1999).

Ištekančios srovės K^+_{out} kanalai aktyvinami E_m esant daug teigiamesniai nei E_k (Sokolik & Yurin, 1986). Šie kanalai pagal selektyvumą gali būti skirstomi į dvi grupes – selektyvūs, kurie yra blokuojami Cs^+ ir tetraetilamoniu, ir mažai selektyvūs, kuriuos blokuoja chininas. Padidėjusi Ca^{2+} jonų koncentracija didina K^+_{out} kanalų atidarymo tikimybę. Šiems kanalams nebūdinga inaktyvacija.

A. thaliana SKOR kanalas buvo pirmas identifikuotas augalų depolarizacijos aktyvuojamas kanalas (Gaymard F et al., 1998). GORK (angl. *guard cell outward-rectifying K⁺ channel*) yra pagrindinis ištekančios srovės K^+ kanalas žiotelėse, sąlygojantis žiotelių užsidarymą (Ache et al., 2000). Ištekančios srovės K^+ kanalai žiotelėse gali būti atviri daugiau nei 30 minučių (Schroeder, 1988). Ši savybė leidžia reguliuoti ląstelių turgorą ir užtikrina taip vadinamųjų motorinių ląstelių judėjimą (Pandey S et al., 2007).

Kadangi kiekvieno tipo kanalai turi tik jiems būdingą reguliavimo mechanizmą, ląstelė gali nepriklausomai reguliuoti tiek K^+ pritekėjimo, tiek ištekėjimo greitį. K^+ kanalai dažniausiai pasižymi dideliu selektyvumu, kurį apsprendžia selektyvumo filtro diametras. Kalio jonų pralaidumas yra $10^4:1$, lyginant su Na^+ . K^+ kanalais per sekundę transportuojama iki 10^8 kalio jonų. Kalio kanalus blokuoja tetraetilamonis (TEA) ir Ba^{2+} .

K^+ kanalai yra randami ir vakuolės membranoje - tonoplaste. Jiems aktyvuoti reikalingas padidėjęs (iki $1 \mu M$) citoplazminio Ca^{2+} kiekis (Ward & Schroeder, 1994.). Šie kanalai pasižymi dideliu selektyvumu K^+ ir užtikrina šių jonų tekėjimą iš ląstelės vakuolės į citoplazmą. Lėtieji vakuolės (SV) kanalai buvo atrasti daugelyje tirtų augalų. SV kanalai yra aktyvinamimi Ca^{2+} ir membranos depolarizacija iš citoplazmos pusės. Jie pasižymi dideliu laidumu

ir yra neselektyvūs katijonų kanalai (Pottosin et al., 1997). Pasižymintys mažu laidumu neselektyvūs katijonų kanalai, kuriuos blokuoja padidėjęs citoplazminio Ca^{2+} kiekis priskiriami greitųjų vakuolės (FV) kanalų grupei. Jie yra aktyvuojami be užvėlinimo labai neigiamo ar teigiamo potencialo. Kai potencialas būna apie - 40mV, šie kanalai būna uždari (Tikhonova et al., 1997). Šie kanalai gali dalyvauti ne kalcio jonais reguliuojamajame žiotelių uždaryme, užtikrindami K^+ tekėjimą iš vakuolės į citoplazmą (Hedrich & Neher, 1987).

Augalų HKT (angl. *high-affinity K^+ transporter*) gali būti laidūs ne tik K^+ , bet ir Na^+ . Jei augalai auga K^+ deficito sąlygomis, Na^+ kai kurioms funkcijoms gali pakeisti K^+ (pavyzdžiui, kaip vakuolės osmolitas). Tačiau citoplazmoje Na^+ gali ir konkuruoti su K^+ , ir tokiu būdu būti toksiškas augalui. HKT daugeliui augalų padeda apsisaugoti nuo per didelės Na^+ akumuliacijos ląstelėje (Sunarpi et al., 2005).

Kadangi kai kuriems K^+ kanalams reguliuoti yra reikalingas Ca^{2+} , šie kanalai gali būti priskiriami prie ligandais valdomų joninių kanalų. Kai kurie nukleotidai, baltymai ir augalų hormonai taip pat gali veikti kaip K_{out}^+ kanalų ligandai, keisdami įtampos valdomų K^+ kanalų jautrumą įtampai. Pavyzdžiui, SKOR kanalai nėra reguliuojami Ca^{2+} , bet turi ciklinius nukleotidus galinčias prisijungti vietas ir tam tikromis sąlygomis gali veikti kaip ligandų valdomi kanalai (Krol & Trebacz, 2000).

2.2.1.2. Ca^{2+} kanalai.

Kalcis yra vienas svarbiausių mineralinių elementų augalų gyvybinių funkcijų užtikrinimui. Kalcis yra svarbus kaip struktūrinis ląstelės sienelių ir membranų elementas, tačiau svarbiausia jo funkcija yra signalinė. Ca^{2+} koncentracijos padidėjimas citoplazmoje reguliuoja daugybę ląstelės biologinių procesų, moduluodamas proteinkinazių, kitų jonų kanalų, baltymų veiklą (Martin et al., 2009). Todėl augaluose yra išskiriama didelė Ca^{2+} kanalų grupė (Ward et al.,). Fiksuotos įtampos/srovės metodu yra nustatytos trys Ca^{2+} kanalų šeimos augalinėse ląstelėse. Nuo įtampos priklausomi kanalai,

receptoriai bei antrinių signalų tarpininkų (angl. *second messengers*) valdomi kanalai ir mechaniniu poveikiu aktyvuojami Ca^{2+} kanalai.

Nuo įtampos priklausomi Ca^{2+} kanalai gali būti uždaroje, atviroje ir inaktyvuotoje būsenose. Skirtingai nuo gyvūninėse ląstelėse esančių Ca^{2+} kanalų, augalinės ląstelės Ca^{2+} kanalai ilgesnį laiką egzistuoja atviroje (nuo kelių milisekundžių iki sekundžių) ir uždaroje (iki 100 sekundžių) būsenose (Hamilton et al., 2001). Augaluose buvo charakterizuoti tiek hiperpolarizacija, tiek depolarizacija aktyvuojami Ca^{2+} kanalai (Thuleau et al., 1994), bet pastarieji aptinkami rečiau (White, 2000). Depolarizacija aktyvuojami Ca^{2+} kanalai dažniausiai siejami su veikimo potencialo generavimu (Fisahn, 2004). Kol kas nerasti genai, koduojantys hiperpolarizacija aktyvuojamus Ca^{2+} kanalus (McAinsh & Pittman, 2009). Nustatyta, kad augalų hormonas abscizo rūgštis (ABA) gali padidinti hiperpolarizacija aktyvuojamų Ca^{2+} kanalų laidumą, pastumdamas aktyvacijos slenkstį teigiamesnio potencialo link (Hamilton et al., 2000). Kanalo fosforilinimas gali reguliuoti Ca^{2+} kanalų atidarymo tikimybę. Ca^{2+} jonų pasiskirstymo tyrimai atliekami suklestėjus fluorescencinei mikroskopijai.

Augalų vakuolėse randami Ca^{2+} selektyvūs ligandų valdomi kanalai (Pottosin & G. Schönknecht, 2007). Buvo nustatyta, kad Ca^{2+} difuzijos konstanta citozolyje yra dviem eilėmis mažesnė nei paprastame tirpale, todėl greitai difunduojanti molekulė IP_3 gali būti naudojama kaip antrinė signalinė molekulė Ca^{2+} kanalų valdymui. Šis kanalas augaluose turi vieną ligando prijungimo vietą. IP_3 sąlygoja Ca^{2+} patekimą iš viduląstelinių saugyklų į citoplazmą, pavyzdžiui IP_3 atidaro tonoplaste esančius Ca^{2+} selektyvius kanalus burokėliuose (Alexandre et al., 1990). Kita signalinė molekulė, kuri panašiai, kaip IP_3 sąlygoja Ca^{2+} patekimą iš viduląstelinių saugyklų į citoplazmą ir sąlygoja Ca^{2+} srovės atsiradimą fiziologinėse tonoplasto potencialo ribose (nuo -10 mV iki -40 mV) yra cADPR (ciklinė ADP-ribozė). Ši srovė yra blokuojama rutenio raudonuoju (Allen et al., 1995). Yra nustatyta, kad cADPR gali sąlygoti Ca^{2+} srovę iš endoplazminio tinklo (Navazio et al., 2001). Šiame tinkle aptikti ir NAADP (Nikotino rūgšties dinukletido fosfato) valdomi Ca^{2+}

kanalai (Navazio et al., 2000). Tačiau iki šiol nėra nustatyti genai, koduojantys Ca^{2+} selektyvius ligandų valdomus kanalus augaluose (Pottosin & G. Schönknecht, 2007).

Taip pat nustatyta, kad augalai, kaip ir gyvūnai, gali generuoti Ca^{2+} signalus per jonotropinius glutamato receptorius (GLRs), kurie dažniausiai randami šaknyse. Arabidopsis genome nustatyta 30 genų, koduojančių glutamato receptorius (Lacombe et al., 2001). Glutamatas sąlygoja staigų citoplazminio Ca^{2+} koncentracijos padidėjimą Arabidopsis šaknyse ir membranos depoliarizaciją. Šį procesą blokuoja La^{3+} (Stephens & Spalding, 2006). Augaluose taip pat yra randami cikliniais nukleotidų valdomi (CNGCs) ir dviejų porų (TPCs) Ca^{2+} kanalai.

Trečia grupė - mechaniniu poveikiu aktyvuojami Ca^{2+} kanalai (Cosgrove & Hedrich, 1991). Šie kanalai jaučia ląstelės membranos mechaninį tempimą, atsirandantį dėl prisilietimo, vėjo poveikio, turgoro pokyčių. Jų gausiai randama aktyvaus augimo zonose (pav. dulkiadaigio viršūnėje). Mechaniniam poveikiui jautrių Ca^{2+} kanalų aktyvumas priklauso nuo pH, temperatūros ir membranos potencialo (Iwabuchi et al., 2005). Yra manoma, kad šie kanalai gali būti atsakingi už receptorinių potencialų generaciją chariniuose dumbliuose (Shimmen 1996).

Augaluose taip pat randami Ca^{2+} laidūs kanalai, kurie yra priskiriami neselektyvių katijoninių kanalų grupei (Demidchik & Maathuis, 2007).

Augalų Ca^{2+} kanalų struktūroje yra daug pagalbinių baltyminių subvienetų, įgalinančių moduluoti funkcinės kanalų savybes įvairių kinazių, fosfatazių ir ligandų pagalba. Yra žinoma, kad per 20 skirtingų stimulų iššaukia Ca^{2+} koncentracijos pokyčius įvairiose augalinių ląstelių dalyse (McAinsh & Pittman, 2009). Tokia didelė Ca^{2+} pernašos sistemų įvairovė užtikrina skirtingais stimulais iššauktų Ca^{2+} atsakų specifiškumą ir laikinę bei erdvinę moduliaciją.

2.2.1.3. Anijonų kanalai

Augalų anijoniniai kanalai skirstomi pagal valdymo įtampą ir kinetiką. Fiksuotos įtampos/srovės metodika leidžia kanalus skirstyti pagal jų varstymąsi ilgo stimuliavimo metu. Pagal šį požymį anijonų kanalai yra skirstomi į greitai aktyvuojamų (R-tipo) ir lėtai aktyvuojamų (S-tipo) kanalų grupes (Vahisalu et al., 2008). R-tipo kanalai sustimuliuvus atsidaro ir labai greitai užsidaro; S-tipo kanalai lieka atviri tol, kol trunka stimuliavimas (Schmidt & Schroeder, 1994). Anijoninių kanalai gali būti depoliarizacijos aktyvuojami ištekančios krypties kanalai, (tiek S, tiek R tipo) bei įtekančios krypties, taip pat hiperpoliarizacijos aktyvuojami ištekančios krypties anijoniniai kanalai. Pastarieji pasižymi didesniu laidumu (Linder & Raschke, 1992). Dar viena grupė - anijonų kanalai, aktyvuojami šviesa bei mechaniškai (Brygoo et al., 2000). R tipo kanalų reguliavimas pakankamai sudėtingas ir gali būti specifiškas tiek atskiroms rūšims, tiek skirtingoms ląstelėms. Pavyzdžiui *V. faba* žiotelėse šiems kanalams aktyvuoti reikalingas tiek viduląstelinis Ca^{2+} , tiek viduląsteliniai nukleotidai. S tipo kanalai aktyvuojami daug platesniame įtampos diapazone nei R tipo (Roberts, 2006).

Vakuolėse randami anijonų kanalai, laidūs malatui bei kitiems organiniams jonams ir chloro anijonų kanalai, kurie gali būti laidūs ir kitiems neorganiniams jonams. Vakuolės anijoniniai kanalai dažniausiai yra įtekančios krypties ir užtikrina anijonų patekimą į ląstelės vakuolę fiziologinėse tonoplasto membraninio potencialo ribose. Šiuos kanalus mažai veikia viduląstelinis kalcis (Trebacz, 2007). Tačiau menturdumblių vakuolėse esantys Cl^- kanalai, priešingai, yra aktyvuojami padidėjus citoplazminio Ca^{2+} koncentracijai ir praleidžia Cl^- jonus iš vakuolės į citoplazmą. (Berecki et al. 1999; 2001). Jie yra svarbūs tonoplasto VP generacijai (Kikuyama, 1986; Berecki et al., 1999).

Pagrindinė anijonų kanalų funkcija - užtikrinti jonų homeostazę, dalyvauti membranos stabilizacijoje ir osmoreguliacijoje (Ward et al., 2009). Cl^- kanalai yra pagrindiniai kanalai, kurie aktyvuojasi augalinių ląstelių veikimo

potencialo depoliarizacinės fazės metu (Lunevsky et al., 1983; Fromm & Spanswick, 1993).

2.2.2. Jonų siurbLIAI

Be joninių kanalų jonų pernašoje dalyvauja kita didelė baltymų grupė - nešikliai, kurie dar yra vadinami siurbLIAis. Jonų pernaša nešikliuose yra palyginti lėta - apie 100-300 jonų/s, lyginant su kanalų - 10^6 - 10^8 jonų/s pernaša. Tačiau, kadangi jų kiekis membranoje yra labai didelis (gali sudaryti iki 5% visų membranos baltymų), siurbLIAis transportuojama pakankamai didelis kiekis jonų (Sondergaard, 2004). Joniniai siurbLIAi sugeba pernešti jonus prieš elektrocheminio potencialo gradientą, kuris susidaro ATP hidrolizės metu (Palmgren, 2001). Arabidopsio genome yra randami 46 genai, o ryžių genome - 43 genai, koduojantys joninių siurbLIų baltymus (Baxter et al., 2003). Naudodamos ATP kaip energijos šaltinį, H^+ -ATPazės perneša protonus, sukurdamos iki 200 mV potencialą (vidus neigiamesnis) ir kontroliuoja viduląstelinę jonų sudėtį bei pH nuo 1,5 iki 3 vienetų (Юрин В. М., 1991).

2.2.2.1. Protonų siurbLIAI

Augaluose yra išskiriami trys protonų siurbLIų tipai: plazminės membranos P- H^+ -ATPazė, vakuolės V- H^+ -ATPazė ir vakuolės H^+ -pirofosfatazė (V-PPazės). Šie siurbLIAi skiriasi savo struktūra, veikimo mechanizmu, kinetinėmis savybėmis, bei lokalizacija ląstelėje. (Palmgren, 2001).

H^+ -ATPazės yra randamos tik augaluose ir grybuose, yra išsidėstę plazminėje membranoje ir transportuoja protonus iš ląstelės, tokiu būdu reguliuodamos membranınį potencialą. Gyvūnuose panašią funkciją atlieka Na^+/K^+ -ATPazė (Sondergaard, 2004). Augalinėse ląstelėse H^+ -ATPazės įtaka membranos potencialui daug didesnė negu gyvūninėse, todėl augalinės ląstelės membranos potencialas ženkliai skiriasi nuo K^+ pusiausvyrinio potencialo

(Mimura, 1995). Siurblys priklauso taip vadinamai P-tipo ATPazių šeimai, kurios aktyvuojasi sudarydamos tarpinį kompleksą su 14-3-3 proteinu. Fosfatazių sąlygotas C terminalės defosforilinimas blokuoja 14-3-3 baltymo prisijungimą ir tuo pačiu pačios P ATPazės veiklą (Portillo, 2000). H^+ ATPazė yra monomeras, ją blokuoja vanadžio jonai, DES (dietilstilbestrolis), taip pat DCCD (dicikloheksilkarbodiimidis). H^+ -ATPazė yra labai svarbi tuose augaluose, kurie yra prisitaikę druskų pertekliui, nes Na^+ yra šalinamas iš ląstelės Na^+/H^+ antiporto pagalba (Gevaudant et al., 2007). Organinių junginių transportas taip pat dažniausiai susijęs su H^+ -ATPazės aktyvumu (Duby & Boutry, 2009). Siurblio aktyvumas gali kisti kaip atsakas į įvairių aplinkos sąlygų pokyčius, pvz. druskų, augalų hormonų (auksinų) koncentracijos padidėjimą, patogenų veiklą, stimuliavimą šviesa (Sondergaard, 2004).

Vakuolės $V-H^+$ -ATPazė yra sudėtingas polipeptidas, sudarytas iš 12 subvienetų, kurie gali būti sujungti į du domenų. V_1 domenas hidrolizuoja ATP, V_0 - atsakingas už H^+ translokaciją. ATP hidrolizės metu sukamas V_0 žiedas ir protonas iš citoplazmos pernešamas į vakuolę (Sze et al, 1999).

Vakuolės H^+ -pirofosfatazė ($V-PPazė$) protono pernešimui naudoja neorganinį pirofosfatą (PP_i). Augaluose PP_i yra svarbus energijos šaltinis, todėl pastarasis siurblys yra gana dažnas, ypatingai jaunuose augančiuose audiniuose. $V-PPazė$ pasižymi paprasta struktūra ir priešingai nei $P-ATPazė$ nesudaro fosforilinto tarpininko (Maeshima, 2000). Augalams yra būdinga, kad K^+ stimuliuoja PP_i hidrolizę. Šie siurbliai rasti daugumoje augalų ir daugelyje audinių. Be to, šie siurbliai buvo rasti ir Goldžio pūslelėse (Martinoia, 2007). Vakuolės tipo ATPazė ir $PPazė$ rūgština vidinėmis membranomis apgaubtus skyrius, įskaitant ir vakuolę. $V-ATPazė$ blokuoja nitratai, $PPazė$ – oligomicinas (Maeshima, 2000).

2.2.2.2. Ca^{2+} jonų siurbliai

Augalinių ląstelių membranose be H^+ siurblių labai svarbūs yra ir kalcio jonų (Ca^{2+}) siurbliai (Sanders et al., 2002). Ca^{2+} -ATPazės yra svarbios

palaikant žemą citoplazminio Ca^{2+} koncentraciją. Didelis Ca^{2+} kiekis taip pat pašalinamas $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporto būdu, tačiau antiporteriai nors ir gali transportuoti didelį kiekį Ca^{2+} , nepasižymi dideliu giminingumu kalciui. Be to, jie dažniausiai randami vakuolėse. Tuo tarpu Ca^{2+} -ATPazės dažniausiai aptinkamos plazminėje membranoje ir endomembranose. Ca^{2+} -ATPazės užtikrina pastovų žemą viduląstelinį Ca^{2+} lygį dėka didelio giminingumo Ca^{2+} . Augalų Ca^{2+} -ATPazės priklauso P-ATPazių šeimai ir yra paprastas polipeptidas. Ca^{2+} -ATPazės skirstomos į endoplazminio tinklo IIA-ATPazes ir autoinhibuojamąsias IIB Ca^{2+} -ATPazes. Arabidopsio genome randami keturi IIA ir dešimt IIB tipo kalcio siurblius koduojantys genai (Axelsen and Palmgren, 2001). Ca^{2+} -ATPazių reguliavimo mechanizmas dar nėra iki galo išaiškintas. Tačiau yra žinoma, kad autoinhibuojamosios Ca^{2+} -ATPazės yra aktyvuojamos prisijungus kalmodulinui, tik skirtingai nei gyvūnų homologai, ne prie C galo, bet prie N galo (McAinsh & Pittman, 2009). Manoma, kad $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporto fiziologinė funkcija yra pašalinti iš citoplazmos po signalo padidėjusį Ca^{2+} kiekį, o Ca^{2+} -ATPazės užtikrina pastovų žemą Ca^{2+} koncentracijos lygį citoplazmoje (Hirschi, 2001).

2.3. Augalinių ląstelių ramybės potencialo joninis mechanizmas

Augalinių ląstelių membranų ramybės potencialas yra sąlygojamas ląstelėje veikiančių pernašos sistemų laidumo bei tarpusavio sąveikos ir netolygaus jonų pasiskirstymo abipus membranos. Atskira pernašos sistema sukuria tam tikrą membraninį potencialą, kuris savo ruožtu veikia kitų nuo įtampos priklausomų pernašos sistemų veiklą. Galima išskirti penkias svarbiausias sistemas, labiausiai nulemiančias elektrofiziologines augalinės ląstelės plazminės membranos savybes. Kiekviena šių sistemų pasižymi jai būdingu laidumu ir kinetinėmis savybėmis, pusiausvyriniu potencialu, kurią apsprendžia koncentracijų tarp membranos išorinės ir vidinės pusės santykis. Tai būtų I) įeinančiosios, II) išeinančiosios krypties K^+ kanalai, III) išeinančiosios krypties Cl^- kanalas, IV) elektrogeninis siurblys - H^+ -ATPazė,

V) $\text{Cl}^-/2\text{H}^+$ simporto sistema, užtikrinanti Cl^- jonų patekimą į ląstelę (Gradmann & Hoffstadt, 1998).

Pusiausvyrinis potencialas yra būdingas kiekvienai atskirai pernašos sistemai ir yra apskaičiuojamas taip (**2.1 lentelė**):

2.1 lentelė. Pusiausvyrinio potencialo skaičiavimas kiekvienai atskirai pernašos sistemai, kur ΔGATP yra ATP hidrolizės laisvoji energija ir F - Faradėjaus konstanta, $c_{\text{I,c}}$ ir $c_{\text{I,i}}$ – atitinkamo jono koncentracija ląstelės viduje ir išorėje.

H^+ ATPazei	$E_p = \Delta\text{GATP}/F + E_H = \Delta\text{GATP}/F + (-59 \text{ mV}) \times \log(c_{\text{H,c}}/c_{\text{H,i}})$ $= -400 \text{ mV}$
K^+ kanalams	$E_{\text{K}_i} = E_{\text{K}_o} = E_{\text{K}} = (-59 \text{ mV}) \times \log(c_{\text{K,c}}/c_{\text{K,i}})$
$\text{Cl}^-/2\text{H}^+$ simporto sistemai	$E_{\text{S}_y} = (-59 \text{ mV}) \times \log(c_{\text{H,c}}^2 \times c_{\text{Cl,c}})/(c_{\text{H,i}}^2 \times c_{\text{Cl,i}}) =$ $= (-59 \text{ mV}) \times (\log(c_{\text{Cl,c}}/c_{\text{Cl,i}}) + 2\Delta\text{pH})$
Cl^- kanalams	$E_{\text{Cl}} = (59 \text{ mV}) \times \log(c_{\text{Cl,c}}/c_{\text{Cl,i}}),$

Augalinių ląstelių ramybės potencialo genezėje galime išskirti dvi dedamąsias - difuzinę komponentę, kurią sudaro joniniais kanalais tekantis jonų srautas ir metabolinę komponentę, kurią apsprendžia protonų siurblių veikla (Iwabuchi *et al.*, 2005). K^+ jonai yra pagrindiniai jonai, sąlygojantys ramybės potencialo difuzinę dedamąją. Yra manoma „ K^+ būsenoje“ esančių *Chara* ląstelių laidumą apsprendžia tie patys K^+ kanalai, kurie yra aktyvūs VP repoliarizacijos fazės metu (Tester, 1990).

Taip pat nemaža RP dalis priklauso nuo Cl^- , kadangi viduląstelinė Cl^- koncentracija augaluose gana didelė – 10÷200 mM. Tačiau, nors laidumo koeficientas P_{Cl} yra pakankamai didelis, bet jis žymiai mažesnis nei P_{K} . Kokie kanalai nulemia nuotėkio srovę nėra iki galo aišku iki šiol. Manoma, kad tai

gali būti neselektyvūs arba mechaninei įtampai jautrūs kanalai, o srovės nešėjai gali būti įvairūs jonai (Beilby, 2007a).

Metabolinė komponentė, kurią sąlygoja protonų siurblių veikla, yra veikiamą viduląstelinės ATP koncentracijos ir išorinės terpės pH.

Membranių ramybės potencialą galime apskaičiuoti pagal formulę

$$E = (g_p E_p + g_d E_d) / G$$

$$G = g_p + g_d$$

kur E_p , E_d – siurblių bei difuzinis potencialai g_p , g_d – atitinkamai siurblių ir kanalų laidumas

Pasyvus jonų transportas gali būti aprašomas Goldmano- Hodžkino-Katco lygtimi jonų srautams, papildyta Bolcmano joninių kanalų atsidarymo tikimybėmis.

$$i_r = P_r^0 P_r^{\max} \frac{zF^2 E_m}{RT} \frac{[I_r]_{in} - [I_r]_{out} \exp\left(-\frac{zFE_m}{RT}\right)}{1 - \exp\left(-\frac{zFE_m}{RT}\right)}$$

kur P_r^0 -r jono kanalo atsidarymo tikimybė, P_r^{\max} maksimalus specifinis šio jono laidumas, $[I_r]_{in}$ ir $[I_r]_{out}$ nesurišto jono koncentracija citoplazmoje ir apoplaste, F- Faradėjaus konstanta, R - universalioji dujų konstanta, T – absoliuti temperatūra.

Kalio, natrio ir chloro vienalaikę difuziją (srautą) per membraną galima apskaičiuoti naudojantis Goldmano lygtimi:

$$\varphi_m = -\frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_{vid} + P_{Na} [Na^+]_{vid} + P_{Cl} [Cl^-]_{iš}}{P_K [K^+]_{iš} + P_{Na} [Na^+]_{iš} + P_{Cl} [Cl^-]_{vid}}$$

kur P_K , P_{Na} , P_{Cl} –atitinkamų jonų laidumo koeficientai, $[K^+]_o$, $[Na^+]_o$, $[Cl^-]_o$ – jonų koncentracija ląstelės išorėje, $[K^+]_i$, $[Na^+]_i$, $[Cl^-]_i$ – jonų koncentracija ląstelės viduje, F - Faradėjaus konstanta, R - universalioji dujų konstanta, T – absoliuti temperatūra.

Menturdumbliuose siurblių ir difuzinis potencialai paprastai gali siekti atitinkamai iki -260mV (E_p) ir -130mV (E_d), tačiau tos pačios ląstelės ramybės potencialas gali kisti paros ir sezono bėgyje. priklausomai nuo siurblių ir kanalų aktyvumo. Įdomu pažymėti, kad ne pats g_p ar g_d sumažėjimas, bet g_p/g_d santykis apsprendžia menturdumblių ramybės potencialo dydį (Tsutsui, 2001). Priklausomai nuo H^+ siurblių ir K^+ kanalų aktyvumo ir tarpusavio sąveikos ląsteles pagal RP galima suskirstyti į tris energetines būsenas:

1. Hiperpolarizuota būsena (angl. *pump state*). Šioje būsenoje RP-ui pasiekus K^+ pusiausvyrinį potencialą, K^+ kanalai užsidaro ir pradeda dominuoti H^+ kanalų laidumas (siurblio varža dvigubai mažesnė už K^+ kanalų varžą).

2. Laidumo K^+ jonams būsena (angl. *K⁺ state*). Šio elektrocheminio modelio atveju dominuoja K^+ kanalų laidumas, o H^+ siurbliai, nors ir neišsijungia, jų elektrogeninis įnašas į RP yra nežymus.

3. Laidumo H^+ jonams būsena (angl. "*Bisson*" state). Ši būsena susidaro tada, kai aplinkos pH pasislenka į šarminę pusę (pH 9-11) ir pradeda dominuoti H^+/OH^- kanalų laidumas (Beilby M.J & Blatt M.R, 1986).

2.4. Augalų veikimo potencialai

Veikimo potencialai yra greiti elektriniai signalai augaluose, kuriuos sukelia įvairūs aplinkos dirgikliai ir tokiu būdu yra reguliuojami svarbūs augalų gyvybiniai procesai- kvėpavimas, fotosintezė, augimas ir kt. „Viskas arba nieko dėsnis“ ir galimybė sužadinti ląsteles elektriškai leidžia apibrėžti augalų membraninio potencialo pokyčius kaip veikimo potencialus (Beilby, 2007). Kaip atsakas į dirgiklį, augaluose gali būti registruojamas tiek vienetinis VP, tiek VP serija (Shepherd et al., 2008). VP generacija nepriklauso nuo stimuliavimo pobūdžio, todėl augalų VP neperduoda informacijos apie stimulo modalumą ir kokybę, o signalizuoja apie poveikio pradžią. Augalų VP įtakoja visas ląsteles, per kurias jie sklinda, sukeldami eilę joninių ir metabolinių pokyčių (Fromm & Lautner, 2005). Todėl VP gali ne tik perduoti informaciją ir tokiu būdu sukelti ląstelių atsakomąją reakciją, bet ir patys būti tos

atsakomosios reakcijos dalimi. Tačiau iki galo neaišku kokia būtent informacija yra koduojama augalų VP pagalba, kas ją dekoduoja ir kokio mechanizmo pagalba yra užtikrinama signalinė VP funkcija. Nėra pilnai išaiškinta galima tolimesnė elektrinio signalo transdukcija ir reakcijos mecaizmai (Pyatygin et al., 2008).

2.4.1. Augalinių ląstelių veikimo potencialo joninis mechanizmas

Naudojant viduląstelinę mikroelektrodinę techniką, fiksuotos įtampos/srovės techniką ir joninių kanalų bei protonų siurblių inhibitorius, buvo nustatyti pagrindiniai jonai, dalyvaujantys membraninio potencialo susidaryme ir VP genezėje. Šiuose tyrimuose kaip modelinė sistema dažniausiai buvo naudojami menturdumbliai. Nustatytieji veikimo potencialų genezės joniniai mecaizmai pasitvirtino kaip universalūs visame augaliniame pasaulyje (Fisahn et al., 2004).

Kadangi Ca^{2+} ir Cl^- pusiausvyrinis potencialas yra teigiamas išorėje, abu šie jonai gali nulemti veikimo potencialo depoliarizacinę fazę. Nustatyta, kad menturdumblių citoplazmoje padidėjus Ca^{2+} koncentracijai, ne tik sustoja citoplazmos judėjimas, bet ir aktyvuojami Cl^- kanalai (Lunevsky *et al.*, 1983). Japonų mokslininkai, naudodami viduląstelinės perfuzijos metodą parodė, kad tokie Ca^{2+} -aktyvuojami Cl^- kanalai egzistuoja menturdumblio *Chara* ląstelių plazminėje membranoje. Perfuzijos būdu padidinę viduląstelinę Ca^{2+} koncentraciją, jie parodė, kad žymiai padidėjo Cl^- ištekėjimas (Shiina & Tazawa 1988; Mimura & Shimmen, 1994). Ca^{2+} aktyvuojami menturdumblių Cl^- kanalai buvo sėkmingai rekonstruoti dirbtinėse membranose (Berestovsky et al., 1987). Taigi yra manoma, kad sužadavimo metu augaluose yra aktyvuojami nuo įtampos priklausomi Ca^{2+} kanalai. Ca^{2+} jonai patenka į citoplazmą pagal koncentracinį gradientą iš ląstelės išorės arba iš vakuolės ir kitų viduląstelinių membraninių struktūrų. Padidėjus viduląstelinei Ca^{2+} koncentracijai, atsidaro nuo Ca^{2+} priklausomi Cl^- kanalai. Staigus Cl^- ištekėjimas sąlygoja depoliarizacinę veikimo potencialo fazę (Kikuyama &

Tazawa, 1976; Shimmen & Nishikawa 1988). Fiksuotos įtampos/srovės metodu *Chara corallina* plazmalemoje buvo rasti nuo Ca^{2+} priklausomi anijoniniai kanalai, pasižymintys 9 pS (Okihara *et al.* 1991), 17 pS ir 38 pS (Homann & Thiel 1994) laidumu. Nuo Ca^{2+} priklausomi Cl^- kanalai plačiai paplitę ir aukštesniųjų augalų plazminėje membranoje (Tyerman, 1992; Ward *et al.*, 1995). Taip pat buvo parodyta, kad Ca^{2+} valdomi Cl^- kanalai pasižymi didžiausia atsidarymo tikimybe membraniniam potencialui esant nuo -80 mV iki -100 mV (Okihara *et al.*, 1991). Rusų mokslininkai (Berestovskij & Kataev, 2005) parodė, kad chlorinės srovės dydis sužadavimo metu yra proporcingas citoplazminės Ca^{2+} koncentracijos kvadratui.

Buvo nustatyta, kad menturdumbliuose VP generuoja ne tik plazmalema, bet ir tonoplastas. Vakuolės membraninis potencialas VP metu kinta maždaug 20 mV ir yra sąlyginai mažas, lyginant su plazmalemos VP, kuris gali siekti iki -300 mV (Kikuyama, 1986). Parodyta, kad tonoplasto veikimo potencialas taip pat yra sąlygojamas tonoplasto Cl^- kanalų aktyvacijos (Kikuyama 1986b; Kikuyama 1988). Menturdumbliuose buvo užfiksuotos Cl^- srovės, tekančios iš vakuolės į citoplazmą (Tyerman & Findlay 1989; Berecki *et al.*, 1999; Berecki *et al.*, 2001). Tonoplasto Cl^- kanalai taip pat yra valdomi padidėjusios laisvųjų Ca^{2+} jonų koncentracijos citoplazmoje, atskiro kanalo laidumas svyruoja nuo 37 pS iki 48 pS, kai citoplazmos pH 7,4. (Berecki *et al.*, 2001). Tam, kad pusė šių kanalų atsidarytų, citoplazminė Ca^{2+} koncentracija turi padidėti iki 100 μM prie pH 7,2.

Plazmalemos anijoniniai kanalų, dalyvaujančių VP generacijoje, aktyvinimui neužtenka vien tik padidinti įtampą ar vien tik citoplazmoje padidėti kalcio koncentracijai – VP generacija galima veikiant tik abiem veiksniais (Thiel *et al.* 1997). Kol kas nėra aiškiai parodyta, ar ir mechaniškai valdomi, ir įtampai jautrūs plazminės membranos Ca^{2+} kanalai vienodai gali inicijuoti VP generaciją. Taip pat yra dvi teorijos, iš kur VP generavimo metu Ca^{2+} patenka į citoplazmą. Pagal klasikinį požiūrį, Ca^{2+} patenka į citoplazmą per nuo įtampos priklausomus Ca^{2+} kanalus iš išorės (Tazawa & Kikuyama, 2003; Berestovsky & Kataev, 2005). Ca^{2+} patekimas į augalines ląsteles yra

galimas dviejuose įtampų ruožuose. Hiperpolarizacijos valdomi kanalai HACC atsidaro maždaug prie -250 mV, depolarizacijos aktyvuojami kalcio kanalai DACC - maždaug prie -120 mV. (Miedema et al, 2001). Normaliomis sąlygomis augalų ramybės potencialas svyruoja viduryje šio diapazono, todėl stimuliavimo metu pirmiausiai pasiekiamas kanalams atverti reikalingas potencialas ir tik įtampai pasiekus kritinę ribą, galimas kalcio jonų pritekėjimas į citoplazmą.

Pagal kitą nuomonę sužadėjimas vyksta, kai kalcio koncentracija citoplazmoje padidėja iš viduląstelių saugyklų (Wacke & Thiel, 2001; Wacke et al., 2003). Pagal šią teoriją, menturdumblių VP yra ne klasikinio Hodgkin Huxley (HH) tipo, t. y. VP priklauso ne nuo laiko ir įtampos priklausomų plazminės membranos joninių kanalų aktyvacijos savybių, bet generuojamas dėka sudėtingos signalų transdukcijos kaskados. HH modelis remiasi elektrinėmis membranos savybėmis ir joninių kanalų kinetika, bet nevertina citoplazminės Ca^{2+} koncentracijos. Antrasis modelis aprašomas pasitelkus antrinių tarpininkų sistemą dviem etapais. Pirmiausiai vyksta nuo įtampos priklausoma antrinio tarpininko inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) sintezė, o vėliau - receptorinių kanalų aktyvavimo sąlygotas Ca^{2+} tekėjimas iš viduląstelių saugyklų.

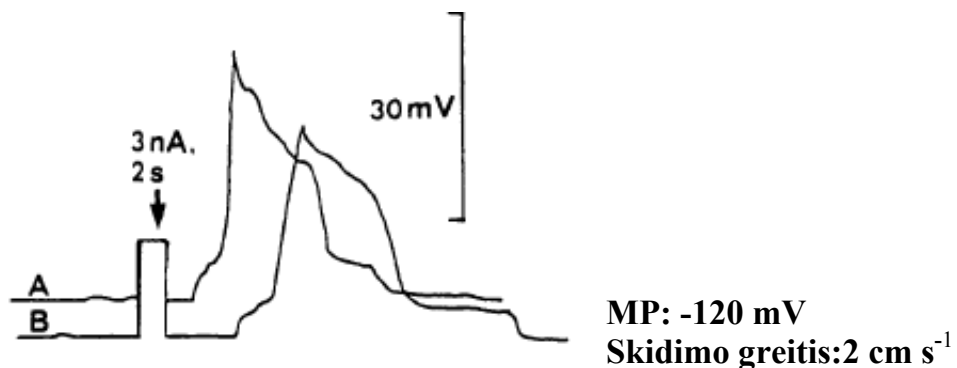
Yra manoma, kad Cl^- srovė pradeda mažėti pradėjus mažėti Ca^{2+} jonų koncentracijai (Kourie & Findlay, 1990b). Be to, padidėjusi Ca^{2+} jonų koncentracija aktyvuoja nuo įtampos priklausomus K^+_{out} kanalus. Veikimo potencialo repolarizacinės srovės reversinis potencialas yra artimas kalniam Nernsto potencialui, be to ši srovė yra blokuojama TEA (Homann & Thiel, 1994). Atsidarius K^+_{out} kanalams, K^+ srautas nulemia ląstelės repolarizaciją. Veikimo potencialo fiksavimo metodu nustatyta, kad *Chara corallina* ląstelėse VP generacijoje dalyvauja 40 pS K^+_{out} kanalai, kurie aktyvuojami maždaug prieš -25 mV ir užsidaro maždaug po 2,5 s, baigiantis VP. Tačiau repolarizacinės srovės kitimas taip pat priklauso nuo Ca^{2+}_{cit} kitimo (Thiel et al., 1997). *Nitellopsis obtusa* ląstelėse rasti 25-50 pS K^+ kanalai (Katsuhara et al 1990), kurių veikla priklauso nuo išorinės Ca^{2+} koncentracijos ir ATP.

Ląsteli esant ramybės būsenoje, kai ramybės potencialas yra stipriai neigiamas, šių kanalų atsidarymo tikimybė yra labai nedidelė ($P \ll 1\%$). Taip pat K^+ kanalai buvo rasti ir menturdumblių tonoplaste (Tyerman & Findlay, 1989).

Veikimo potencialo generavimo metu augalinės ląstelės išnaudoja didžiąją jonų elektrocheminių gradientų dalį, repoliarizacijos fazėje dalyvaujančių joninių kanalų srautai nesugeba pasiekti pradinio membraninio potencialo lygio ir repoliarizacijos fazę užbaigia H^+ siurblio sąlygojamas išeinantysis protonų srautas. Tokiu būdu mes galime išskirti greitąją ir lėtąją repoliarizacijos fazes. Panaši įvykiu seka veikimo potencialų metu būdinga ir aukštesniesiems augalams (Tyerman 1992).

2.4.2. Augalų veikimo potencialų fizikinės savybės

Normaliomis sąlygomis augalų VP pasižymi jiems būdinga forma, sužadavimo slenksčiu bei sklidimo savybėmis (Beilby, 2007; Fromm & Spanswick, 1993).



2.1 pav. Intraląstelinio būdu užregistruoti gluosnio (*Salix viminalis L.*) stiebo žievės veikimo potencialai. Stipresni nei 2 nA ir ilgesni nei 1 s stimulai sukėlė 30-50 mV amplitudės VP. Sklidimo greitis tiek apikalnia (A), tiek bazipetalnia (B) kryptimis buvo 2 cm s⁻¹. (Adaptuota pagal Fromm & Spanswick, 1993).

Tam, kad būtų sugeneruojamas VP, ląstelės membrana turi depoliarizuotis iki tam tikro slenkstinio lygio. Elektrinio stimuliavimo metu VP sužadavimo slenkstis pasiekiamas tiek didinant stimulo intensyvumą, tiek

ilginant stimuliavimo trukmę. Pasiekus sužadavimo slenkstį, stimulo parametru stiprinimas neturi jokios įtakos nei veikimo potencialo amplitudei, nei trukmei, nei formai. Procesas paklūsta “viskas arba nieko dėsniai”. Jeigu ikislenkstiniai stimulai seka vienas paskui kitą nedideliais laiko intervalais, vyksta sumavimosi procesas ir taip pat sukeliamas veikimo potencialas (Shepherd et al., 2008).

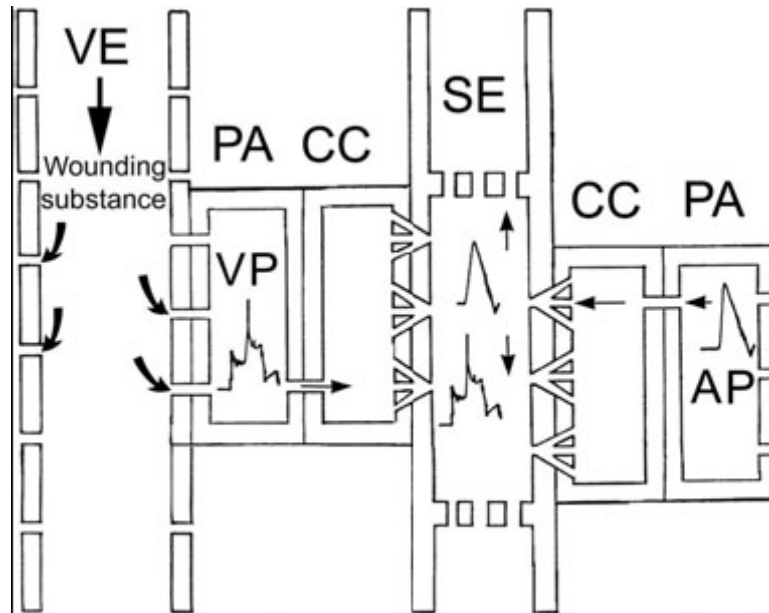
VP priežastimi gali būti įvairios prigimties stimulai - staigus temperatūros ar slėgio pokytis, mechaninis stimuliavimas, cheminių medžiagų depoliarizuojantis poveikis, elektros srovė. Elektriškai sukeldami VP, galime nustatyti tam tikrus fizikinius parametrus, būdingus vienai ar kitai augalų rūšiai. Pavyzdžiui, lenkų mokslininkai (Zawadzki et al, 1991), tirdami saulėgrąžų VP, surado minimalius elektrinio stimuliavimo parametrus - reobazės dydis – 2 V, minimalus stimuliavimo laikas -1,8 s, chronaksija -2,3 s. VP metu depoliarizacijos procesas vyksta žymiai greičiau nei repoliarizacija. Augalinių ląstelių veikimo potencialai pasižymi gana ilga trukme 0,5-10 s bei refrakteriniu periodu.. Kuo ilgesnė veikimo potencialo trukmė, tuo ilgiau trunka ir refrakterinis periodas - 0,5-100 s (Beilby, 2007).

Iššauktas VP sklinda membrana beveik pastoviu greičiu nemažėjant amplitudei. Plazminė membrana leidžia ląstelėms, audiniams ir organams perduoti elektrinius signalus tiek trumpu, tiek ir ilgu atstumu. Daugumos tirtų augalų VP sklidimo greitis yra 0,01-0,2 $\frac{m}{s}$. Menturdumbliuose VP sklidimo greitis labai priklauso nuo ląstelės išorinės terpės. Pavyzdžiui, *Chara brauni* VP sklidimo greitis drėgname ore buvo 0,21 $cm s^{-1}$ ir 1,5 $cm s^{-1}$ APW tirpale, kuris ties bambliu dar padidėjo iki 5,7 $cm s^{-1}$ (Tabata & Sibaoka, 1987). VP sklinda abejomis kryptimis nuo sužadavimo vietos. Pastaruoju metu atrasti taip vadinamieji greitieji augalų VP, kurių sklidimo greitis, pavyzdžiui, sojų augaluose, yra 30 ms^{-1} (Volkov et al., 2000).

Yra pastebėta, kad panašūs augalai tuo pačiu laiku, arba tas pats augalas skirtingomis dienomis pasižymi skirtingu jaudrumu. Be to, augalų VP būdingas tam tikras periodiškumas (Shabala et al., 2006).

Veikimo potencialas, sugeneruotas stimuliuojant bet kurią simplasto vietą, floemos ląstelėmis gali greitai nusklisti į kitas ląsteles ir audinius, tuo pačiu perduodamas reikšminę informaciją funkciškai svarbiems organams. Svarbu pažymėti, kad veikimo potencialų pagalba informacija perduodama ne tik labai greitai, bet ir visoms ląstelėms, per kurias veikimo potencialai sklinda.

Ląstelės plazmodezmomis ir floemos rėtiniais indais jungiasi viena su kita ir sudaro nenutrūkstamą membraninį tinklą, kuriuo veikimo potencialas gali skliti (į šonus plazmodezmomis ir išilgai rėtiniais indais) visu augalu (Fromm & Lautner, 2007).



2.2. Pav. Veikimo potencialų sklidimas augaluose. Veikimo potencialas (AP, dešinėje) gali skliti trumpu atstumu per plazmodezmas. Pasiekęs rėtinių indų lydimašias ląsteles (SE/CC) pastovios amplitudės AP gali skliti rėtinių indų plazmine membrana ilgus atstumus abiem kryptimis. Variabilus potencialas VP, kurį sukėlė hidraulinis pažeidimas, generuojamas parenchimos ląstelių (PA) esančių šalia ksilemos (VE) plazminės membranos. VP taip pat gali skliti plazmodezmomis ir pasiekti floamą, tačiau skirtingai nei AP, jų amplitudė mažėja, tolstant nuo generavimo vietos.

2.4.3. Veikimo potencialų signalinė funkcija augaluose

Augalai greitai reaguoja į šviesos intensyvumo, osmotinio slėgio, drėgmės ir temperatūros pokyčius, mechaninius pažeidimus. Viena iš reakcijų į pasikeitusias aplinkos sąlygas išraiškų yra membraninio potencialo moduliacija, kuri kartais įgauna veikimo potencialo formą. Veikimo potencialai gali būti apibrėžiami kaip daugiafunkciniai augalų signalai, kurių pagalba augalai perduoda informaciją apie įvairias pažaidas - mechaninius pažeidimus, patogenų ar vabzdžių atakas, šaldymą ar deginimą, taip pat šviesos ir gravitacijos pokyčius (Sanders et al., 1999; Zimmermann et al., 1999; Knight & Knight, 2001; Davies, 2004). Svarbu pažymėti, kad veikimo potencialų pagalba informacija perduodama ne tik labai greitai, bet ir visoms ląstelėms, per kurias veikimo potencialai sklinda. Kai tuo tarpu gyvūnų nervinėje sistemoje informacija siunčiama į tam tikrą tikslinį tašką (Davies, 2004).

Aiškiausiai VP signalinė funkcija yra išreikšta augaluose, kurie pasižymi taip vadinamomis greitomis lokomotorinėmis reakcijomis - vabzdžiaėdžiuose augaluose, mimozose. Tačiau ir įprastuose augaluose atrandama vis daugiau procesų, kuriuos gali kontroliuoti VP. Evoliuciniu požiūriu pirmoji VP fiziologinė signalinė funkcija yra osmotinio slėgio reguliavimas ir reakcija į mechaninį poveikį (Fromm & Lautner, 2005). Taip pat buvo parodyta, kad VP generacijos ir sklidimo metu sustabdomas stiebo ilgėjimas visose dalyse, kuriomis sklinda VP. Šis procesas vyksta todėl, kad VP generacijos metu sumažėja ląstelių turgoras, o tuo pačiu stabdomas floemos transportas (Shiina & Tazawa, 1986). Nustatyta, kad įvairūs augalai veikimo potencialo pagalba kontroliuoja tokius gyvybiškai svarbius fiziologinius procesus kaip kvėpavimas (Dziubinska et al., 1989) ir fotosintezė (Koziolėk et al., 2004; Grams, et al., 2009). Tiriant karščio poveikyje sukeltus tuopų VP, buvo stebimas CO₂ sugėrimo mažėjimas greta pažeidimo esančiuose lapuose. Tačiau įdomu pažymėti, kad šalčiu paveiktame augale fotosintezės redukcija nebuvo stebėta (Lautner et al. 2005).

Jei augalas yra veikiamas vabzdžių ar patogenų, veikimo potencialus galime užregistruoti ne tik pažeistame, bet ir visuose lapuose. Veikimo potencialai aktyvina fermentines sistemas, prasideda biocheminės reakcijos,

pradedamas gaminti etilenas (Dziubinska et al., 2003). Etilenas ir jazminų rūgštis skatina gynybinių medžiagų sintezę augalinėse ląstelėse. Nustatyta, kad VP gali aktyvinti fermentų veiklą ar inicijuoti tam tikrų genų raišką (Wildon et al., 1992). Buvo parodyta, kad veikimo potencialai, kaip atsakas į karščio poveikį, gali inicijuoti jazminų rūgšties biosintezę ir PIN2 (proteazės inhibitoriaus) genų raišką (Fisahn et al., 2004). Ryšys tarp VP ir padidėjusios proteinizės inhibitoriaus koncentracijos buvo nustatytas pomidoruose (Stankovic & Davies, 1997). Prieš eksperimentą paveikus bulves rutenio raudonuoju, kuris blokuoja Ca^{2+} patekimą į citoplazmą, tuo pačiu ir VP generaciją, jazminų rūgšties biosintezė ir PIN2 (proteazės inhibitoriaus) genų raiška nebuvo stebima (Fisahn et al., 2004).

Staigus temperatūrų pokytis sukelia veikimo potencialą, kuris savo ruožtu inicijuoja eilę adaptacinių reakcijų (Pyatygin et al., 1999). Yra manoma, kad VP 12 - 60 min. laikotarpiui iššaukia tam tikras visų sklidimo metu veikiamų audinių nespecifines adaptyvias reakcijas arba sąlygoja taip vadinamąją preadaptaciją. Jei streso (pavyzdžiui, šalčio) poveikis tęsiasi, per tą laiką įsijungia adaptyvūs gynybiniai mechanizmai ir augalas gali išgyventi nepalankias sąlygas (Pyatygin et al., 2008).

Augalinių ląstelių VP neperduoda informacijos apie poveikio kokybę ir stimulo modalumą, tačiau signalizuoja apie pavojų ir kintančias aplinkos sąlygas. Tai leido augalams geriau prisitaikyti ir išlikti. VP padeda pereiti ląstelėms į fiziologiškai aktyvią būseną ir jei poveikis pasikartos - pasiruošti reikalingiems struktūriniais pokyčiams. Veikimo potencialų pagalba užtikrinama komunikacija tarp visų augalo dalių, koordinuojami fiziologiniai procesai vykstantys šaknyse ir lapuose (Fromm & Fei, 1998).

Menturdumbliuose veikimo potencialo funkcinė prasmė aiškinama citoplazmos judėjimo sustabdymu. VP metu padidėja viduląstelinio kalcio koncentracija, ko išdavoje yra aktyvinama proteinkinazė, kuri fosforilina mioziną. Fosforilintas miozinas negali jungtis su aktinu, ir tokiu būdu citoplazmos judėjimas sustoja iki tol, kol baigiasi veikimo potencialas.

(Wayne, 1994). Per tą laiką ląstelėje įvykę tam tikri biocheminiai pokyčiai užkerta kelią galimam medžiagų ištekėjimui iš ląstelės.

2.5. Cholinerginė sistema augaluose

Gyvūnų cholinerginėje sistemoje galime išskirti keturias pagrindines sudedamąsias dalis: acetilcholiną ir acetilcholino receptoriai, bei acetilcholino kiekį reguliuojantys elementai: sintezės fermentas acetilcholintransferazė (ATCh, EC 2.3.1.6) ir skaidantysis fermentas- acetilcholinesterazė. (AChE, EC 3.1.1.7).

Visi šie cholinerginės sistemos elementai egzistuoja ir augaluose, nors į klausimą ar augaluose yra acetilcholino receptoriai nėra vienareikšmio atsakymo (Yamamoto & Momonoki, 2008). Kol kas augaluose nėra išskirta baltymo, kuriam būtų galima priskirti ACh receptoriaus savybes. Dažniausiai augalinėse ląstelėse yra aprašomos taip vadinamos acetilcholiną prisijungiančios sritys (angl. *ACh binding sites*). Tokios sritys buvo aptiktos spindulinės pupuolės *Phaseolus aureus* (Fluck & Jaffe, 1974b) ir paprastosios pupelės *P. vulgaris* (Hartmann et al., 1981; Hartmann & Gupta, 1989) daiguose. Nors kai kurių autorių siūlymu acetilcholino receptoriai egzistuoja ir atlieka tam tikrą vaidmenį vandens homeostazės palaikyme bei fotosintezėje (Wessler et al., 2001), ACh dažniausiai apibūdinamas kaip signalinė molekulė, atliekanti tam tikras funkcijas augaluose.

2.5.1. ACh receptorių klasifikacija

Istoriškai susiklostė, kad acetilcholino receptoriai pagal ACh galinčius pakeisti natūralius alkaloidus - muskariną ir nikotiną - yra skirstomi į muskarininius (mAChR) ir nikotininius (nAChR) receptorius. nAChR yra stimuliuojami nikotino ir inhibuojami D-tubokurarino, o mAChR yra stimuliuojami muskarino ir inhibuojami atropino (Hille, 2001). Molekulinė analizė parodė, kad šie receptoriai priklauso skirtingų baltymų superšeimoms

(Itier & Bertrand, van Koppen CJ.; Kaiser B 2001; van Koppen & Kaiser, 2003).

nAChR yra joniniai kanalai, ir kaip kiti ligandų aktyvuojami kanalai, yra sudaryti iš 5 baltymų subvienetų, kurių struktūra skirtinguose audiniuose gali būti skirtinga. Šis receptorių – tai alosterinis baltymas, kurio masė yra apie 290 kD ir kuris sudarytas iš penkių subvienetų: 2α , 1β , 1γ , ir 1δ arba 1η . Šie penki subvienetai išsidėstę tarpusavyje taip, kad sudaro piltuvėlio formą, kurios platesnė dalis atsiveria į sinapsinį plyšį, o siauresnė išsidėsčiusi plazminėje membranoje. Kiekvienas iš penkių subvienetų turi keturis membraną perveriančius spiralinius domenų M1- M4. Kiekvienas subvienetas turi keturis transmembraninius segmentus. Pentamerinė struktūra ir galima didelė molekulinė įvairovė sąlygoja didelį galimų nAChR subtipų kiekį. Kiekvieno subvieneto M2 segmento α spiralinė suformuoja porą ir reguliuoja vartinį mechanizmą. Ši molekulė turi du acetilcholiną prijungiančius centrus, kurie išsidėstę tarp α ir β subvienetų heteromeriniuose receptoriuose ir tarp α subvienetų homomeriniuose receptoriuose. Dvi ACh molekulės, prisijungusios prie α subvienetų N galo, sąlygoja visų M2 segmento α spiralių pasisukimą 15° . Valino (Val 255) ir leucino (Leu 251) liekanos sudaro hidrofobinę sritį, leidžiančią dehidratuotiems jonams (dažniausiai katijonams) pratekti (Miyazawa et al., 2003). Atviroje būsenoje acetilcholino receptorių gali būti tik kelias milisekundes. Jei acetilcholino koncentracija išlieka didelė ilgesnį laiką, receptorių pereina į neįjungtos būseną (receptorių vis dar prisijungęs acetilcholiną, tačiau jonų kanalas uždarytas). Atskylant acetilcholinui, receptorių keičia savo formą ir pereina į ramybės būseną (Maathuis, 2004).

mAChR nėra joniniai kanalai, o priklauso su G-baltymu susijusių receptorių šeimai. Su G baltymu sujungti receptoriai dar vadinami metabotropiniais receptoriais arba septynis kartus membraną perveriančiais (heptaspiraliniais) receptoriais. mAChR skirstomi į 5 subtipus (M1, M2, M3, M4 ir M5). Šie receptoriai, inicijuodami antrinių tarpininkų kaskadas, sąlygoja joninių srovių atsiradimą. G-baltymas jungiasi prie receptoriaus iš citoplazminės pusės. Nelyginiais numeriais žymimi receptoriai (M1, M3, M5)

veikia per inozitolfosfatą, o lyginiais numeriais žymimi receptoriai inhibuoja adenilciklazę ir taip sumažina ląstelėje esančio cAMP kiekį (Conn et al., 2009). M1, M2, M3 receptoriai randami specifinėse CNS srityse. M4 ir M5 receptoriai yra glaudžiai susiję su CNS, bet jų funkcija kol kas dar neišaiškinta. Šių receptorių farmakologinę klasifikaciją apsunkina ribotas antagonistų ir agonistų selektyvumas (vanKoppen & Kaiser 2003).

Paprastai nAChR reaguoja į ACh per kelias ms ir yra randami raumenų audiniuose ir smegenyse, o mAChR dėl ACh aktyvuojasi lėčiau ir paprastai randami parasimpatinėje autonominės nervų sistemos dalyje. nAChR yra katijonams selektyvūs kanalai ir lemia žadinančią neurotransmisiją. Tačiau, elektrofiziologiniai duomenys apie jonotropinius, ACh-valdomus chloro kanalus moliuskuose ir nematoduose parodė ir slopinančios cholinerginės neurotransmisijos egzistavimo galimybę (Putrenko et al., 2005).

2.5.2.1. Acetilcholino paplitimas augaliniame pasaulyje

ACh yra aptinkamas daugelyje tirtų augalų rūšių, kurios priklauso evoliuciškai skirtingiems sisteminiams vienetais (**2.2 lentelė**). ACh randama tiek dumbliuose, tiek samanose, sporiniuose induočiuose, plikasėkliuose ir gaubtasėkliuose augaluose (Tretyn, 1991). ACh molekulės yra išskirtos iš daugiau negu 50 įvairių šeimų augalų rūšių (Amaranthaceae, Aquifoliaceae, Betulaceae, Compositae, Cucurbitaceae, Graminae, Leguminosae, Pinaceae, Plantaginaceae, Rosaceae, Solanaceae, Umbeliferae, Urticaceae šeimų). ACh koncentracija gali svyruoti nuo nanogramų iki mikrogramų vienam gramui augalo masės (Miura & Shih, 1984). Didelis ACh kiekis 0,5 $\mu\text{mol/g}$ sausos masės buvo rastas dilgelėse, ypatingai dilginančiose ląstelėse (Wessler et al., 2001), daugumoje vaistinių augalų - amaluose (*Viscum album*) paprastoje (*Digitalis purpurea*) ir gauruotoje (*Digitalis lanata*) rusmenėse. Egiptiniame kmyne (*Carum copticum*) ir kituose (Tretyn & Kendrick, 1991). Tačiau daugiausiai ACh rasta bambukų daigų viršūnėse (2,9 $\mu\text{mol/g}$). Šis kiekis 80 kartų didesnis už žiurkės smegenyse nustatytą kiekį (Kawashima et al., 2007).

2.2 lentelė. Nustatytas ACh kiekis įvairiose augalų rūšyse (pmol/g). Pagal (Horiuchi et al. 2003).

Nr.	Augalų rūšis	ACh kiekis (pmol/g)	
1	Arabidopsis thaliana	23,7	
2	Solanum melongena	416 930,0	
3	Phyllostachys bambusoides	viršutinė dalis	2 940 780,0
		apatinė dalis	2 543 460,0
4	Phyllostachys pubescens	viršutinė dalis	1 744 800,0
		apatinė dalis	666 500,0
5	Cryptomeria japonica (ūglis)	182,6	
6	Hinoki Chamaecyparis obtuse (riešutai)	343,2	
7	Pine Pinus thmbergii (ūglis)	275,9	
8	Podocarpus macrophyllus (riešutai)	126,2	
9	Fern Pteridium	74,4	
10	Gleichenia glauca	1671,2	
11	Equisetum arvense	38,7	
12	Conocephalum conicum	33,2	
13	Polytrichum	195,7	

ACh kiekis priklauso nuo augalo vystymosi stadijos bei aplinkos sąlygų. Didesnė acetilcholino koncentracija dažniausiai stebima jaunose, greitai augančiose augalo dalyse. Pavyzdžiui, didžiausias ACh kiekis (381 mmol/g sausos masės) buvo rastas pomidorų sėklaskiltėse ir mažiausias kiekis (162 nmol/g sausos masės) sėjinukų šaknyse (Wiśniewska & Tretyn, 1999). Daugiausiai (142 pg/g sausos masės) ACh buvo rasta spindulinės pupuolės (*Phaseolus aureus*) daigų pumpuruose ir šoninėse šaknyse (Jaffe, 1970). ACh buvo rasta visuose šio augalo audiniuose, nepriklausomai ar daigai buvo auginami šviesoje, ar tamsoje, nors lapuose jo koncentracija buvo žymiai mažesnė. Tačiau žaliadumblio *M. denticulata* ląstelėse, kurios augo šviesoje, ACh kiekis buvo žymiai didesnis, nei tose ląstelėse, kurios augo tamsoje

(Schiechl et al., 2008). Panašus šviesos poveikis ACh kiekiui buvo stebėtas pupose (Miura & Shih, 1984), avižose (Tretyn & Tretyn, 1990), žirniuose ir samanų kaliuje (Hartmann & Kilbinger, 1974a,b).

Skirtingas ACh kiekis gali būti randamas ne tik atskirose rūšyse, bet ir tose pačiose rūšyse, augančiose skirtingose gamtinėse sąlygose. Buvo nustatyta, kad tose pačiose agurkų veislėse, bet Malaizijoje augančių atsparių vytimui kultivaruose ir Japonijos kultivaruose, kur vytimas labiau stebimas, ACh koncentracija skyrėsi net iki 10 kartų (Momonoki & Momonoki, 1991).. Be to, paveikus karščio stresu atsparius vytimui augalus, ACh koncentracija apie 2 kartus padidėjo pirminiame jų lapsostyje, bet sumažėjo kitose lapo dalyse. Augalui atstačius vandens balansą, ACh pasiskirstė vėl taip pat, kaip iki poveikio (Momonoki & Momonoki, 1991).

Acetilcholiną randamas daugumoje augalinių ląstelių organelių - ląstelės sienelėje, plazminėje membranoje, citoplazmoje, chloroplastų membranoje ir tilakoiduose, branduolyje, mitochondrijose. ACh sintezės procesas buvo nustatytas endoplazminiame tinkle (Jaffe 1976).

2.5.2.2. Fiziologinis ACh vaidmuo augaluose

Yra nustatyta, kad ACh ne tik plačiai paplitęs augaliniame pasaulyje, bet ir atlieka tam tikrą funkcinį vaidmenį, veikdamas gyvybiškai svarbius augalų fiziologinius procesus (Hartmann & Gupta, 1989; Tretyn & Kendrick, 1991; Wessler et al., 1999). Buvo parodyta, kad ACh reguliuoja žiotelių varstymąsi (Madhavan et al., 1995) Dėl išorinio ACh poveikio padidėjo citoplazminio Ca^{2+} koncentracija *Vicia faba* žiotelių varstomosiose ląstelėse (Meng, 2004). Nustatyta, kad osmotinis stresas sąlygoja ACh kiekio sumažėjimą šaknyse, bei medžiagų transporto ir transpiracijos greičio sulėtėjimą bei žiotelių užsidarymą *Vicia faba* augaluose (Wang et al, 2003). Autorių siūlymu ACh gali atlikti signalinės molekulės vaidmenį požeminių ir antžeminių augalo dalių komunikacijoje, reguliuoti žiotelių varstymąsi ir tokiu būdu padėti augalui prisitaikyti prie kintančių aplinkos sąlygų. Yra manoma,

kad ACh gali dalyvauti fotosintezės reguliavime (Roshchina, 2001; Wessler et al., 2001). Taip pat nustatyta, kad ACh dalyvauja gravitropinėse reakcijose (Momonoki, 1997). ACh dalyvauja vandens homeostazės palaikyme (Wessler et al., 2001). Kai kuriuos augalus išoriškai paveikus ACh, buvo stebimi pokyčiai dygimo ir pirmos augimo fazės metu (Tretyn, 1990). Yra manoma, kad ACh svarbus apvaisinimo ir žiedadulkių atpažinimo procese (Roshchina, 2001). Yra nuomonė, kad ACh poveikis žydėjimui yra sąlygotas ACh poveikio plazminės membranos joniniam laidumui (Greppin & Horowitz, 1975). Be to ACh stimuliuoja augalinių ląstelių augimą (Tretyn & Kendrick, 1991).

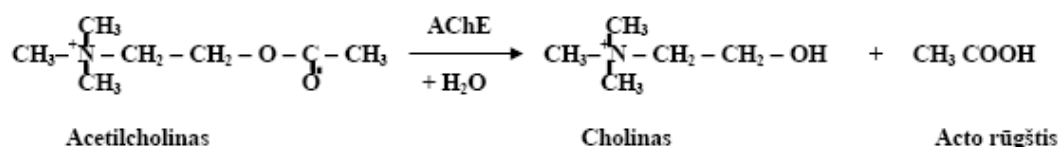
Yra nemažai duomenų, rodančių, kad ACh dalyvauja fitochrominės sistemos reguliuojamuosiuose procesuose (Hartmann & Gupta, 1989; Jaffe, 1970; Tretyn & Kendrick, 1991). Pavyzdžiui, acetilcholinai gali imituoti raudonos šviesos poveikį fotomorfogenezėi augaluose (Tretyn & Kendrick, 1991). Raudona šviesa žymiai padidina ACh koncentraciją ląstelėse. Negana to, raudonąją šviesą pakeitus tolimąja raudona šviesa, ACh koncentracija grįžta į pradinį lygį (Hartmann & Gupta, 1989). Yra manoma, kad ACh kaip antrinis tarpininkas gali dalyvauti fitochromo veikloje ir dalyvauti šviesos signalų transdukcijoje (Jaffe, 1970). ACh poveikis labai panašus į raudonosios šviesos -. 4 min. veikiant tiek raudona šviesa, tiek 0,1mM ACh, daugiau nei 50% inhibuojamas *Phaseolus aureus* antrinių šaknų formavimasis. Be to, apšvietus *Phaseolus aureus*, buvo užfiksuotas acetilcholino koncentracijos padidėjimas lapuose ir sumažėjimas stiebe, palyginus su kontrole, laikyta tamsoje (Miura A., Shin T. – M., 1984). Parodyta, kad fitochrominės sistemos veikla ir Ca^{2+} jonai sąlygoja protoplastų brinkimą (Blakeley, 1983). ACh taip pat gali inicijuoti šį procesą, pakeisdamas raudonos šviesos poveikį, ir sąlygoti etioliuotų kviečių protoplastų brinkimą (Tretyn et al., 1990).

2.5.2.3. ACh poveikis augalinių membranų jonų pernašos sistemoms

Vienas iš galimų ACh poveikio taikinių augaluose yra ląstelių membranų sistema. Literatūros duomenimis ACh reguliuoja membranos pralaidumą H^+ , K^+ , Na^+ ir Ca^{2+} jonams. Buvo parodyta, kad ACh sąlygoja membraninio potencialo pokyčius špinatų lapuose (Greppin & Horowitz, 1975). Acetilcholino koncentracijos padidėjimas inhibuoja mėlynos šviesos sąlygotą membranos potencialo hiperpolarizaciją ir K^+ pritekėjimą pupų daiguose (Hartmann, 1977). Kita vertus buvo parodyta, kad ACh kaip tik skatina H^+ ištekėjimą (Jafe 1970) ir aktyvuoja protoninius siurblius (Balushka F., et al., 2004). Yra duomenų, kad žirnių lapų chloroplastuose ACh stimuliuoja Na^+ ir K^+ ištekėjimą (Roshchina, 1987). ACh sąlygoja Ca^{2+} jonų koncentracijos padidėjimą avižų koleoptilėse (Tretyn, 1987) ir citoplazminio Ca^{2+} koncentracijos padidėjimą *Vicia faba* žiotelių varstomosiose ląstelėse (Meng et al., 2004). Be to šie autoriai parodė, kad Ca^{2+} koncentracija padidėjo iš viduląstelių saugyklų. Taipogi acetilcholiną aktyvuoja Cl^- kanalus, esančius *Chara corallina* tonoplaste (Gong & Bisson, 2002). Šių autorių darbe buvo parodyta, kad ACh sąlygota chlorinių kanalų aktyvacija atspindima veikimo potencialo formos pokyčiuose.

2.5.3. Acetilcholinesterazė augaluose

Acetilcholinesterazė (AChE) – fermentas, kuris hidrolizuodamas acetilcholino molekulės esterines jungtis, katalizuoja acetilcholino skaidymą ir tokiu būdu reguliuoja šio neurotransmiterio koncentraciją. Gyvūnų AChE hidrolizuoja ACh $3 \cdot 10^6$ molekulių per minutę greičiu. Fermentas, skaidantis ACh, buvo aptiktas ir augaluose (Wiśniewska & Tretyn, 2003).



2.5.3.1. AChE nustatymo augaluose metodai

AChE buvimas augaluose gali būti patvirtintas tiesiogiai molekulinės biologijos metodais arba hidrolizės metu susidariusių hidrolizės produktų kiekio nustatymo metodais. ACh hidrolizė augalų audiniuose gali būti nustatoma naudojant radioaktyvų žymėtąjį $[1-^{14}\text{C}]\text{ACh}$ ir matuojant susidarančio radioaktyvaus acetato kiekį (Momonoki, 1992). Pavyzdžiui, derinant radiometrinį ir genų inžinerijos metodus buvo nustatytas AChE kiekis laukinio tipo pomidorų *Lycopersicon esculentum* Mill. ir pomidorų, turinčių modifikuotą fitochrominę sistemą, daiguose (Wiśniewska & Tretyn, 2003). Pagal taip vadinamąją Elmano reakciją (Momonoki, 1997) spektrofotometriškai randamas acetiltiocholino hidrolizės metu susidariusios tiolinės grupės kiekis ir tokiu būdu nustatomas hidrolizinis AChE aktyvumas. AChE gali būti randama elektrochemiškai – titravimo būdu įvertinant hidrolizės metu susidariusios acto rūgšties kiekį (Momonoki, 1997; Momonoki et al., 1998).

Įvairūs hidrolizinio aktyvumo nustatymo metodai patvirtino AChE egzistavimą ne tik daugelyje augalų rūšių, bet kartu padėjo nustatyti jos lokalizaciją ląstelėse. Citocheminių metodų pagalba Fluck and Jatfe (1974a), tirdami 12 dienų raudonosios plunksnapupės (*Phaseolus aureus*) šaknis nustatė, kad AChE lokalizuota ląstelių sienelėje ir tarpe tarp sienelės ir plazmalemos. Ląstelės sienelėje nustatytas ir kukurūzų šaknų (Fluck & Jaffe, 1974b), bei etioliuotų avižų koleoptilių (Tretyn & Tretyn, 1990) hidrolizinis aktyvumas.

Skenuojančio elektroninio mikroskopo pagalba kviečių aleuroninėse ląstelėse hidrolizinio aktyvumo produktai buvo rasti tik vidinėje plazminės membranos pusėje (Tretyn et al., 1986).

Galiausiai buvo išskirtas kukurūzų ir raudonosios plunksnapupės cholinesterazės baltymas. Genų klonavimo ir sekvenavimo metodais buvo surasta AChE pirminė seka ir nustatytos išgrynintosios AChE fermentinės savybės. Genomų analizė parodė, kad rastieji kukurūzų AChE koduojantys

genai būdingi skirtingoms augalų rūšims, bet jokie panašūs genai nebuvo rasti ne tik gyvūnų, bet ir grybų ar bakterijų duomenų bazėse (Yamamoto & Momonoki, 2008).

Nors augalų ir gyvūnų AChE pirminė struktūra skyrėsi, katalitinio centro triada yra ta pati tiek augalams, tiek gyvūnams. Buvo palygintos atskirų augalų klasių baltymų struktūros. Nelabai skyrėsi ne tik vienaskilčių ir dviskilčių, bet ir atskirų rūšių pirminė AChE struktūra. Nustatyta, kad kukurūzų AChE pirminės baltymo struktūros panašumas lyginant su ryžių AChE yra 77%. Tačiau įvairių augalų AChE pasižymi skirtinga ketvirtine struktūra. Pavyzdžiui kukurūzų AChE yra dimeras, o pupinių šeimos augalams būdinga trimerinė AChE forma. Tačiau įvairių augalų acetilcholinesterazės pasižymi panašiomis fermentinėmis savybėmis (Sagane et al., 2005; Yamamoto, 2008).

Nustatyta, kad augalų cholinesterazė pasižymi dideliu giminingumu ACh. Molekulinės ir biocheminės savybės, lokalizacija membranoje rodo, kad šis fermentas yra būtent acetilcholinesterazė, o ne kitų cholinų esterazė. Fermentinės Ach hidrolizės mechanizmas panašus tiek augaluose, tiek gyvūnuose. Aktyviame fermento centre yra dvi sritys - anijoninė substrato jungimo sritis, kuri pritraukia teigiamą ACh azoto atomą ir katalizinė esterinė sritis, kurioje ACh hidrolizuojamas (Yamamoto et al., 2008; Tretyn & Kendrick, 1991).

2.5.3.2. AChE paplitimas augaliniame pasaulyje

Pirmą kartą augaluose AChE hidrolizinis aktyvumas buvo aptiktas kaip tik menturdumblio *Nitella sp.* ląstelėse (Dettbarn, 1962). Nustatyta, kad menturdumbliuose ACh hidrolizė vyksta 6,5 pmol/g/h, o gigantinio kalmaro aksonuose 40-60 pmoles/g/h. greičiu. Hidrolizinis AChE aktyvumas nustatytas ankštinių, kryžmažiedžių ir bulvinių šeimų augaluose (Fluck & Jaffe, 1974b). Miura su kolegomis, ištyręs 70 augalų rūšių, priklausančių 50 aukštesniųjų augalų šeimų ir 3 paparčių šeimas, neaptiko cholinesterazės aktyvumo tik 6

rūšyse (Miura et al., 1982). Smulkiažiedėje dumplūnėje (*Physalis minima L.*) nustatytas didžiausias esterazinis aktyvumas, kuris prilygo penktadaliui aktyvumo, būdingo gigantinio kalmaro aksonams (Gupta & Gupta, 1997). Tiriant vienaskilčius augalus, hidrolizinis aktyvumas rastas kukurūzų ir avižų daiguose (Fluck & Jaffe, 1974a; Tretny & Tretny, 1990), 22 česnakinių šeimos rūšių sėklose (Hadačová et al., 1983) ir kviečių grūduose (Tretny et al., 1986). Hidrolizinis aktyvumas buvo stebėtas ir trisdešimtyje samanų rūšių (Gupta et al., 2001), visose tirtose 10 dumblių rūšių (Gupta, et al, 1998).

Visuose tirtuose karpažolinių (*Euphorbiaceae*), bulvinių (*Solanaceae*) ir ankštinių (*Leguminosae*) šeimų augaluose AChE aktyvumas nustatytas, o daugumoje astrinių (*Asteraceae*) šeimos augalų - nenustatytas (Gupta & Gupta, 1997). Ir nors hidrolizinis AChE aktyvumas rastas daugiau nei 100 augalų audiniuose, 65 augalų rūšyse cholinesterazės aktyvumas neaptiktas (Hartmann & Gupta, 1989). AChE aktyvumas užregistruotas visuose tiek etioliuotų, tiek šviesoje augintų pomidorų daigų organuose. Didžiausias fermento kiekis buvo rastas sėklaskiltėse, mažiausias šaknyse (Wiśniewska & Tretny, 2003). Fermentas yra aptinkamas tiek ląstelės sienelėje, tiek plazminėje membranoje, tiek tirpioje frakcijoje. Tačiau pasiskirstymas frakcijose labai priklauso nuo daigų amžiaus. Dviejų dienų pupelių daiguose daugiau kaip 70% fermento nustatyta tirpioje frakcijoje, o keturių dienų daiguose šis kiekis sumažėja iki 30%. Atitinkamai padidėja aktyvumas ląstelių membranoje ir sienelėje (Lees & Thompson, 1975). Santykis tarp laisvos ir prisijungusios prie membranos AChE žirnių daiguose svyruoja tarp 1:1 and 1:2,5 (Vacková, 1984). Didžioji dalis nustatyto AChE aktyvumo kukurūzų šaknyse yra priskiriama ląstelių sienelėje esančiai AChE (Fluck & Jafe, 1974b). AChE buvo rasta žirnių chloroplastuose (Roshchina, 1988). Be to šviesoje augintų pomidorų daigų AChE aktyvumas buvo apie 70% didesnis nei to paties amžiaus etioliuotų pomidorų daigų aktyvumas. Yra manoma, kad AChE veikimas gali būti siejamas su fitochrominės sistemos veikla (Tretny & Kendrick, 1991). Naudojant genų inžinerijos metodus buvo parodyta, kad pirmojo tipo fitochromai kontroliuoja AChE aktyvumą, o antrojo tipo –

reguliuoja papildomos AChE sintezę (Wiśniewska & Tretyn, 2003). Laukinio tipo etioliuotuose pomidorų daiguose raudonoji šviesa (R) mažino AChE aktyvumą, o tolimoji raudonoji šviesa (FR) panaikino šį inhibuojantį raudonosios šviesos efektą (Wiśniewska & Tretyn, 1999).

Ryškus AChE aktyvumo padidėjimas stebimas gravitacinio stimuliavimo poveikyje (Momonoki, 1997). Šiluminio streso poveikyje AChE hidrolizinis aktyvumas padidėjo daugiau nei 4 kartus (Momonoki & Momonoki, 1992).

2.5.3.3. AChE inhibavimas

Alkaloidas neostigmino bromidas yra žinomas specifinis gyvūnų AChE inhibitorius, kuris jungiasi prie fermento katalitinio centro per kovalentines karbonilines jungtis, tokiu būdu blokuodamas hidrolizinį AChE aktyvumą. (Standaert, 1990). Iš pradžių fermentas ir inhibitorius sudaro nestabilų kompleksą, kuris pamažu tampa kovalentine jungtimi (Kishibayashi et al., 1994). Buvo parodyta, kad neostigmino bromidas inhibuoja ir kai kurių augalų AChE (Momonoki 1992; Ballal et al. 1993).

AChE gali egzistuoti tiek susijungusi su membrana, tiek laisvai citoplazmoje. Buvo parodyta, kad 0,1 mM neostigmino bromido blokuoja 50% laisvosios AChE ir 90% membraninės AChE žirnių šaknų ląstelėse (Vacková et al., 1984). Buvo nustatyta, kad tiek 0,01 mM, tiek 0,1 mM koncentracijos neostigmino bromidas inhibavo (atitinkamai 90% ir 93%) AChE aktyvumą pomidoruose (Wiśniewska & Tretyn, 2003)

AChE reaguoja su fosforo organiniais junginiais 10^{-1} - 10^{-6} molek. per min. greičiu, o fermento regeneracija vyksta labai lėtai. Inhibicijos procesas yra sąlygojamas fosforo organinių junginių negrįžtamu susijungimu su fermento aktyviame centre esančio serino hidroksiline grupe. Insekticidai ir pesticidai, kurie savo chemine prigimtimi yra fosforo organiniai junginiai, taip pat inhibuoja augalinę acetilcholinesterazę (Fletcher et al., 2004). Taip pat

nustatyta, kad NaCl 0,05 M – 0,9 M koncentracijų ribose taip pat stabdo šio fermento veiklą (Fluck R. A. & Jaffe M. J., 1974b).

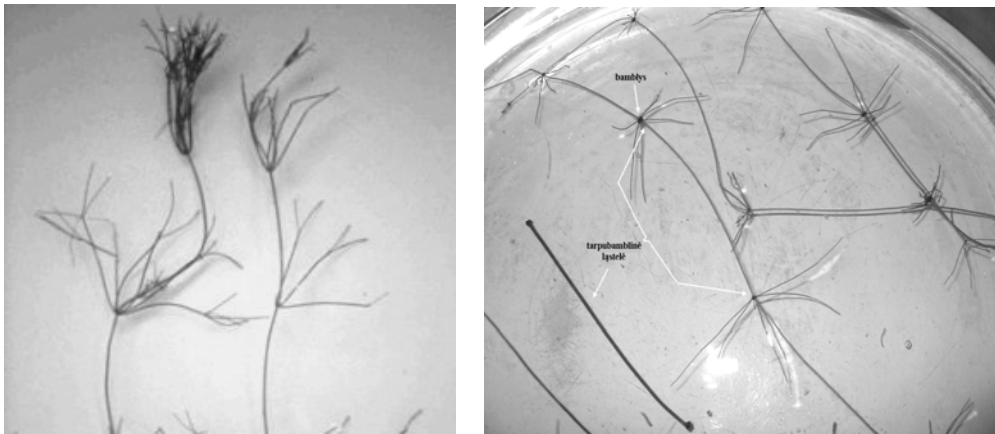
Kai kurių augalų AChE pasižymi prisotinančiąja substrato inhibicija (Fluck & Jaffe, 1975; Kasturi & Vasantharajan, 1976; Mansfield et al., 1978), kai kuriuose ji yra nebūdinga (K. Yamamoto et al., 2008).

Įvairių gyvūnų AChE yra naudojama kaip biomarkeris neurotoksinių teršalų poveikiui nustatyti. Nustatyta, kad kadmis yra vienas iš labiausiai AChE blokuojančių metalų (Gaitonde et al., 2006).

3. DARBO METODIKA

3.1. Tyrimų objektai

Eksperimentų metu buvo naudojamos menturdumblių *Nitellopsis obtusa* (Desvaux) J. Groves - žvaigždėtasis maurašakis ir *Nitella flexilis* (L.) C. Agardh - lankstusis menturdumblis – ląstelės (3.1 pav.). Menturdumbliai, dar kitaip vadinami maurabragūnai (Charophyta), pagal sistematinę padėtį priklauso Augalų (Plantae) karalystei, maurabragainių (Charophyceae) klasei, maurabragiečių (Charales) eilei, maurabraginių (Characeae) šeimai.



3.1 pav. Eksperimentų metu naudotos menturdumblių *Nitella flexilis* (L.) C. Agardh ir *Nitellopsis obtusa* (Desvaux) J. Grove ląstelės.

Menturdumbliai yra plačiai naudojami elektrofiziologiniuose tyrimuose, kadangi didelės ląstelės nesunku paruošti eksperimentui ir sujungti su stimuliavimo ir duomenų rinkimo sistema. Be to gana nesudėtinga išskirti ir tirti atskiras jonų pernašos sistemas (K^+ , Cl^- kanalus, H^+ -ATPazę) *in vivo* (Юрин et al., 1991). Menturdumbliai yra lengvai sužadinami. Didelės amplitudės VP, kurie trunka keletą sekundžių, yra lengviau užregistruojami ir analizuojami.

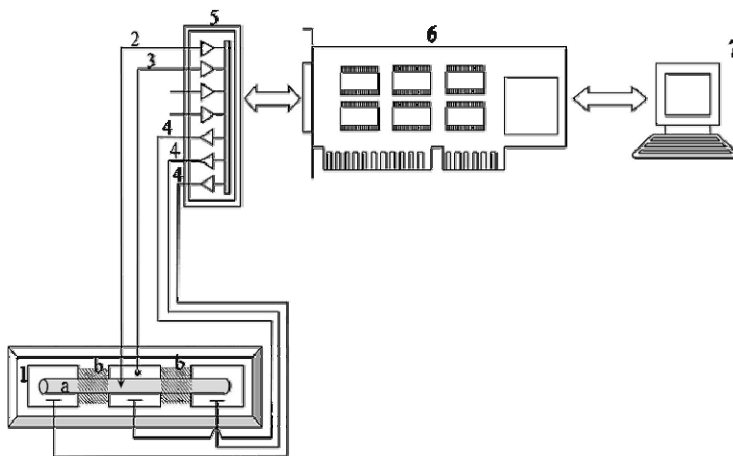
Menturdumblis *Nitellopsis obtusa* į laboratoriją lapkričio mėnesiais buvo atvežamas iš Siesarties ežero (Molėtų raj.) ir laikomas stikliniame akvariume pripildytame kambario temperatūros vandens nuo rudens iki vėlyvo pavasario.

Nitella flexilis ląstelės buvo auginamos laboratorinėmis sąlygomis $20\pm 1^\circ\text{C}$ temperatūros ir $0,1\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $0,4\text{ mM CaCl}_2$, 1 mM NaHCO_3 , $0,1\text{ mM Mg(NO}_3)_2$ sudėties terpėje, pH 7,2, užtikrinant pastovų apšvietimo ciklą - 12val. šviesa/12val.

Prieš eksperimentą buvo atkerpamos 2 arba 3 tarpubamblinė ląstelė, nuvalomos šoninės šakelės ir ląstelės talpinamos standartiniame APW tirpale ($0,1\text{ mM KCl}$, 1 mM NaCl , $0,1\text{ mM CaCl}_2$, $5\text{ mM Tris/Hepes/HCl}$, pH 7,2). Buvo naudojamos atskiros 4-7 cm ilgio ir 0,2 - 0,4 mm. skersmens *Nitella flexilis* ląstelės bei 10-15 cm. ilgio ir 0,6-0,8 mm. skersmens *Nitelopsis obtusa* ląstelės.

3.2. Elektrofiziologiniai matavimai.

Elektrofiziologinių tyrimų metu buvo naudojama standartinė mikroelektrocinė technika, standartinės biopotencialų matavimų procedūros ir fiksuotos įtampos metodas.



3.2 pav. Kompiuterizuota bioelektrinių signalų registravimo sistema. 1 – kamera, kurioje patalpinama tiriamoji ląstelė (a – ląstelė, b – vazelino tilteliai), 2 – matuojantysis mikroelektrodas, 3 – indiferentinis elektrodas, 4 – išoriniai stimuliuojantys elektrodai, 5 – daugiakanalis bioelektrinio signalo stiprintuvo blokas, 6 – universali įvedimo / išvedimo plokštė, 7 – kompiuteris.

Buvo matuoti bendrieji elektrofiziologiniai ląstelių parametrai: ramybės potencialas (RP), membraninis potencialas (MP), veikimo potencialai (VP), membranos varža (R_m), didžiausia VP vertė, VP amplitudė (skirtumas tarp MP

vertės prieš stimulą ir maksimalios VP vertės), VP trukmė. Greitosios repoliarizacijos įvertinimui buvo skaičiuojamas maksimalus repoliarizacijos potencialo kitimo greitis dE/dt . Repoliarizacijos greičio priklausomybei nuo potencialo nustatyti buvo sudaromi faziniai portretai.

Eksperimentuose naudotoje kompiuterizuotoje bioelektrinių signalų registravimo sistemoje (3.2 pav.) galime išskirti keletą pagrindinių dalių. Tiriamosios ląstelės buvo talpinamos specialioje trijų dalių organinio stiklo kameroje, užpildytoje standartiniu APW tirpalu. Centrinė kameros dalis, į kurią buvo pilami tiriamieji tirpalai, buvo izoliuojama vazelino tilteliais. Tokiu būdu buvo užtikrinamas tolydus srovės pratekėjimas per membraną. Centrinės kameros ilgis *Nitella flexilis* ląstelių tyrimuose buvo 5 mm., *Nitellopsis obtusa* - 20mm. Ląstelės gyvybingumo palaikymui buvo užtikrinamas pastovus ($1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ greičiu) tiriamų tirpalų pritekėjimas ir nutekėjimas.

Membraninio potencialo matavimui naudojamas stiklinis matuojamasis mikroelektrodas, pagamintas naudojant stiklinius borosilikatinius kapiliarus (Kwik-Fil™, World Precision Instruments Inc., USA). Mikroelektrodo galiuko diametras 1 – 3 μm , varža 8 – 20 $\text{M}\Omega$, talpumas siekia 1 – 2 pF, elektrodo galiuko potencialas gali siekti iki 10 mV. Mikroelektrodas užpildomas 3 M KCl tirpalu ir prijungiamas prie registravimo sistemos per platinos – kalomelio (Hg/HgCl) standartinį pusiauelementą. Matuojantysis elektrodas (2) mikromanipulatoriaus pagalba įvedamas į tarpubamblio ląstelę. Indiferentinis elektrodas (3), kurio galiuko diametras apie 100 μm talpinamas kameroje šalia ląstelės. Elektrodas yra užpildytas 2,5% agar agare ištirpintu 3 M KCl tirpalu.

Srovė per centrinėje kameroje esančią ląstelės membraną buvo leidžiama išorinių chlorsidabrinų (Ag/AgCl₂) elektrodų pagalba (4). Elektriniai signalai prieš paduodant juos į universalią kompiuterinę signalo įvedimo/išvedimo plokštę (6) iki reikiamo lygio buvo stiprinami instrumentinių diferencinių stiprintuvų WPI DAM50 (įėjimo varža - $10^{12}\Omega$, įėjimo srovės nuotėkis - 50pA, stiprinimas –20x) (5) pagalba. Analoginiai signalai buvo keičiami į skaitmeninę formą analoginiu/ skaitmeniniu keitikliu ADS7805P (Burr-Brown

Corporation, 16 bitų). Minimalus išrinkimo laikas - 1 μ s. Skaitmeniniai duomenys kaupiami kompiuterio (7) atmintyje tolimesnei analizei.

Varžos matavimui buvo registruojami elektrinių potencialų skirtumo pokyčiai, ląstelę paveikus ikislenkstinais stačiakampiais 0,2 – 2 μ A dydžio bei 1-2 s trukmės depoliarizuojančios ar hiperpoliarizuojančios srovės impulsais. Gaunamas potencialų skirtumo pokytis ir naudojantis formule (1) apskaičiuojama specifinė membranos varža - R ($k\Omega/cm^2$).

$$R = \frac{\Delta\psi}{I} \pi dl \quad (1)$$

l- ląstelės ilgis matavimo kameroje, cm; d- ląstelės skersmuo, cm; $\Delta\psi$ – membranos potencialo pokytis, mV; I – srovės stiprumas, μ A.

Veikimo potencialo sukėlimui išorinių chlorsidabrinųjų ($Ag/AgCl_2$) elektrodų pagalba į centrinėje kameroje esančią ląstelės membraną buvo paduodami viršslenkstiniai (100 – 200 ms trukmės ir 15 μ A/cm² srovės stiprumo) stačiakampio formos impulsai.

Atskirų transportinių sistemų joninių srovių tyrimams buvo naudojama fiksuotos įtampos metodika. Kalio kanalų veiklos tyrimui buvo sudaromos *Nitella flexilis* plazmalemos voltamperinės charakteristikos. Yra nustatyta, kad kalio įeinančios (K_{in}) ir išeinančios srovės (K_{out}) kanalai atsidaro, esant skirtingam membraniniam potencialui: K_{out} - nuo -40 iki -20 mV, K_{in} – nuo -150 iki -180 mV (Sokolik & Yurin, 1986). Mūsų eksperimentuose potencialas buvo fiksuojamas atitinkamai ties -40 mV ir ties -160 mV. Nenorint sukelti nuo potencialo priklausomų membranos laidumo pokyčių, kas 20mV buvo paduodami trumpi 30 ms trukmės laiptiškai didėjantys hiperpoliarizuojančios arba depoliarizuojančios srovės stačiakampiai impulsai. Atsakai buvo registruojami įsimenančiojo oscilografo C8-17 ekrane. Oscilogramose užregistruotų joninių srovių dydžiai ir atitinkamai paduotos įtampos vertės buvo naudojamos voltamperinių charakteristikų sudarymui.

Nitella flexilis H⁺-ATPazės aktyvumo tyrimui potencialas buvo fiksuojamas prie -160 mV tamsoje (kai protonų siurblys inhibuotas) ir šviesoje (šviesai maksimaliai aktyvavus protonų siurblių). Skirtumas tarp tamsoje ir

šviesoje užregistruotų voltamperinių charakteristikų ir buvo laikomas H⁺-ATFazės voltamperine charakteristika.

Chlorinių kanalų srovių sužadinimo metu tyrimuose buvo naudojamos *Nitellopsis obtusa* ląstelės. Potencialas buvo fiksuojamas ir laikomas stacionarioje būsenoje prie -180 mV. Fiksacijos lygis buvo didinamas kas 20 mV (nuo -160 mV iki +60 mV) depoliarizuojančios srovės impulsais, trunkančiais 25 sekundes. Šio laiko pakanka Cl⁻ kanalų aktyvavimui ir inaktyvacijai. Cl⁻ srovės matavimas atlikti buvo naudojama įtampos fiksavimo programinė įranga Clampex 10.2, o gautų duomenų pradinei analizei - programinė įranga Clampfit 10.2.

Įtampos reikšmė, prie kurios buvo užregistruotas pirmasis ląstelės atsakas, buvo laikoma ląstelės sužadinimo slenksčiu. Užregistravus chlorinę srovę ties slenkstine įtampa, fiksaacijos lygis kas 5 minutės buvo laiptiškai vis didinamas dvidešimčia milivoltų. Buvo vertinama Cl⁻ srovės aktyvacijos latencija -- laiko tarpas nuo stimulo įjungimo iki atsako atsiradimo ir Cl⁻ srovės inaktyvacijos trukmė -- laiko tarpas per kurį srovė nuo maksimalios reikšmės pasiekia nulinę vertę. Prie atitinkamos įtampos išmatavus chlorinės srovės maksimumus, sudaroma voltamperinė charakteristika. Pagal Cl⁻ srovės voltamperinę charakteristiką nustatomas Cl⁻ srovės reversijos potencialas (potencialo reikšmė, prie kurios Cl⁻ srovė lygi nuliui).

Registruodami srovių voltamperines charakteristikas sužadinimo metu, diapazone nuo -20 iki 40mV galime išskirti dvi, besiskiriančias generavimo laiku ir dydžiu, sroves. Praėjus maždaug 100ms nuo stimulo pateikimo laiko stebime mažos amplitudės Ca²⁺ srovę, kuri geriausiai atsiskiria nuo vėlesnės ir didesnės amplitudės Cl⁻ srovės ties 20 mV. Todėl ACh poveikis Ca²⁺ srovei buvo vertinamas ties šia įtampa.

3.3. Eksperimentų eiga

Prieš tyrimus antra arba trečia tarpubamblinė ląstelė buvo atskiriamos nuo talomo. Metabolinių ir transportinių procesų stabilumo užtikrinimui 20 valandų prieš eksperimentą ląstelės buvo talpinamos kontroliniame APW

tirpale. Eksperimentų metu buvo palaikomi pastovūs tirpalų pH 7,2, temperatūra $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, ir apšvietimas ($500\pm 10\text{Lx}$, dienos šviesa).

Eksperimentai buvo atliekami praėjus valandai po matuojamojo elektrodo įvedimo į ląstelę. Tokiu būdu buvo užtikrinama membraninio potencialo stabilizacija. Pagal ramybės potencialo vertę ląstelės buvo skirstomos į žemos energetinės būsenos ir H^+ stadijos grupes, gauti rezultatai taip pat buvo grupuojami pagal ramybės potencialą.

Buvo atlikti acetilcholino poveikio menturdumblių *Nitellopsis obtusa* bei *Nitella flexilis* elektrinėms charakteristikoms ramybės būsenoje tyrimai. Matavome ramybės potencialą ir bendrąjį membranos laidumą skirtingos koncentracijos (0,01 - 5 mM) acetilcholino chlorido tirpaluose. Matavimai buvo vykdomi praėjus valandai po tirpalų pakeitimo.

Veikimo potencialai buvo sukelti viršslenkstinių stačiakampių elektros impulsų pagalba, stimuliuojant ląstelę 6 kartus, 5 minučių laiko intervalais, prieš pat veikimo potencialo generaciją buvo matuojama specifinė membranos varža. Tirpalai buvo keičiami po paskutinės repoliarizacijos membraniniam potencialui grįžus į pradinį lygį (dažniausiai po valandos).

Tiriant *Nitellopsis obtusa* ląstelių chlorinės srovės, buvo nustatomas membranos sužadavimo slenkstis. Toliau chlorinės srovės maksimumas prie skirtingų įtampų buvo fiksuojamas kas 5 minutės- tokiu pačiu laiko intervalu, koku buvo sukelti veikimo potencialai. Tirpalai buvo keičiami pagal tokią pačią schemą kaip ir VP tyrimuose.

K^+ kanalų voltamperinių charakteristikų registravimui *Nitella flexilis* ląstelės 3 paras buvo laikomos tamsoje, tam, kad būtų pilnai inhibuojamas protonų siurblys ir ląstelių ramybės potencialas atitiktų K^+ pusiausvyrinį potencialą. K^+ kanalų tyrimai taip pat buvo atliekami tamsoje, KAPW tirpaluose (K^+ koncentracija padidinta nuo 0,1 iki 1 mM), praėjus valandai po elektrodo įvedimo į ląstelę.

H^+ -ATPazės tyrimuose buvo naudojamos 1 - 2 dienas tamsoje adaptuotos *Nitella flexilis* ląstelės, kurioms buvo galima sukelti fotoindukcinę reakciją. (Šios reakcijos metu ląstelės dėl šviesos poveikio pereina į hiperpolarizuotą

būseną (Юрин et al., 1991)). Sukėlus fotoindukcinę reakciją APW tirpale ir sudarius voltamperines charakteristikas, ląstelė pusvalandžiui vėl buvo gražinama į tamsą o, nusistovėjus elektrofiziologinei pusiausvyrai, buvo užpilamas 5 mM ACh tirpalas. Praėjus pusvalandžiui, vėl buvo sukeliama fotoindukcinė reakcija 5 mM ACh tirpale ir registruojamos voltamperinės charakteristikos.

3.4. Eksperimentuose naudotos medžiagos ir tirpalai

APW tirpalas (0,1 mM KCl, 1 mM NaCl, 0,1 mM CaCl₂, 5 mM Tris/Hepes/HCl, ROTH, pH 7,2) buvo naudojamas kaip kontrolinis tirpalas, ir tirpalas kurio pagrindu skiedimo būdu buvo ruošiami reikiamos koncentracijos tiriamieji tirpalai.

ACh + APW, pH 7,2 (Acetilcholino chloridas C₇H₁₆ClNO₂, Sigma-Aldrich)

50 μM DCCD + APW, pH 7,2 (dicikloksilcarbadiimidis C₁₃H₂₂N₂, Sigma-Aldrich, buvo tirpintas 2 ml etanolio)

20 μM CdCl₂ + APW, pH 7,2 Kadmio chloridas CdCl₂, ROTH

NB + APW, pH 7,2 (Neostigmino bromidas C₁₂H₁₉N₂O₂Br, Sigma-Aldrich)

Nikotinas+ APW, pH 7,2 (Nikotino C₁₀H₁₄N₂ tirpalas etanolyje Sigma-Aldrich)

3.5. Naudotos programos ir statistiniai metodai

Duomenų analizė atlikta naudojant OriginPro 7.5, STATISTICA 6.0, Microsoft Office Excel 2003 kompiuterinės programos. Duomenų pasiskirstymo normalingumui nustatyti buvo naudojamas Shapiro-Wilk W testas. Duomenų skirtumų patikimumui įvertinti buvo naudojami porinis ir neporinis Student t-testai. Rezultatai pateikti kaip vidurkis ± standartinė paklaida.

4. REZULTATAI

Siekiant nustatyti acetilcholino poveikį menturdumblių plazminės membranos pernašos sistemų funkcionavimui ir veikimo potencialų generavimo dinamikai, buvo iširtos 159 *Nitellopsis obtusa* ir 37 *Nitella flexilis* ląstelės. Darbas buvo atliekamas naudojant standartinę mikroelektrodinę techniką, standartines biopotencialų matavimų procedūras ir fiksuotos įtampos metodą. Buvo atlikti ACh, nikotino, ir acetilcholinesterazės blokatorių poveikio menturdumblių membranos potencialo elektrogenezei tyrimai.

4.1. Acetilcolino poveikis membranos laidumui

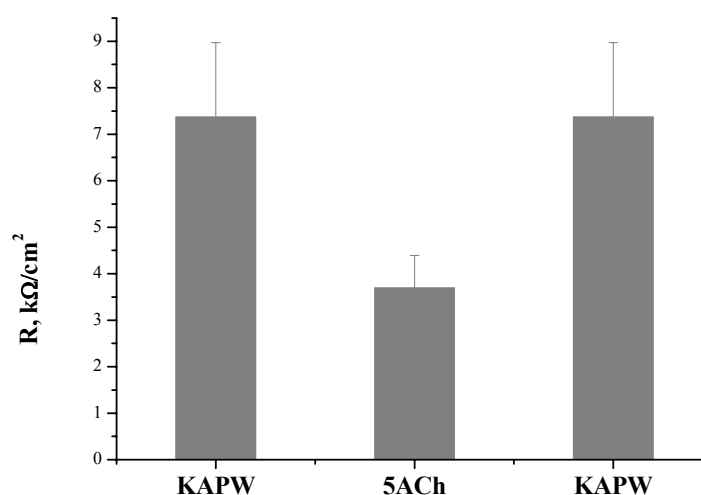
Acetilcholino poveikis menturdumblių membranos laidumui buvo vertinamas viduląstelinės mikroelektrokinės biopotencialų matavimo technikos pagalba, matuojant membranos varžą. Buvo tirtas 0,001-5 mM ACh koncentracijų poveikis. Nustatėme, kad tirtoje *Nitellopsis obtusa* ląstelių populiacijoje nebuvo stebimas toksinis ACh poveikis. Visos ląstelės išgyveno 0,1 mM, 1 mM ir 5 mM koncentracijų ACh tirpaluose 7 dienas. Nebuvo stebimi nei citoplazmos judėjimo greičio pokyčiai, nei ląstelių turgoro sumažėjimas.

Tyrimų rezultatai parodė, kad tik didelės koncentracijos ACh tirpalai statistiškai patikimai ($p < 0,002$, $n=10$) mažina tiek ląstelių *Nitella flexilis*, tiek *Nitellopsis obtusa* ląstelių varžą (**4.1 lentelė**).

4.1 lentelė. 1 mM ir 5 mM ACh poveikis *Nitella flexilis* ir *Nitellopsis obtusa* ląstelių varžai.

Ląstelė Tirpalas	Ląstelių varža R, k Ω /cm ²	
	<i>Nitella flexilis</i>	<i>Nitellopsis obtusa</i>
APW	22,3 \pm 2,2	23,0 \pm 3,9
1 mM ACh	17,6 \pm 2,0	17,8 \pm 3,0
5 mM ACh	11,7 \pm 2,3	13,5 \pm 2,5

ACh poveikis buvo grįžtamas, t.y. pašalinus tiriamąjį tirpalą iš aplinkos ląstelių varža vėl pasiekė pradines reikšmes. Taigi 1 ir 5 mM koncentracijos ACh tirpalai sąlygojo reikšmingą menturdumblių ląstelių laidumo padidėjimą. Dėl 1 and 5 mM ACh poveikio *Nitella flexilis* ląstelių membranos laidumas padidėjo atitinkamai 20,8% ir 47,3%, o *Nitellopsis obtusa* ląstelių – atitinkamai 22,5% ir 41,3%. Padidinus išorinio tirpalo K^+ koncentraciją 10 kartų (KAPW tirpalas), išliko ta pati tendencija (**4.1 pav.**). *Nitella flexilis* ląstelių membranos laidumas dėl 5 mM ACh poveikio KAPW tirpale padidėjo 49,9%.

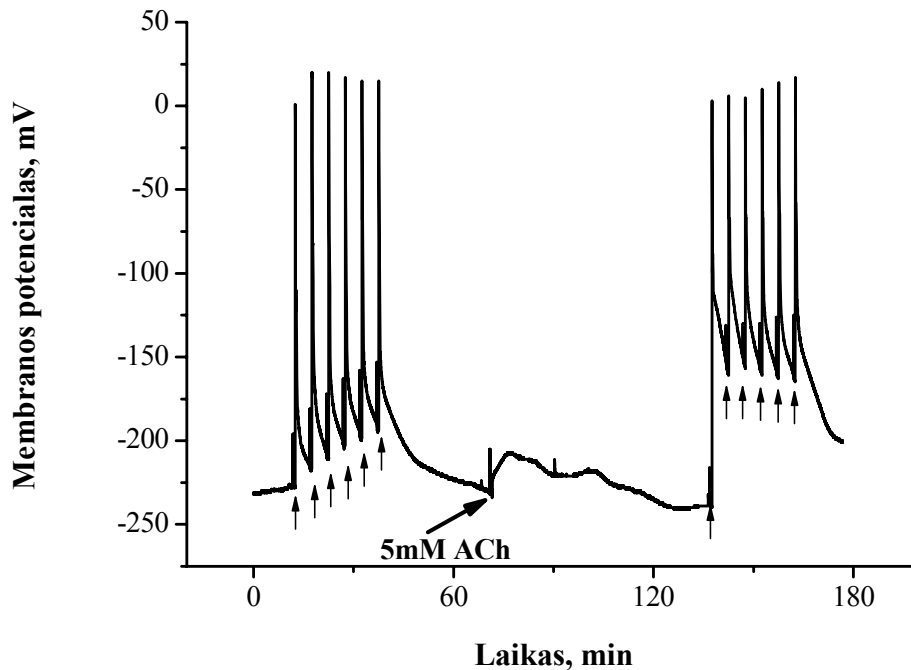


4.1 pav. 5 mM ACh poveikis *Nitella flexilis* ląstelių varžai (R , $k\Omega/cm^2$) KAPW tirpale (K^+ koncentraciją 10 kartų didesnė nei APW tirpale).

4.2. Acetilcolino poveikis membranos ramybės potencialui.

Acetilcholinas (1-5 mM ACh) pasižymėjo depoliarizuojančiu poveikiu. Tirtųjų menturdumblių ramybės potencialo depoliarizacija prasidėjo iš karto, pakeitus tirpalus. Praėjus vidutiniškai 12 min., ramybės potencialas pasiekdavo stacionarią būseną. 1 mM ACh tirpalas *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranas nuo $-225,3 \pm 5,6$ mV statistikai patikimai depoliarizavo $12,2 \pm 2,1$ mV, o 5 mM ACh – nuo $-223,8 \pm 4,1$ mV depoliarizavo $30,6 \pm 3,9$ mV. ($p < 0,0001$, $n=8$).

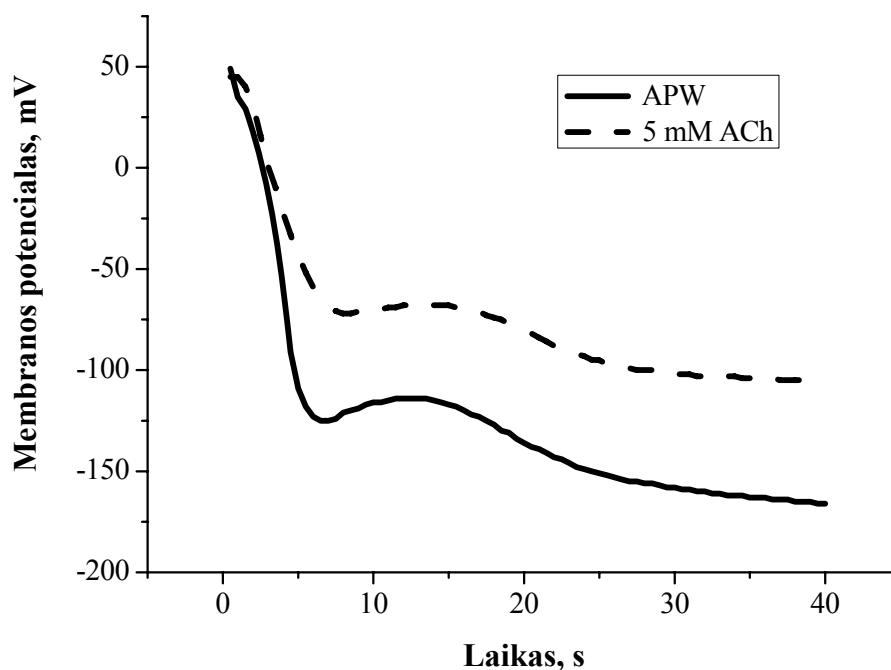
Tačiau daugumoje tirtų ląstelių maždaug po 25 minučių prasidėjo palaipsninis hiperpolarizacijos procesas ir membranos potencialas valandos bėgyje pasiekdavo APW lygį. Ši membranos potencialo kitimo dinamika atsispindi 4.2 paveiksle.



4.2 pav. Tipinis membranos potencialo kitimo VP serijų generavimo metu APW ir 5 mM ACh tirpaluose pavyzdys. VP serijos trukmė 30 min. Tarpas tarp atskirų VP, pažymėtų vertikaliomis rodyklėmis, 5 min 5 mM ACh tirpalas užpiltas praėjus 30 min po VP serijos APW (žymi pasvirusi rodyklė). Ląstelė išbuvo 5 mM ACh tirpale 1 val iki stimuliavimo.

4.3. Acetilcholino poveikis vienetiniam veikimo potencialui.

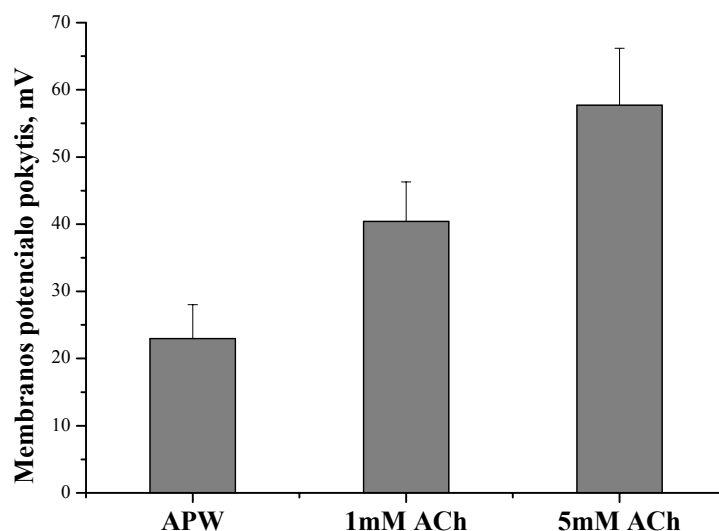
Labiausiai ACh poveikis buvo stebimas elektriškai iššaukus VP. Palyginus vienetinius veikimo potencialus APW ir 5 mM ACh tirpaluose buvo stebimi skirtumai VP repoliarizacijos fazėje, t.y. ACh ilgino repoliarizacijos proceso trukmę (4.3 pav.).



4.3 pav. Tipinis 40 s trukmės VP repoliarizacijos proceso APW (juoda linija) ir 5 mM ACh (punkttyrinė linija) tirpaluose pavyzdys.

Augalų veikimo potencialuose galime išskirti greitąją ir lėtąją repoliarizacijos dalis. Tam, kad įvertintume ACh poveikį greitajai repoliarizacijai, skaičiavome didžiausią membranos potencialo kitimo greitį. Buvo nustatyta, kad APW tirpale maksimalus repoliarizacijos greitis buvo $63,2 \pm 8,2$ mV/s, o 5 mM ACh tirpale - $46,8 \pm 7,4$ mV/s. Dėl 5 mM ACh poveikio maksimalus repoliarizacijos greitis sulėtėjo 26%.

Lėtosios repoliarizacijos įvertinimui buvo fiksuojama membranos potencialo vertė, praėjus 5 minutėms po VP generacijos. Buvo pastebėta, kad ši vertė dėl ACh poveikio ženkliai pasikeitė ($p < 0,00001$, $n = 10$). Membranos potencialo reikšmių prieš stimuliaciją ir praėjus 5 min. po VP generacijos skirtumas dėl ACh poveikio išaugo 76% 1 mM ACh ir 151% 5 mM ACh tirpaluose (**4.4 pav.**). Taigi praėjus 5 min po VP generacijos, visos tirtos ląstelės ACh tirpaluose liko labiau depoliarizuotoje būsenoje. Kadangi ACh veikia atskiro VP repoliarizacijos procesą, buvo nuspręsta iširti kaip ACh veikia membranos potencialo dinamiką, sukėlus VP seriją.



4.4 pav. Acetilcholino poveikis lėtajai repoliarizacijai (membranos potencialo reikšmių prieš stimuliaciją ir praėjus 5 min. po VP generacijos skirtumui).

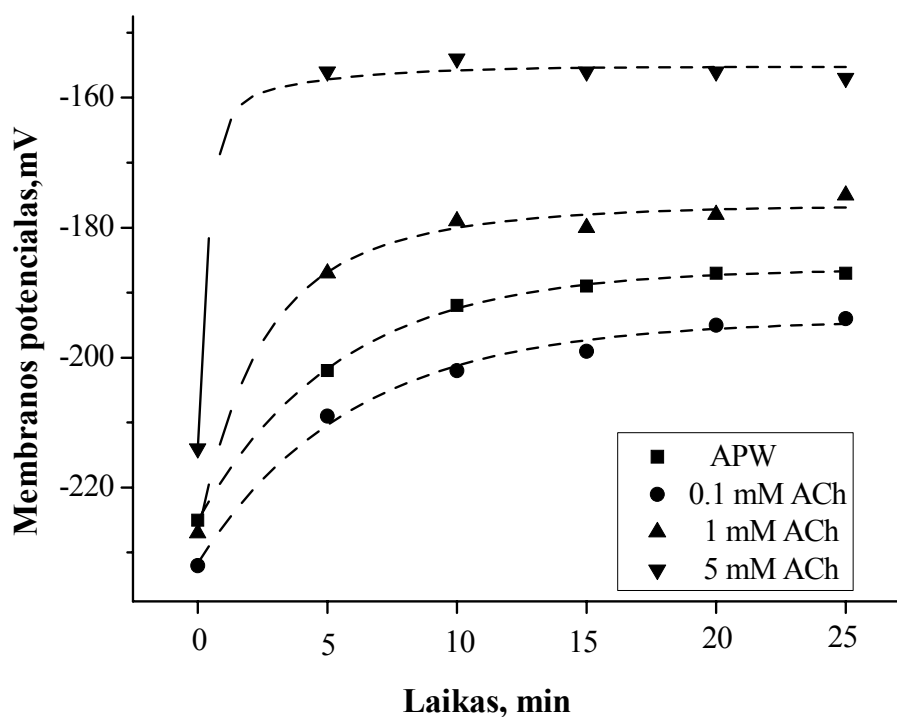
4.4. Acetilcholino poveikis membranos potencialo dinamikai veikimo potencialų serijos metu.

Tiriant įvairių cheminių medžiagų poveikį menturdumblių *Nitellopsis obtusa* ląstelių elektriniams parametrams, buvo stebima šių medžiagų sąlygota membranų depoliarizacija, kuri dažnai sukelia ląstelių spontaninį aktyvumą. Spontaninio aktyvumo metu buvo registruojama veikimo potencialo serija, o laiko intervalas tarp šių VP vidutiniškai trukdavo 4 - 5 minutes. Jei ląstelės yra taip vadinamoje “pompos” būsenoje (ląstelių ramybės potencialas yra neigiamesnis nei -220 mV), ACh sąlygota membranos potencialo depoliarizacija nepasiekia veikimo potencialo sužadavimo slenksčio vertės (-100 mV). Todėl buvo nuspręsta elektrinių impulsų pagalba sukelti VP seriją ir iširti membraninio potencialo dinamiką bei atkartojamumą šios serijos metu standartinėse sąlygose, ir ląsteles paveikus ACh tirpalu. Kontroliniame tirpale, kas 5 minutes sukėlus VP, buvo stebimas membranos potencialo dinamikos atkartojamumas. Ši dinamika gali būti vertinama kaip repoliarizacijos lygio kitimas ir aproksimuojama eksponente (punktyrinė linija **4.5** paveiksle)

$$y = y_0 + A_1 * (1 - \exp(-x/t_1)),$$

kur y_0 yra membranos potencialas prieš stimuliaciją, A_1 aprašo membraninio potencialo kitimo ribas, t_1 yra laiko konstanta (**4.5 pav.**).

Buvo nustatyta, kad APW tirpale laiko konstanta yra $5,5 \pm 1,5$ min. Tyrinėdami ACh poveikį pastebėjome, kad visose tirtose ląstelėse VP serijos metu ACh keičia membranos potencialo dinamiką. 1 mM ACh mažina laiko konstantos vertę iki $1,5 \pm 0,65$ min., 5 mM ACh iki $0,9 \pm 0,35$ min. 0,1 mM ACh tirpalo poveikis nebuvo statistiškai reikšmingas.



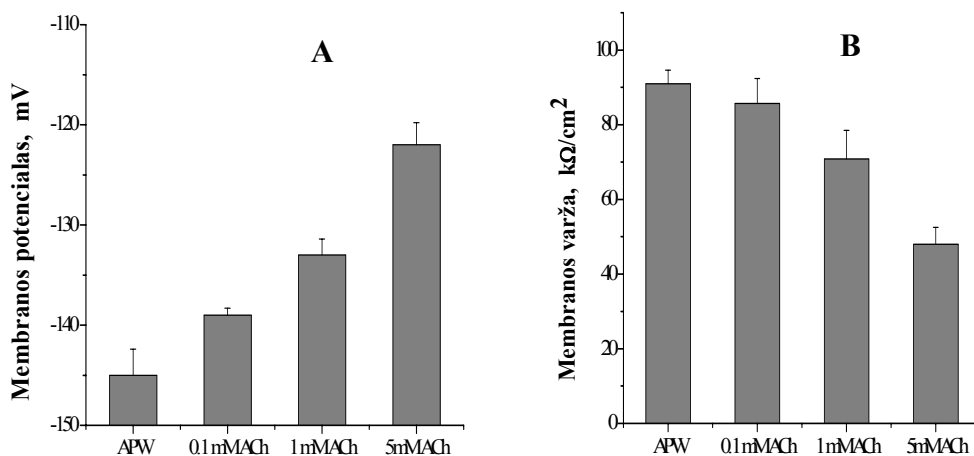
4.5 pav. ACh poveikis membranos potencialo atsistatymo dinamikai VP serijos metu ($n=6$). Ląstelės buvo stimuliuojamos 6 kartus kas 5 minutės (žr. **4.2 pav.**). Prieš kiekvieną stimulą registruojama membranos potencialo vertė atspindi lėtosios repolarizacijos lygį. Punktyrinės linijos – pritaikyto eksponentinio modelio kreivės.

Kadangi VP serijos generavimo metu po penktojo stimulo membranos potencialas pasiekia stacionarią (plato) būseną, vertiname membranos

potencialo reikšmę prieš šeštąjį stimulą ir nustatėme statistiškai patikimus skirtumus: APW tirpale membranos potencialas buvo $-192 \pm 4,2$ mV, 1mM ACh tirpale $-175 \pm 5,1$ mV, 5 mM ACh $-157 \pm 8,3$ mV ($p > 0,001$, $n=6$). Pastarajame tirpale MP pasiekė šią vertę jau po pirmo VP (4.5 pav.).

4.5 Acetilcholino poveikis membranos potencialams, užblokavus metabolinę komponentę.

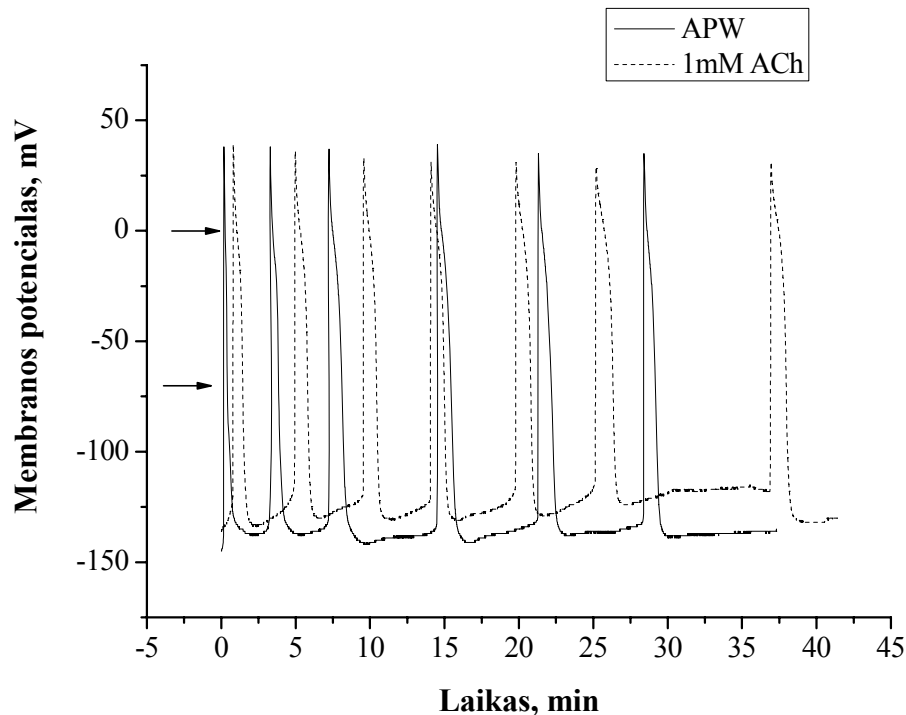
Viena iš galimų membranos potencialo depoliarizacijos priežasčių gali būti H^+ -ATPazės laidumo sumažėjimas. Norėdami ištirti ACh poveikį difuzinei membraninio potencialo dedamajai, pabandėme farmakologiškai užblokuoti H^+ -ATPazę. Yra nustatyta, kad 50 μ M DCCD koncentracija yra pakankama pilnai blokuoti protonų siurblių, o K^+ kanalų šis inhibitorius neveikia (Sokolik & Yurin, 1986). Negrįžtama membraninio potencialo depoliarizacija ir laidumo sumažėjimas buvo H^+ -ATPazės užblokavimo indikatorius. Ląstelės atsiduria taip vadinamoje K^+ būsenoje (Tester, 1990). Paveikus ląsteles 50 μ M DCCD tirpalu, RP depoliarizavosi nuo $-230,3 \pm 4,6$ mV iki $-145 \pm 2,6$ mV, o varža padidėjo nuo $26,9 \pm 1,9$ $k\Omega/cm^2$ iki $91 \pm 3,6$ $k\Omega/cm^2$. Dėl ACh poveikio membraninis potencialas dar labiau depoliarizavosi, o laidumas padidėjo (4.6 pav.).



4.6 pav. Acetilcholino poveikis membranos potencialui (A) ir laidumui (B) 50 μ M DCCD tirpalu užblokavus H^+ -ATPazę.

Acetilcholino poveikis tiek membranos potencialui, tiek laidumui buvo grįžtamas.

Daugumoje tirtų ląstelių (8 iš 12) po H^+ -ATPazės blokavimo buvo stebimas spontaninis ląstelių aktyvumas. Buvo pastebėta, kad dėl ACh poveikio veikimo potencialai išplatėja (**4.7 pav.** išplatėjimas vertintas ties 0 ir 70 mV).



4.7 pav. Tipinis ACh poveikio spontaniniam ląstelių aktyvumui po H^+ -ATPazės inhibicijos pavyzdys. Protonų siurblio blokavimui ląstelės 1 val. buvo veikiamos 50 μ M DCCD tirpalu. Po to ląstelės 1valandą buvo atplaunamos APW tirpalu ir veikiamos ACh. Paveiksle parodyti paskutiniai spontaniniai VP APW tirpale (juoda linija) ir spontaninis aktyvumas iš karto užpylus 1 mM ACh tirpalą (punktyrinė linija).

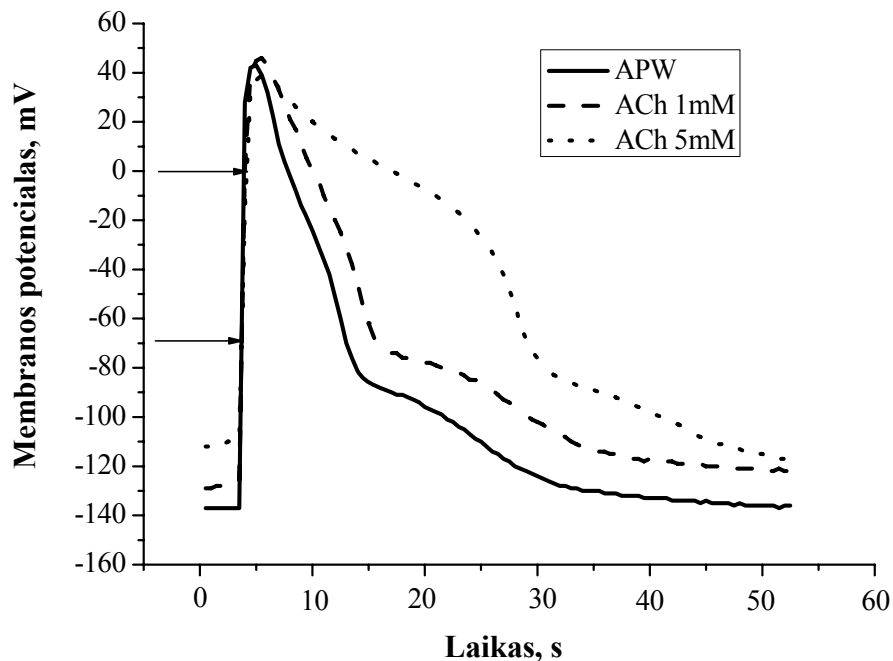
VP buvo platesni nepriklausomai nuo to, ar tai buvo spontaninio aktyvumo VP, ar ląstelės buvo sužadintos elektriniais impulsais. Tačiau išplatėjimas didėjo, didėjant ACh koncentracijai (**4.1 lentelė**).

Be to, po atplovimo tas pačias ląsteles (n=3) dar kartą paveikus ACh tirpalu, vėl buvo stebimas toks pats poveikis veikimo potencialams.

4.1 lentelė. 1 mM ir 5 mM ACh poveikis *Nitellopsis obtusa* ląstelių VP pločiui, 50 μ M DCCD tirpalu užblokavus metabolinę membraninio potencialo komponentę.

Tirpalas \ Potencialas	VP pločio pokytis (kartais)	
	0 mV	70 mV
1 mM ACh	1,9 \pm 0,5	1,7 \pm 0,2
5 mM ACh	2,6 \pm 0,5	2,7 \pm 0,4

Taigi ląstelėse, kurių membraninį potencialą apsprendžia difuziniai procesai ir joninių kanalų veikla, ACh dar labiau lėtina VP repoliarizaciją (**4.8 pav.**).

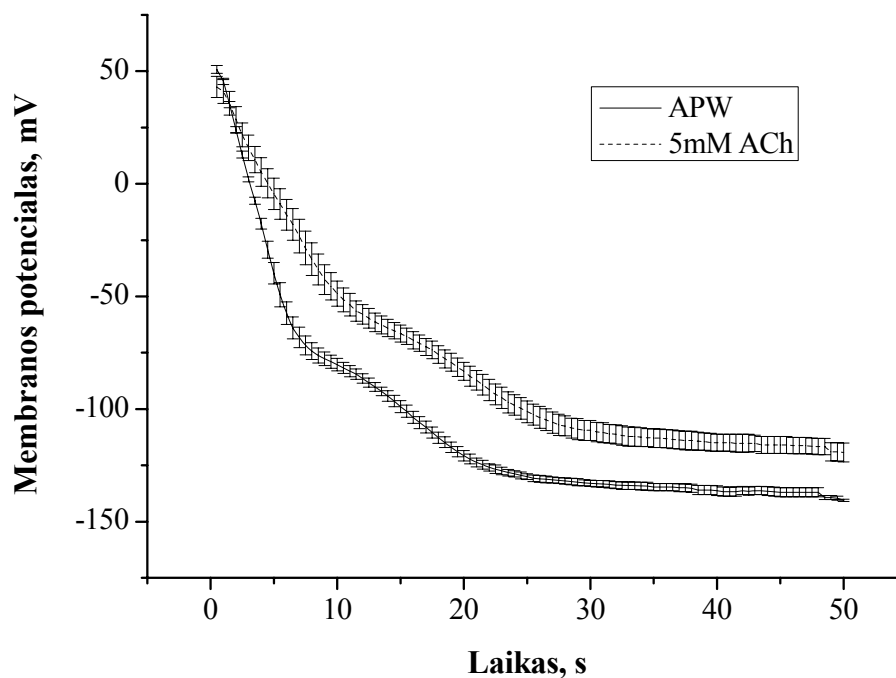


4.8 pav. Tipinis ACh poveikio antrajam VP pavyzdys, 50 μ M DCCD tirpalu užblokavus metabolinę membraninio potencialo komponentę.

4.6 Acetilcholino poveikis ląstelių, natūraliai esančių K^+ būsenoje, veikimo potencialams.

Natūraliomis sąlygomis gyvybingos *Nitellopsis obtusa* ląstelės retai būna stabilioje K^+ būsenoje (RP ~ -160 mV) ilgą laiką. Dažnai paros bėgyje įvyksta H^+ -ATPazės aktyvacija, RP pasiekia -220 mV ir neigiamesnį potencialą. Tačiau iš visų tirtų 159 ląstelių, 5 ląstelės, esančias stabilioje K^+ būsenoje, pavyko užregistruoti ir iširti ACh poveikį jų membraniniams potencialams. APW tirpale šių ląstelių RP buvo $161,2 \pm 3,1$ mV. Užpylus 5 mM ACh prasidėdavo palaipsninė ląstelių depoliarizacija. Membraniniam potencialui pasiekus $-122,5 \pm 2,8$ mV, prasidėdavo spontaninis ląstelių aktyvumas.

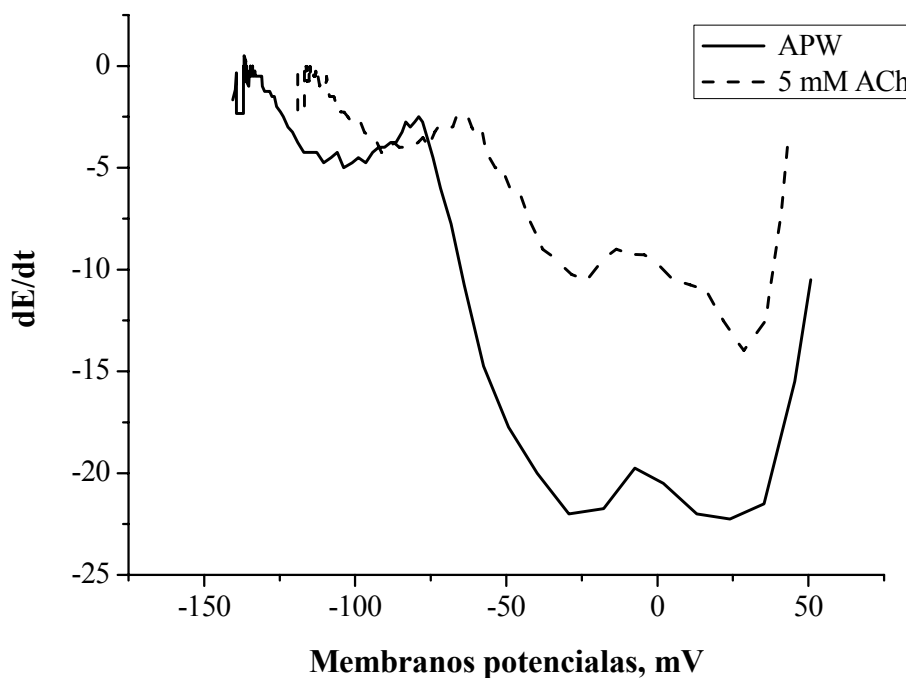
Palyginus antruosius VP APW ir 5 mM ACh tirpaluose, buvo pastebėtas ženklus VP repoliarizacijos proceso pailgėjimas dėl ACh poveikio. (4.9 pav.)



4.9 pav. Antro VP 50s trunkančios repoliarizacijos vidurkis ir pasikliautiniai intervalai APW ir 5 mM ACh tirpaluose (n=5).

Įvertinus VP plotį ties 0 mV ir 70 mV nustatyta, kad 5 mM ACh tirpale repoliarizacija sulėtėjo atitinkamai $1,5 \pm 0,2$ ir $2,1 \pm 0,3$ karto (**4.9 pav.**).

Maksimalus membranos potencialo kitimo greitis nuo $24,8 \pm 0,8$ mV/s APW tirpale sumažėjo iki $14,4 \pm 1$ mV/s 5 mM ACh tirpale. ACh poveikis buvo grįžtamas.



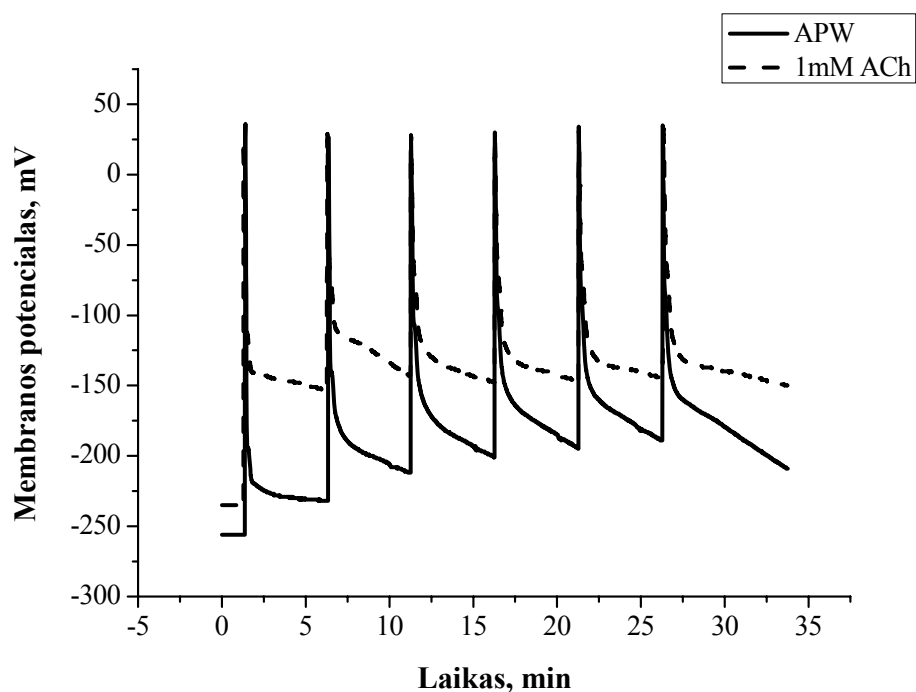
4.10 pav. Antro VP 50 s trunkančios repoliarizacijos fazinis portretas APW ir 5 mM ACh tirpaluose (n=5).

Veikimo potencialo repoliarizacijos fazė yra sąlygojama aktyvių joninių procesų. Atskiros jonų transporto sistemos yra aktyvuojamos prie tam tikro potencialo vertės. Membranos potencialas, prie kurio repoliarizacijos greitis yra didžiausias, gali parodyti už repoliarizaciją atsakingą joninį laidumą. Todėl buvo sudaromi repoliarizacinio proceso faziniai portretai (**4.10 pav.**). Buvo nustatyta, kad ACh mažina ląstelių, esančių stabilioje K^+ būsenoje,

repolarizacijos greitį visose tirtojo potencialo ribose, tačiau stipriausiai šis poveikis matomas ties -25 mV.

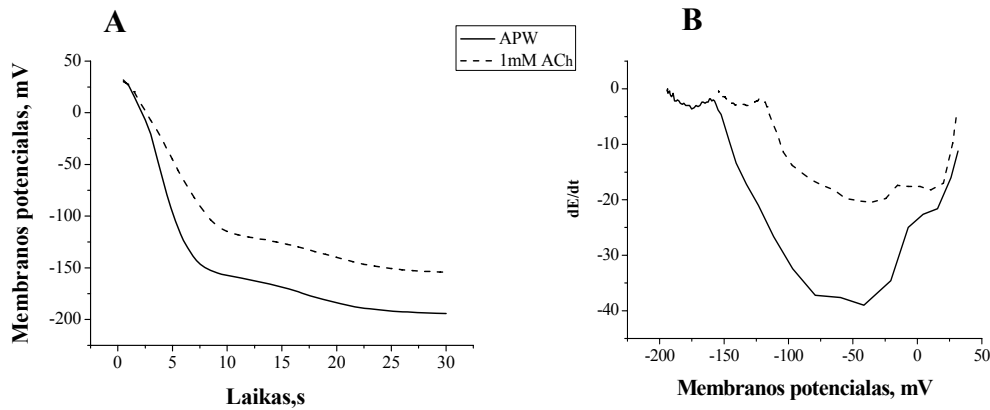
4.7. Acetilcholino poveikis ląstelių, 1mM ACh tirpale išbuvusių 16 valandų, veikimo potencialams.

Norint ištirti ACh įtakos stiprumo priklausomybę nuo poveikio trukmės, *Nitellopsis obtusa* ląstelės per naktį buvo laikomos 1mM ACh tirpale 16 valandų. Nustatėme, kad poveikio pobūdis lieka tas pats, tik stebimas ACh depoliarizuojančio poveikio ir VP repolarizacijos greičio lėtėjimo stiprėjimas.



4.11 pav. Tipinis 16 valandų trukusio 1mM ACh poveikio ląstelės veikimo potencialų serijai pavyzdys.

Statistinė analizė patvirtino, kad tiek 5mM ACh poveikis VP serijos dinamikai trukęs 1 val, tiek 1 mM ACh poveikis, trukęs 16 val. statistiškai nesiskyrė ($p>0,2$, $n=6$).



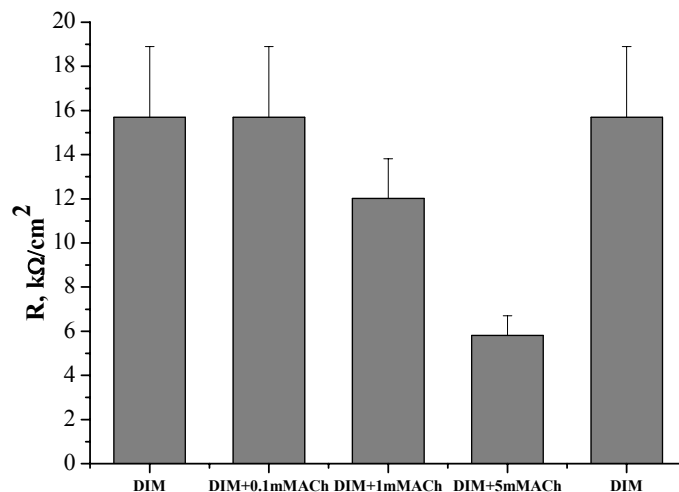
4.12 pav. Antrojo VP repoliarizacijos fazės (A) ir VP repoliarizacijos kitimo greičio priklausomybės nuo potencialo (B) vidurkiai po 16 valandų trukusio 1 mM ACh poveikio ($n=6$).

16 valandų trukęs 1 mM ACh poveikis VP greitajai repoliarizacijai buvo išreikštas labiau. Buvo stebimas didesnis VP repoliarizacijos sulėtėjimas (4.12 pav. A). Maksimalus membraninio potencialo kitimo greitis buvo $1,91 \pm 0,1$ mažesnis nei atplovimo metu (4.12 pav. B).

4.8. Suminis fosforo organinių junginių ir acetilcholino poveikis *Nitella flexilis* ląstelių bendrajam laidumui

Kadangi yra žinoma, kad AChE yra inhibuojama fosforo organiniais, buvo tirtas 10 μ M insekticido dimetoato (DIM) poveikis *Nitella flexilis* ląstelių bendrajam laidumui. Dėl ACh poveikio *Nitella flexilis* ląstelių varža sumažėjo nuo $22,28 \pm 2,2$ $k\Omega/cm^2$ APW tirpale iki $17,64 \pm 2$ $k\Omega/cm^2$ 1 mM ACh ir iki $11,73 \pm 2,3$ $k\Omega/cm^2$ 5 mM ACh tirpaluose. Dėl paties DIM poveikio buvo stebimas laidumo padidėjimas, tačiau buvo nustatyta, kad DIM reikšmingai stiprina 5 mM ACh poveikį bendrojo membranos laidumo didinimui (4.13

pav.). Standartinėmis sąlygomis dėl 5 mM ACh poveikio membranos laidumas padidėjo 1,9 karto, kartu su DIM- 2,7 karto. Šis poveikis buvo grįžtamas.

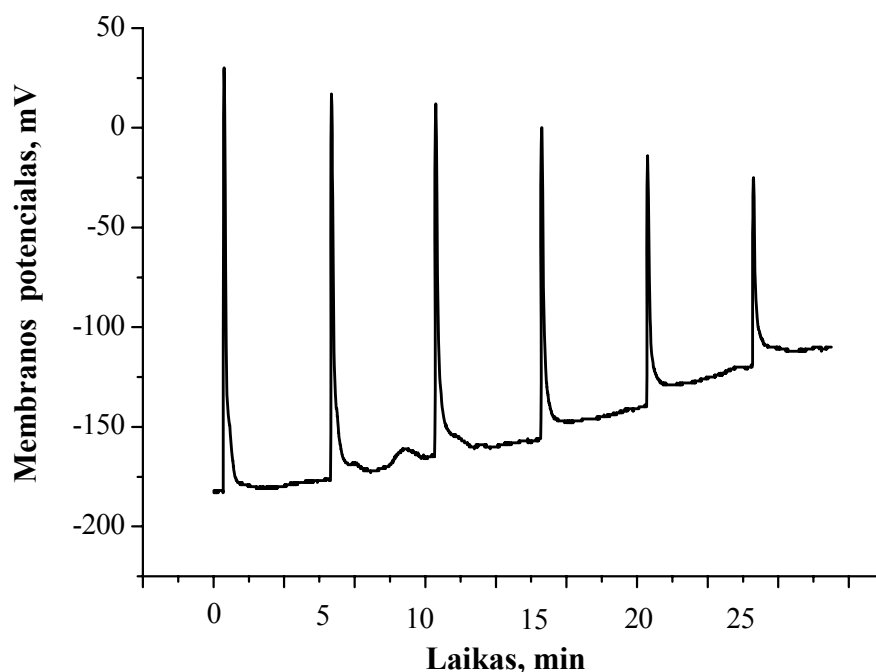


4.13 pav. Suminis ACh ir dimetoato *Nitella flexilis* ląstelių varžai (R, (kΩ/cm²)).

4.9. Kadmio poveikis *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranų elektrogenezei.

Yra žinoma, kad fermentinis AChE aktyvumas gali būti veikiamas tam tikrų metalų. Buvo parodyta, kad Cd²⁺ inhibuoja AChE aktyvumą *in vitro*, todėl mes pabandėme ištirti Cd²⁺ poveikį *in vivo*. Tyrimų metu buvo nustatyta, kad paveikus *Nitellopsis obtusa* ląsteles 100 μM ir didesnių koncentracijų Cd²⁺ tirpalais, po 30 minučių prasidėdavo stipri visų tirtųjų ląstelių (n=14) plazminės membranos depoliarizacija, kuri daugumoje atvejų sukeldavo ląstelės spontaninį aktyvumą. Spontaniniams VP Cd²⁺ poveikyje buvo būdingas laipsniškas amplitudės mažėjimas, kuri sąlygojo tiek membraninio potencialo teigiamėjimas, tiek maksimalios amplitudės vertės mažėjimas. Jei Cd²⁺ poveikis trukdavo trumpiau nei 30 min, spontaninis aktyvumas neprasidėdavo, todėl buvo nuspręsta elektriniais impulsais sukelti veikimo potencialų seriją ir ištirti, ar Cd²⁺ poveikis bus toks pats. Paaikškėjo, kad elektriškai sukeltų VP amplitudė mažėjo tokiu pačiu būdu, kaip ir spontaninio aktyvumo metu, t. y. dėl maksimalios amplitudės vertės mažėjimo ir ramybės

potencialo depoliarizacijos (**4.14 pav.**). Be to, po 6 elektriškai sukeltų VP serijos, ląstelės toliau generavo spontaninius impulsus. Visos tirtos ląstelės žuvo 2 valandų bėgyje, o elektrinis stimuliavimas greitino šį procesą.

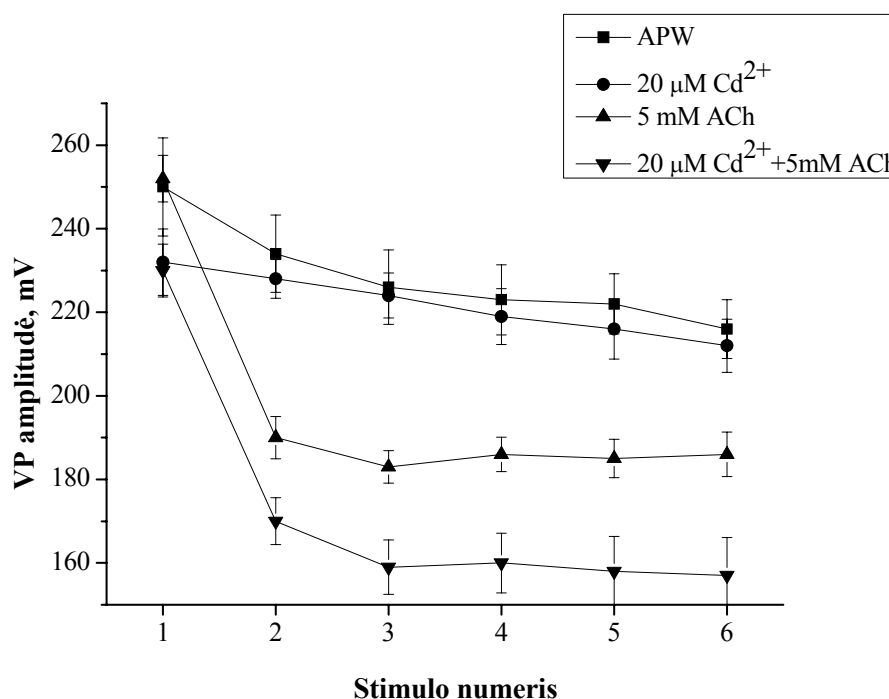


4.14. pav. *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranos potencialo dinamika kadmio jonų tirpale veikimo potencialų serijos metu. 20 min. prieš elektrinį stimuliavimą ląstelės buvo įmerktos į 100 μM Cd^{2+} tirpalą ir jame buvo laikomos visą matavimo laiką.

Yra manoma, kad stipri negrįžtama membraninio potencialo depoliarizacija yra Cd^{2+} jonų toksiškumo indikatorius (Llamas et al., 2000). Mūsų tyrimo rezultatai parodė, kad 20 μM Cd^{2+} tirpalas nesukėlė tokios stiprios depoliarizacijos 12 iš tirtų 14 ląstelių, kurių membraninis potencialas buvo neigiamesnis nei -220 mV. Todėl buvo nuspręsta panaudoti šios koncentracijos Cd^{2+} tirpalus AChE inhibavimui *in vivo*.

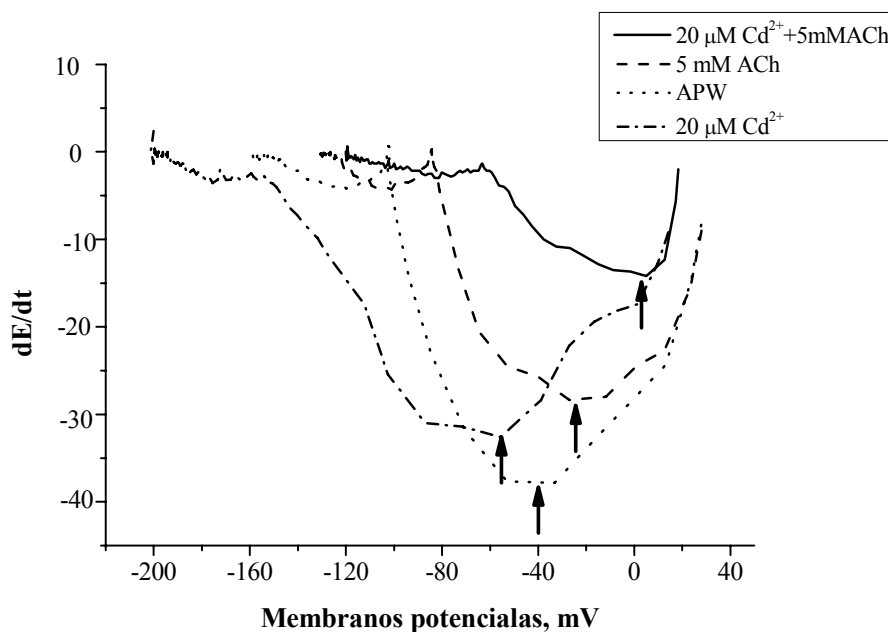
4.10. Suminis kadmio jonų ir acetilcholino poveikis *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranos potencialams

Naudodami 20 μM Cd^{2+} tirpalus, siekėme nustatyti, ar acetilcholinesterazės inhibitoriai keičia acetilcholino poveikį menturdumblių ląstelių veikimo potencialams. Buvo tiriamas tiek paties Cd^{2+} , tiek suminis kadmio jonų ir 5 mM ACh tirpalų poveikis veikimo potencialų dinamikai. Paveiktųjų ląstelių, kuriose prasidėjo ryški membraninio potencialo depoliarizacija (potencialas teigiamesnis nei -110 mV) ar spontaninis aktyvumas, duomenys nebuvo įtraukiami į analizę. Lygindami VP amplitudes serijose nustatėme, kad VP amplitudės APW ir Cd^{2+} tirpaluose nesiskyrė. Pirmojo VP amplitudė ACh tirpale, lyginant su kontroliniu tirpalu, taip pat nesiskyrė, bet buvo stebimas ryškus antrojo VP amplitudės sumažėjimas (Pav. 4.12). Bendrame 20 μM Cd^{2+} ir 5 mM ACh tirpale antrojo VP amplitudės sumažėjimas buvo dar ryškesnis. Statistinė analizė (neporinis t-testas) parodė reikšminius visų VP amplitudžių skirtumus ACh ir ACh + Cd^{2+} tirpaluose ($p > 0,00001$). Buvo nustatyta, kad Cd^{2+} stiprina ACh depoliarizuojantį poveikį membranos potencialo repoliarizacijai (4.15 pav.).



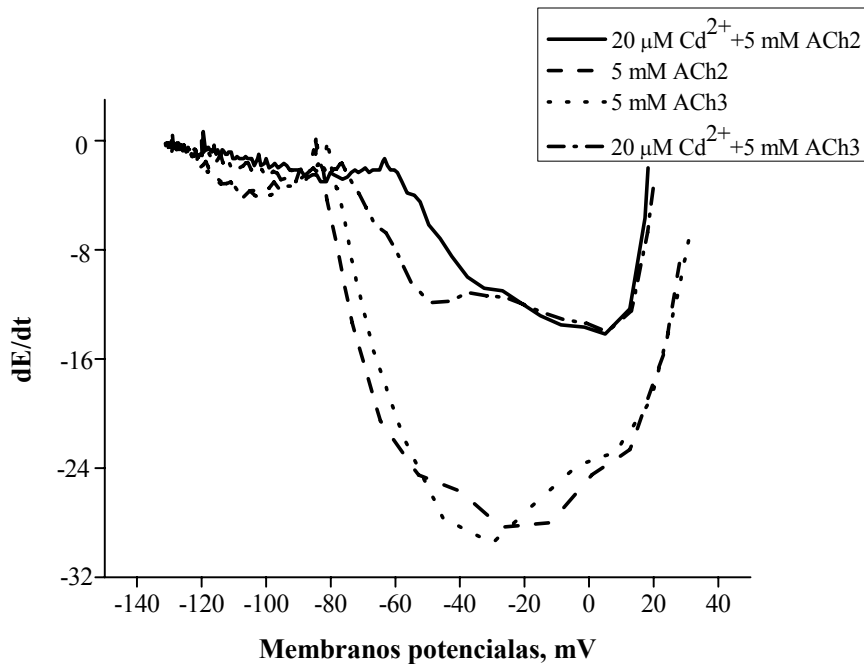
4.15 pav. VP amplitudės mažėjimo dinamika VP serijos metu $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$, 5 mM ACh ir $5 \text{ mM ACh} + 20 \mu\text{M Cd}^{2+}$ tirpaluose ($n=8$). Laikas tarp stimulų - 5 min . Amplitudė skaičiuojama kaip skirtumas tarp maksimalios VP vertės ir membraninio potencialo vertės prieš stimuliavimą.

Be to buvo pastebėta, kad Cd^{2+} stiprina ACh poveikio sąlygotą repoliarizacijos greičio mažėjimą. Maksimalus potencialo kitimo greitis paveikus ląsteles $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$ tirpalais buvo stebimas prie neigiamesnių potencialo verčių, lyginant su 5 mM ACh (**4.16 pav.**). Didžiausias repoliarizacijos greitis buvo $39,6 \pm 3,6 \text{ mV/s APW}$, $33,6 \pm 1,8 \text{ mV/s} - \text{Cd}^{2+}$, $28,8 \pm 3,2 \text{ mV/s} - \text{ACh}$ ir $14,9 \pm 2,2 \text{ mV/s} - \text{ACh} + \text{Cd}^{2+}$ tirpalais stimuliuotose ląstelėse.



4.16 pav. Antro VP 50 s trunkančios repoliarizacijos fazinio portreto vidurkis APW, $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$, 5 mM ACh bei suminiame $20 \mu\text{M Cd}^{2+} + 5 \text{ mM ACh}$ tirpaluose ($n=8$). Repoliarizacijos greičio įvertinimui diferencijuojamas 50 s trukmės membraninio potencialo kitimas nuo VP viršūnės, brėžiama dE/dt priklausomybė nuo membraninio potencialo. Rodyklės žymi didžiausią repoliarizacijos greitį.

Ryški membranos potencialo depoliarizacija ACh tirpaluose buvo stebima jau po pirmojo VP. Po sekančių stimulų membranos potencialas pasiekdavo maždaug tas pačias vertes. Palyginus didžiausią membranos potencialo kitimą tarp antrojo ir vėlesnių stimulų, statistiškai reikšmingų skirtumų negauta ($p > 0,05$) tiek ACh, tiek ACh + Cd²⁺ tirpaluose (**4.17 pav.**).

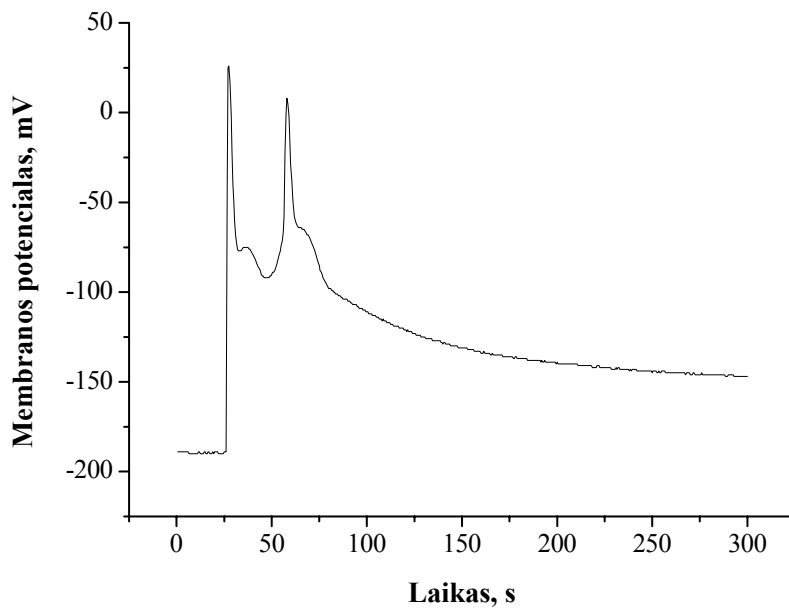


4.17 pav. Antrojo (5 mM ACh 2 ir 5 mM ACh+20 μM Cd²⁺ 2) ir trečiojo (5 mM ACh 3 ir 5 mM ACh+20 μM Cd²⁺ 3) veikimo potencialų 50 s trunkančios repoliarizacijos fazinių portretų vidurkiai 5 mM ACh bei suminiame 20 μM Cd²⁺ + 5 mM ACh tirpaluose (n=8). Repoliarizacijos greičio įvertinimui diferencijuojamas 50 s trukmės membrininio potencialo kitimas nuo VP viršūnės, brėžiama dE/dt priklausomybė nuo membrininio potencialo.

4.11. Suminis neostigmino bromido ir acetilcholino poveikis *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranos potencialams

Siekdami patvirtinti, kad acetilcholinesterazės inhibitoriai keičia acetilcholino poveikį menturdumblių ląstelių veikimo potencialams, naudojome specifinį AChE inhibitorių neostigmino bromidą (NB). AChE blokavimui *Nitellopsis obtusa* ląstelėse buvo naudojamas 30 μM NB tirpalas.

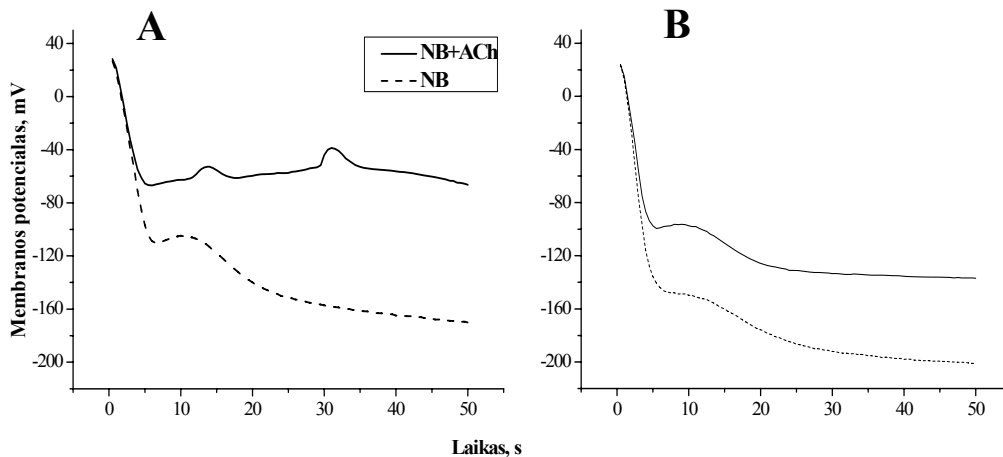
Pats inhibitorius statistiškai reikšmingos įtakos ląstelių potencialams neturėjo ($p < 0,22$). Tačiau po valandą trukusio NB veikimo, užpylus bendrą 0,03 mM NB ir 5 mM ACh tirpalą buvo stebimas depoliarizuojančio ACh poveikio stiprinimas. Be to 7 iš tirtų 13 ląstelių pirmojo VP metu buvo registruojami dvigubi atsakai - sužadinus ląstelę, nesibaigus VP repoliarizacijai ląstelė generuodavo spontaninį atsaką (**4.18 pav.**).



4.18 pav. Dvigubo veikimo potencialo, kurį sukėlė 5 mM ACh poveikis po AChE blokavimo, tipinis pavyzdys.

Šio spontaninio atsako amplitudė ir generavimo laikas bei trukmė buvo skirtingi skirtingose ląstelėse. Tačiau buvo pastebėta, kad ląsteles pagal VP repoliarizaciją galime suskirstyti į dvi grupes. Tose ląstelėse, kurių membraninis potencialas po 50 s trukusios pirmojo VP repoliarizacijos APW (taip pat ir NB) tirpaluose pasiekė $201 \pm 6,1$ mV, ($n=6$), dvigubi atsakai nebuvo stebimi (**4.19 pav. B**). Jei membraninis potencialas po 50 s trukusios pirmojo VP repoliarizacijos pasiekė $170 \pm 6,7$ mV ($n=7$), po ACh poveikio buvo stebimi vienokios ar kitokios formos dvigubi atsakai (**4.18 pav.**, **4.19 pav. A**).

Buvo tiriamas NB ir 0,03 mM NB + 5 mM ACh poveikis veikimo potencialų dinamikai serijos metu. Lygindami VP amplitudes serijose nustatėme, kad atskiruose APW, ir NB tirpaluose VP amplitudės nesiskyrė ($p < 0,3$).

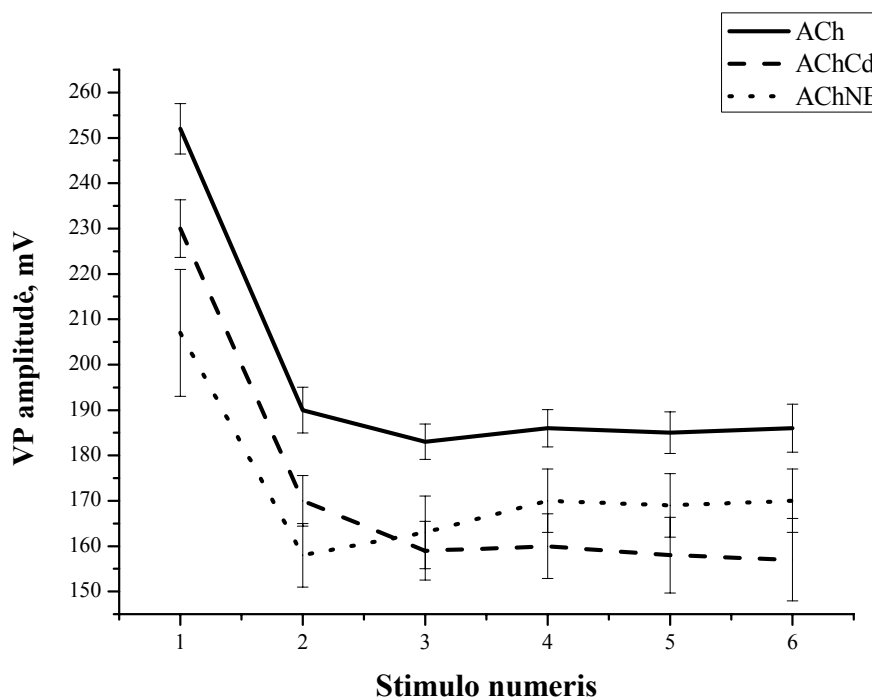


4.19 pav. Pirmojo VP repoliarizacijos fazės vidurkis 0,03 mM NB ir 0,03 mM NB+5 mM ACh tirpaluose. **A** - membranos potencialas po 50 s trukusios pirmojo VP repoliarizacijos NB tirpaluose pasiekė $170 \pm 6,7$ mV ($n=7$), stebimi dvigubi atsakai. Kadangi parodytas atsakų vidurkis, išryškėja didžiausios antrųjų potencialų, kurių latencija buvo skirtinga, smailės. **B** – membranos potencialas po 50 s trukusios pirmojo VP repoliarizacijos NB tirpaluose pasiekė $201 \pm 6,1$ mV, ($n=6$), dvigubi atsakai nebuvo stebimi.

Paveikus 0,03 mM NB + 5 mM ACh tirpalu buvo stebimas reikšmingas visų VP amplitudžių sumažėjimas bei ryškus poveikis antrojo VP amplitudei (**4.20 pav.**).

Lygindami 20 μM Cd^{2+} ir 30 μM NB poveikį statistiškai patikimų skirtumų negavome ($p < 0,13$), tačiau stebėtas didesnis poveikis antrojo VP amplitudei. Neporinis t-testas parodė reikšminius visų VP amplitudžių skirtumus ACh ir 0,03 mM NB + 5 mM ACh ($p > 0,01$, $n=10$). Buvo nustatyta,

kad NB, kaip ir Cd^{2+} stiprina ACh depoliarizuojantį poveikį membraninio potencialo repoliarizacijai (4.20 pav.).

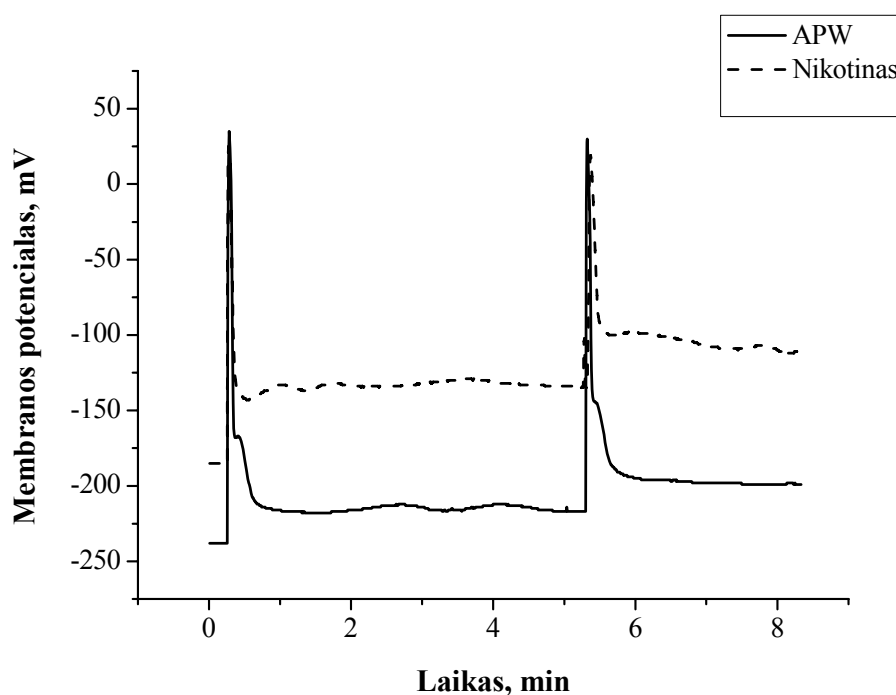


4.20 pav. VP amplitudės mažėjimo dinamika VP serijos metu 5 mM ACh, 20 μM Cd^{2+} + 5 mM ACh ir 30 μM NB+5 mM ACh tirpaluose (n=10). Laikas tarp stimulų - 5 min. Amplitudė skaičiuojama kaip skirtumas tarp maksimalios VP vertės ir membraninio potencialo vertės prieš stimuliavimą.

4.12. Nikotino poveikis *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranos potencialams

Tirdami nikotino įtaką *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranos potencialams pastebėjome, kad nikotinas veikia panašiai kaip 5mM ACh, tik žymiai mažesnėmis koncentracijomis. 0,1 mM nikotino stipriai depoliarizavo ląstelės membranos potencialą. Palaipsninė depoliarizacija buvo stebima iš karto pakeitus tirpalą. Depoliarizuojantis nikotino poveikis priklausė nuo ląstelės energetinės būsenos ir ramybės potencialo vertės kontroliniame tirpale.

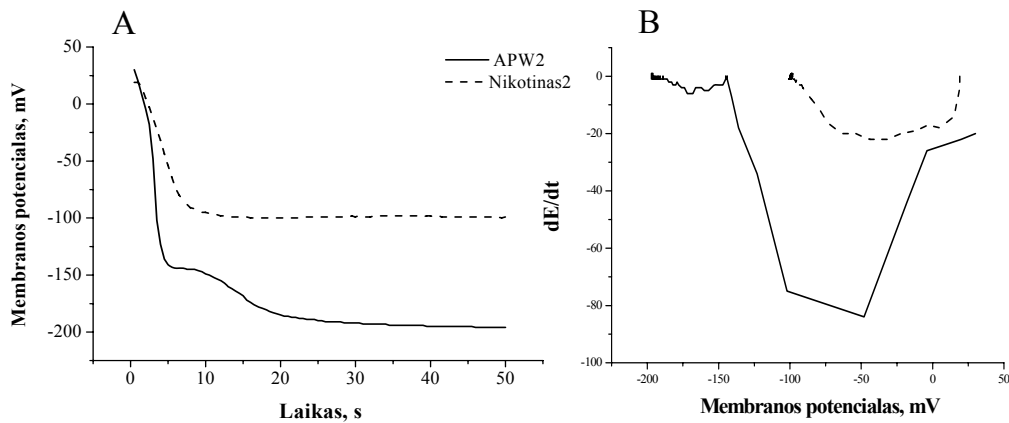
Ląstelės, kurios pasižymėjo neigiamesniu potencialu (> -230 mV) ir greita repoliarizacija, per 30 min depoliarizavosi 52 ± 7 mV. ($n=5$). Šiose ląstelėse elektriškai sukėlus veikimo potencialus, kaip ir ACh poveikio atveju, buvo stebimas VP amplitudės mažėjimas ir repoliarizacijos proceso lėtėjimas (4.21 pav.).



4.21 pav. 0.1 mM nikotino poveikis *Nitellopsis obtusa* ląstelių, pasižyminčių neigiamu potencialu (> -230 mV) ir greita repoliarizacija, membranos potencialo kitimui. Prieš elektrinį stimuliavimą nikotino poveikis truko 30 min.

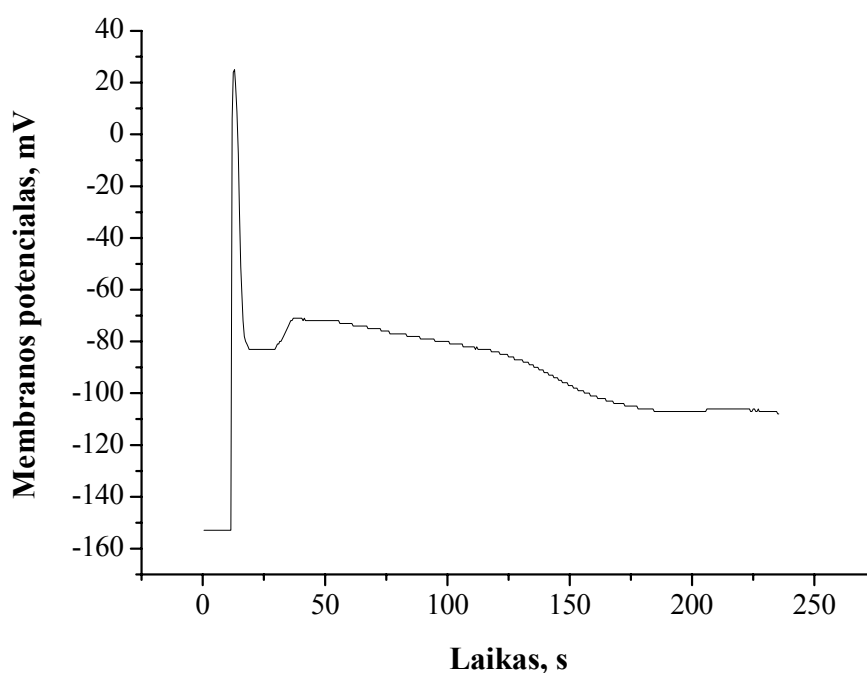
Kaip ir vertinant ACh poveikį, analizavome antrojo VP pakitimus ir nustatėme ryškų antrojo VP repoliarizacijos greičio lėtėjimą, bei amplitudės sumažėjimą nuo 226 ± 11 mV iki 118 ± 14 mV ($n=5$) (4.22 pav. A). Skirtumas tarp lėtosios repoliarizacijos APW ir 0,1 mM nikotino tirpaluose verčių po pirmojo VP buvo 82 ± 9 mV ($n=5$). Sudarius fazinį portretą paaiškėjo, kad dėl nikotino poveikio maksimalus potencialo kitimo greitis sumažėjo $4 \pm 0,6$ karto (4.22 pav. B, $n=5$).

Ląstelėse, kurių membraninis potencialas buvo apie -220 mV (n=5), po 0,1 mM nikotino poveikio sąlygotos depoliarizacijos buvo stebimas ląstelių spontaninis aktyvumas ir tolimesnė palaipsnišinė membranos potencialo depoliarizacija. Kai kurių ląstelių membraninis potencialas pasiekė net -60 mV. Tačiau, nepriklausomai nuo depoliarizacijos lygio, vyko atplovimo procesas.



4.22 pav. Antrojo VP repoliarizacijos fazės vidurkis po 30 min trukusio 0,1 mM nikotino poveikio (**A**) ir repoliarizacijos proceso fazinis portretas (**B**), (n=5).

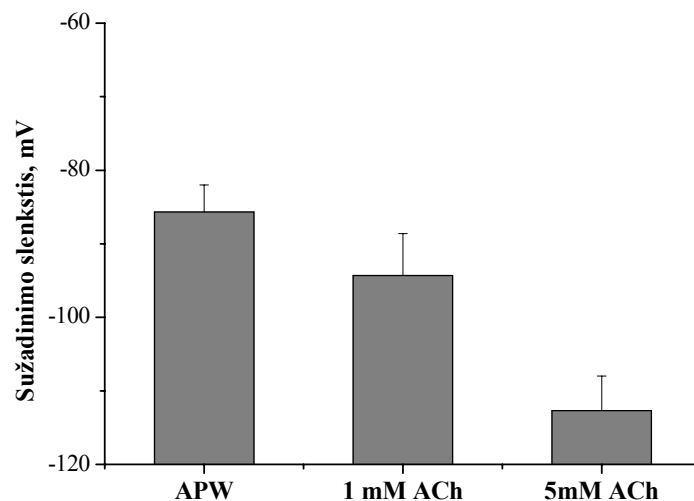
Valandos bėgyje tos ląstelės, kurių membraninis potencialas nenukrito aukščiau -100 mV, pilnai atsiplovė (n=5). Labiau depoliarizuotų ląstelių membraninis potencialas per valandą pasiekė vidutiniškai -162 ± 17 mV.



4.23 pav. 0,05 mM nikotino poveikio sukkelto dvigubo veikimo potencialo pavyzdys. Paveikus ląsteles ($n = 5$) 0,05 mM nikotino tirpalu taip pat buvo stebima membranos potencialo depoliarizacija ir dvigubi atsakai, panašūs į tuos, kurie buvo registruojami po neostigmino bromido ir ACh poveikio (**4.23 pav.**).

4.13. Acetilcholino poveikis *Nitellopsis obtusa* ląstelių jaudrumui

Tirdami ACh poveikį *Nitellopsis obtusa* ląstelių veikimo potencialams pastebėjome, kad ACh tirpaluose ląstelės dažniau generuoja spontaninius VP ne tik dėl depoliarizuojančio ACh poveikio, bet ir dėl padidėjusio ląstelių sužadimumo. Normaliomis sąlygomis *Nitellopsis obtusa* ląstelių sužadinimo slenkstis yra 90 ± 10 mV. Naudodami potencialo fiksacijos metodą nustatėme, kad visose tirtose ląstelėse ($n=7$) 5 mM Ach lyginant su APW tirpalu sumažina sužadinimo slenkstį ($p < 0,001$, **4.24 pav.**). Daugumoje tirtų ląstelių chlorinės srovės atsiradimas APW tirpaluose buvo registruojamas prie -80 mV, 5 mM ACh tirpaluose – prie -120 mV. Poveikis sužadinimo slenksčiui buvo grįžtamas. 0,05 mM nikotino taip pat sužadinimo slenkstį paslino 20 mV neigiama kryptimi ($n=5$).

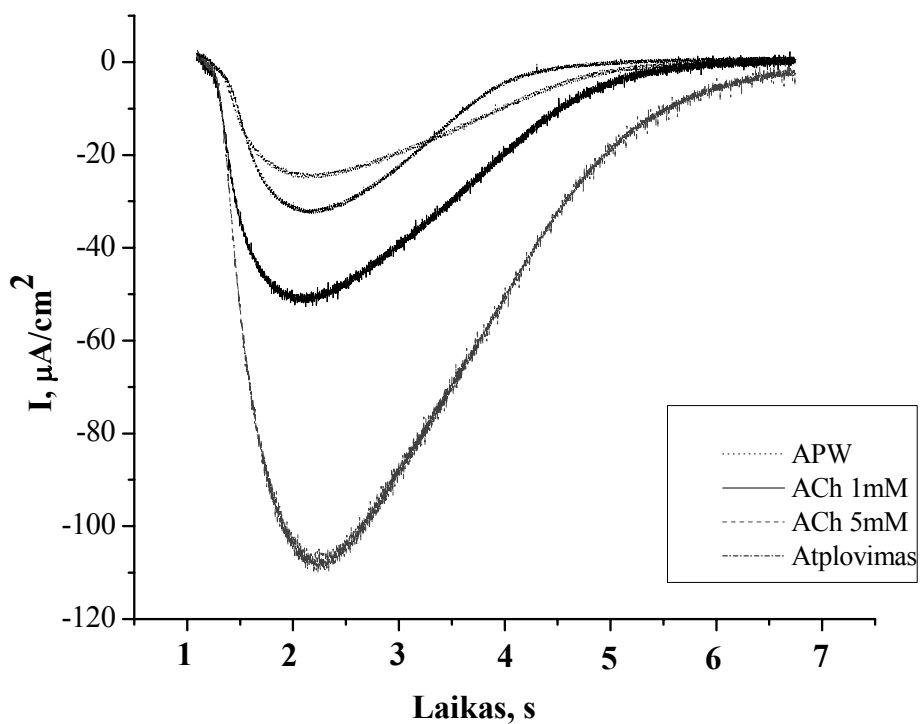


4.24 pav. Vidutinis sužadavimo slenkstis standartiniame ir 1 mM ACh bei 5 mM ACh tirpaluose.

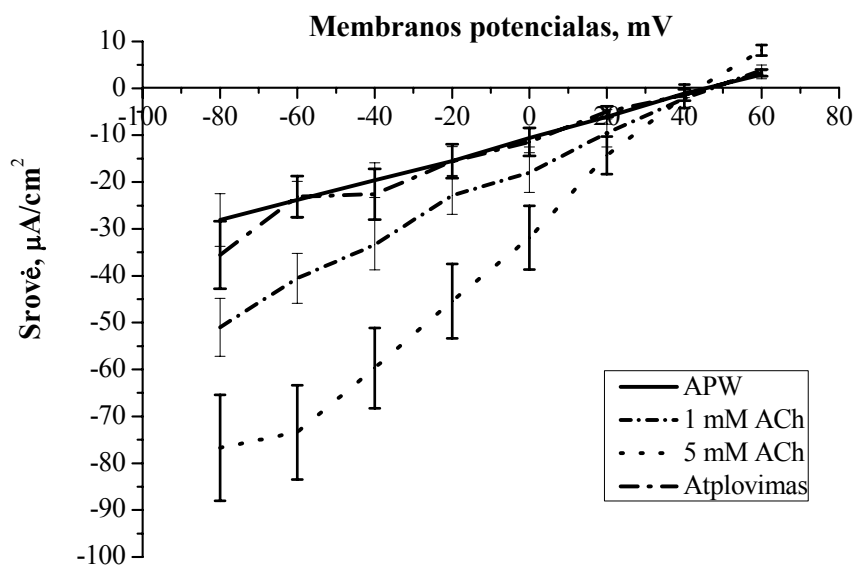
Be to buvo pastebėta, kad dėl ACh poveikio mažėja stimuliavimo laikas, reikalingas Cl⁻ srovei atsirasti (**4.25 pav.**). Kontroliniame tirpale Cl⁻ srovė pradeda tekėti praėjus 212 ± 12 ms nuo stimuliavimo pradžios. 1 mM ACh vidutiniškai mažina ($p < 0,00001$, $n=7$) Cl⁻ srovės latenciją 58 ± 10 ms lyginant su APW tirpalu, o 5 mM ACh tirpaluos Cl⁻ srovė atsiranda praėjus 148 ± 9 ms nuo impulso padavimo pradžios ($p < 0,00001$, $n=7$). ACh patikimai mažina Cl⁻ srovės latenciją, tačiau skirtumas tarp 1 mM ir 5 mM ACh poveikio buvo nereikšmingas ($p > 0,05$, $n=7$). Taigi ACh tirpaluose ląstelių jaudrumas didėja tiek dėl sumažėjusio laiko, reikalingo sužadinti ląstelę, tiek dėl sužadavimo įtampos neigiamėjimo.

4.14. Acetilcholino poveikis *Nitellopsis obtusa* ląstelių Cl⁻ srovei.

Tirdami ACh poveikį *Nitellopsis obtusa* ląstelių Cl⁻ srovei pastebėjome, kad ACh ne tik mažina Cl⁻ srovės latenciją, bet ir didina srovės amplitudę bei srovės generavimo trukmę (**4.25 pav.**).



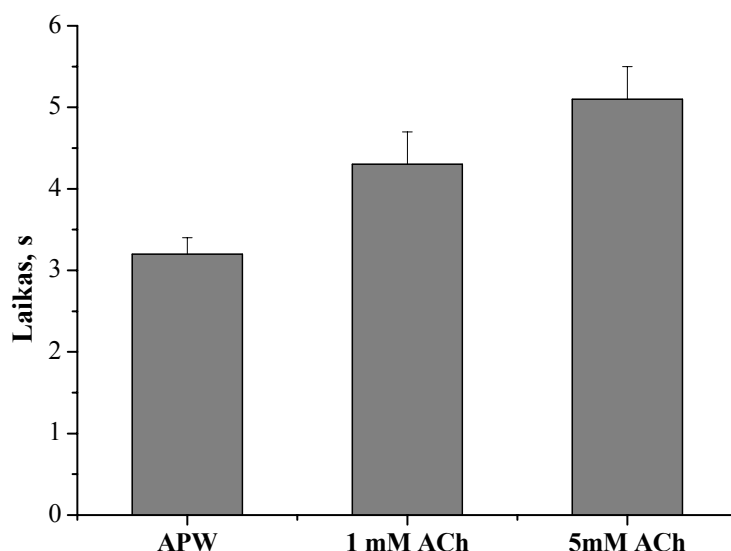
4.25 pav. Tipinis ACh poveikis *Nitellopsis obtusa* ląstelių Cl^- srovės generacijai prie -80 mV. Potencialas fiksuotas ties -180 mV įtampa.



4.26 pav. Cl^- srovės priklausomybės nuo Ach poveikio voltamperinė charakteristika. Potencialas fiksuotas ties -180 mV įtampa. Fiksacijos lygis kas 5 minutės buvo laiptiškai didinamas 20 mV.

Užregistravus chlorinę srovę ties slenkstine įtampa, fiksacijos lygi, laiptiškai didinant 20 mV, buvo sudaryta Cl⁻ srovės voltamperinė charakteristika (**4.26 pav.**). Nustatėme, kad srovės amplitudė dėl ACh poveikio didėja ties visomis įtampomis. 1 mM ACh padidina Cl⁻ srovę vidutiniškai $1,6 \pm 0,05$ karto (prie -60 mV įtampos srovė padidėja $16,2 \pm 6,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). 5mM ACh vidutiniškai padidina Cl⁻ srovę 2,7 karto (prie -60mV įtampos srovė padidėja $51,3 \pm 6,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) lyginant su srovės stiprumu prie APW.

Be to ACh ne tik didina srovės chlorinės srovės stiprumą, bet ir ilgina chlorinių kanalų buvimą atviroje būsenoje laiką ($p < 0,001$, $n=7$, **4.27 pav.**).



4.27 pav. Cl⁻ srovės inaktyvacijos trukmės priklausomybė nuo ACh koncentracijos ties -60 mV įtampa.

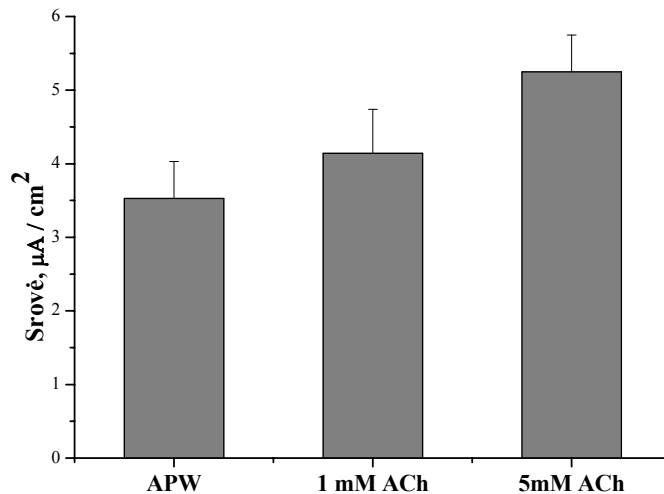
Ties kitomis įtampomis inaktyvacijos trukmės ilginimas buvo panašus. 1 mM ACh vidutiniškai ilgina Cl⁻ srovės inaktyvacijos laiką $0,9 \pm 0,3$ s (25 %), o 5 mM ACh – $1,6 \pm 0,5$ s (46 %).

1mM ACh ir 5 mM ACh Cl⁻ srovės reversijos potencialą nors ir nežymiai, bet statistiškai patikimai ($p < 0,001$) paslenka neigiama kryptimi. Kontroliniame tirpale Cl⁻ srovės reversijos potencialas buvo $49,4 \pm 2,4$ mV, 1mM ACh tirpale

Cl⁻ srovės reversijos potencialas buvo $45,2 \pm 2,5$ mV, o 5 mM ACh tapo $43,2 \pm 2,5$ mV.

4.15. Acetilcholino poveikis *Nitellopsis obtusa* ląstelių Ca²⁺ srovei.

Sudarydami srovių voltamperines charakteristikas sužadavimo metu, diapazone nuo -20 iki 40mV galime išskirti dvi, laiku ir dydžiu besiskiriančias generavimo sroves. Praėjus maždaug 100 ms nuo stimulo pateikimo stebime mažos amplitudės Ca²⁺ srovę, kuri geriausiai atsiskiria nuo vėlesnės ir didesnės amplitudės Cl⁻ srovės ties 20 mV. Todėl ACh poveikis buvo vertinamas ties šia įtampa.



3.28 pav. Acetilcholino poveikis Ca²⁺ srovei registruotas ties 20 mV įtampa.

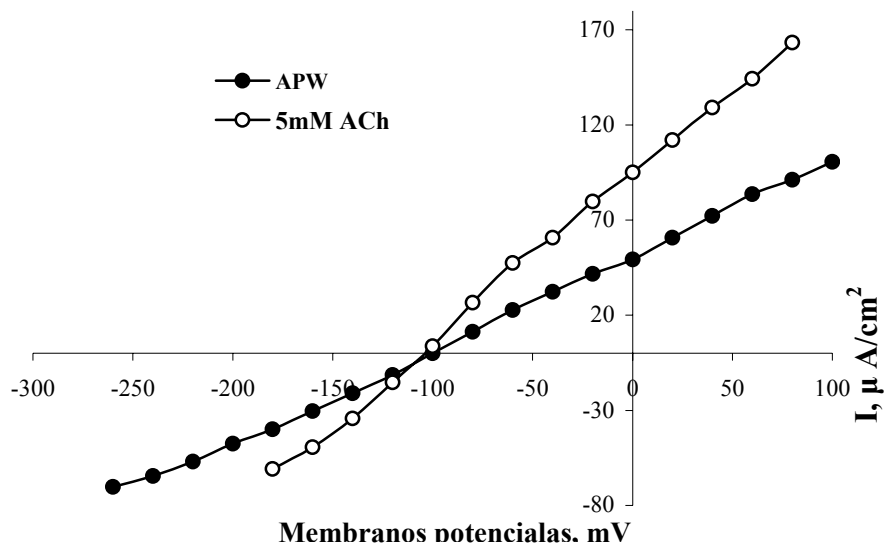
Buvo nustatyta, kad dėl ACh poveikio Ca²⁺ srovė išauga (**3.28 pav.**). 5 mM ACh statistiškai patikimai didina Ca²⁺ srovę $33 \pm 12\%$ ($p=0,025$, $n=7$)

4.16. Acetilcholino poveikis *Nitella flexilis* ląstelių K⁺ kanalams.

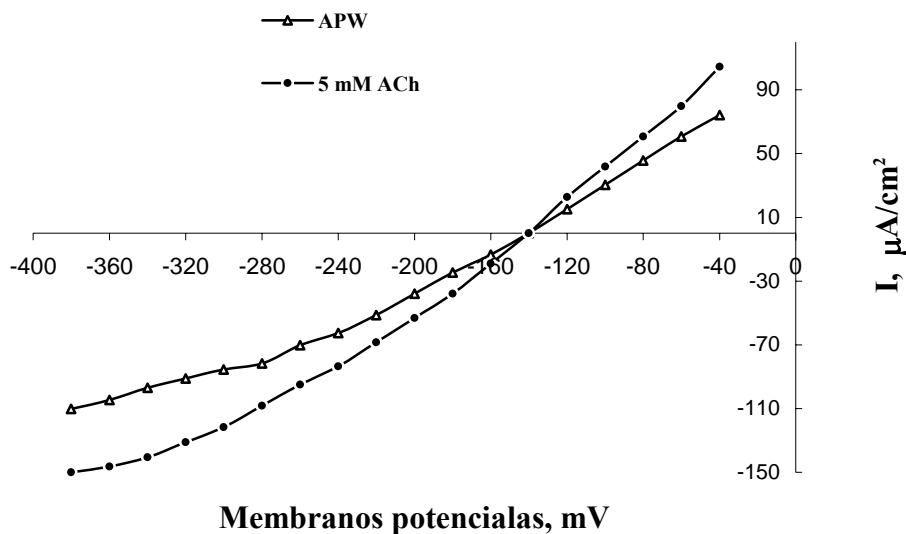
Augalinių ląstelių K⁺ kanalus pagal srovės tekėjimo kryptį galime suskirstyti į dvi grupes. Įtekančios krypties K⁺ kanalai yra aktyvuojami membranos potencialo hiperpolarizacija, ištekančios krypties K⁺ kanalai – depolarizacija. Kadangi šie kanalai yra aktyvūs skirtinguose įtampų ruožuose,

galima tirti ACh poveikį tiek įeinančios, tiek išeinančios krypties K^+ srovėms. Nustatyta, kad ACh didina abiejų tipų K^+ kanalų laidumą.

Depoliarizacija aktyvuojamų K^+ kanalų laidumas dėl 5mM ACh poveikio didėja $57,5 \pm 5,7\%$. K^+ srovės dydis buvo vertinamas ties 40 mV įtampa. Nustatėme, kad 5 mM ACh statistiškai patikimai ($p < 0,001$, $n=6$) didina ištekančios srovės vertę $64 \pm 5,5\%$. Reversijos taškas pasislinko neigiama kryptimi nežymiai (vidutiniškai 5mV) (4. 29 pav.).



4.29 pav. Depoliarizacija aktyvuojamų K_{out}^+ kanalų tipinė voltamperinė charakteristika APW ir 5mM ACh tirpaluose. Potencialas fiksuotas ties -40mV. Įtampa didinta šuoliukais kas 20mV 30 ms trukmės impulsais.

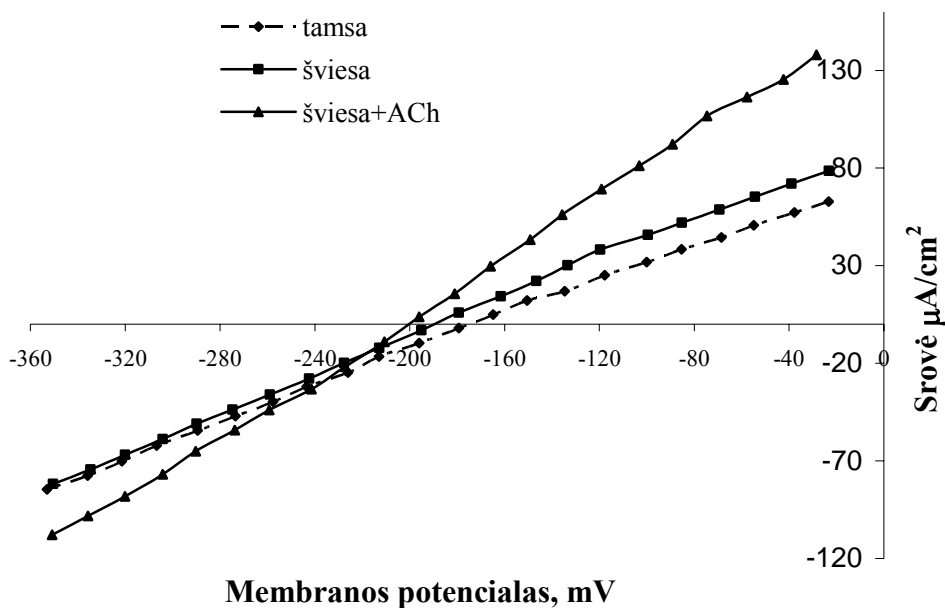


4.30 pav. Hiperpolarizacija aktyvuojamų K_{in}^+ kanalų tipinė voltamperinė charakteristika APW ir 5mM ACh tirpaluose. Potencialas fiksuotas ties -160mV. Įtampa didinta šuoliukais kas 20mV 30 ms trukmės impulsais.

Hiperpolarizacija aktyvuojamų K^+ kanalų laidumas dėl 5 mM ACh poveikio didėja $53,5 \pm 3,4\%$. K^+ srovės dydis buvo vertinamas ties -340 mV įtampa. Nustatėme, kad 5 mM ACh statistiškai patikimai ($p < 0,002$, $n=6$) didina įtekančios srovės vertę $41 \pm 6,8\%$. Reversijos taško poslinkis nebuvo stebimas (**4. 30 pav.**).

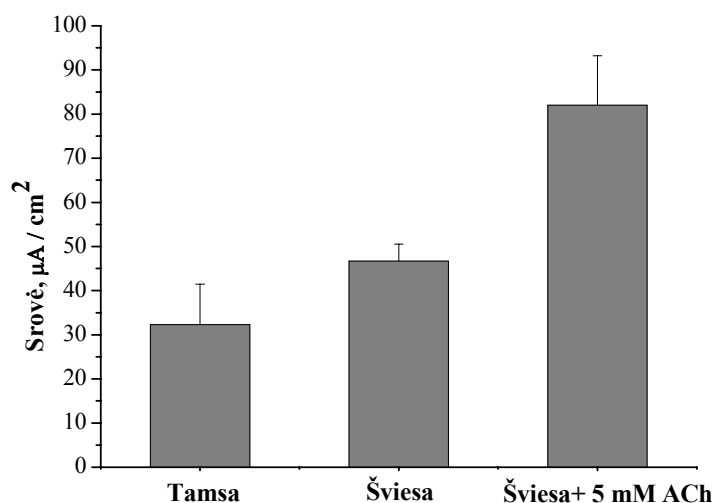
4.17. Acetilcholino poveikis H^+ -ATPazės aktyvavimui

Menturdumblių *Nitella flexilis* ląstelės yra plačiai naudojamos H^+ -ATPazės tyrimuose, kadangi šių ląstelių protonų siurblio aktyvumas yra gana lengvai moduluojamas šviesa. Ląstelėse, kuriose pavyko sukelti fotoindcinę reakciją, buvo stebimas šios reakcijos sąlygoto membranų potencialo pokyčio amplitudės padidėjimas dėl 5 mM ACh poveikio. H^+ -ATPazės aktyvacijos metu 5 mM ACh didino membranų potencialo pokytį 14 ± 3 mV.



4.31 pav. H^+ -ATPazės aktyvacijos šviesa voltamperinė charakteristika. Potencialas fiksuotas ties $-160mV$. Įtampa didinta šuoliukais kas $20mV$ 30 ms trukmės impulsais.

Atlikus membranos potencialo fiksaciją ir sudarius voltamperines charakteristikas buvo nustatyta, kad 5 mM ACh stiprina H^+ -ATPazės aktyvaciją šviesa (**4.31 pav.**).



4.32 pav. ACh poveikis išeinančios krypties srovei H^+ -ATPazės aktyvacijos metu, vertintas ties -100 mV įtampa.

ACh poveikyje stipriau pasislinko reversijos potencialas. Aktyvuotų ląstelių (n=6) reversijos potencialas pasislinko neigiama kryptimi 16 ± 3 mV, 5 mM ACh šį poslinkį padidino dar 15 ± 7 mV. ACh taip pat didino ir išeinančiosios krypties srovės amplitudę (**4.32 pav.**). ACh padidino laidumą siurblio aktyvacijos metu 1,78 karto ($P < 0,01$).

5. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS IR APTARIMAS

5.1. Acetilcholino poveikis menturdumblių membraninio potencialo elektrogenezei

Membraninio potencialo pokyčiai dėl Ach poveikio rodo, kad ACh įtakoja pagrindines menturdumblių membraninio potencialo genezėje dalyvaujančias jonų pernašos sistemas. Gauti darbo rezultatai rodo, kad 5 mM ACh aktyvina K^+ kanalus ramybės būsenoje, Cl^- ir Ca^{2+} kanalus sužadinimo metu bei fotoindukcinę reakciją menturdumblių ląstelėse.

Buvo nustatyta, kad ACh iš karto po užpylimo, sukelia membraninio potencialo depoliarizaciją. Galima daryti prielaidą, kad ACh padidina pastovų foninį membranos laidumą (*angl.* background conductance). ACh sąlygotas protonų siurblio aktyvumo padidėjimas lemdavo po 25 minučių prasidėjusį palaipsniinį hiperpoliarizacijos procesą, dėl ko membraninis potencialas valandos bėgyje pasiekdavo APW lygį. Panašus protonų siurblio aktyvacijos pavyzdys buvo nustatytas, tiriant NaCl poveikį kito menturdumblio *Lamprothamnium* ląstelėms (Beilby & Shepherd, 2006b).

Tirdami acetilcholino poveikį menturdumblių *Nitellopsis obtusa* veikimo potencialų parametrus, nustatėme, kad ACh pasižymi depoliarizuojančiu poveikiu bei ilgina repoliarizacijos proceso trukmę. Literatūros duomenų analizė parodė, kad ACh gali keisti augalinių membranų laidumą protonams (Jaffe, 1970), kalio (Roshchina, 2001), chloro (Gong & Bisson, 2002) ir kalcio (Tretyn A., 1987) jonams. Yra žinoma, kad būtent šių jonų pernašos sistemos yra aktyvios augalų veikimo potencialo generacijos metu (Lunevsky, 1983; Trebacz et al., 1994; Plieth & Hansen, 1996; Thiel et al., 1997; Beilby, 2007). Mūsų atlikta *Nitellopsis obtusa* membraninio

potencialo analizė taip pat leidžia teigti, kad dėl didelės koncentracijos ACh poveikio keičiasi ląstelių sužadavimo procese dalyvaujančių jonų pernašos sistemų veikla. Mūsų gauti rezultatai patvirtina duomenis, gautus tiriant kito menturdumblio - *Chara coralina* veikimo potencialus (Gong & Bisson, 2002). Šiame darbe tai pat buvo parodyta, kad dėl ACh poveikio ilgėja VP repoliarizacijos proceso trukmė. Repoliarizacijos trukmę ACh galėtų keisti, moduluodamas kelių jonų pernašos sistemų veiklą. VP repoliarizacijos fazės pradžioje aktyvuojami K^{+}_{out} kanalai, K^{+} pradeda tekėti iš ląstelės. Taigi ACh galėtų inhibuoti šių kanalų veiklą ir tokiu būdu mažinti teigiamų krūvių išėjimą iš ląstelės. Dėl to sulėtėtų potencialo atsistatymo greitis ir pailgėtų VP repoliarizacijos procesas. Mūsų atliktų tyrimų metu buvo nustatyta, kad dėl ACh poveikio padidėja tiek įtekančiosios, tiek ištekančiosios kalio jonų srovės (4.16 sk.) Tokiu būdu repoliarizacijos proceso pailgėjimas negali būti aiškinamas K^{+}_{out} kanalų inhibicija.

Repoliarizacijos proceso pailgėjimas galėtų būti aiškinamas H^{+} ATPazės inaktyvacija. Mažindamas siurblio aktyvumą, ACh galėtų sąlygoti mažesnę teigiamų krūvių išėjimą iš ląstelės, ir tokiu būdu lėtinti membranų repoliarizacijos greitį. Tačiau šiame darbe taip pat parodėme, kad dėl ACh poveikio vyksta H^{+} ATPazės aktyvavimas, o ne inhibicija (4.17 sk.). Be to, užblokavus protonų siurblių DCCD tirpalu, matome dar ryškesnį repoliarizacijos proceso pailgėjimą (4.5 sk.). DCCD yra pagrindinis ATPazių inhibitorius, plačiai naudojamas augalinių membranų tyrimuose (Shabala et al., 2006). Mikromolinės DCCD koncentracijos yra pakankamos pilnai ir negrįžtamai blokuoti protonų siurblio veiklą, kai tuo tarpu K^{+} pernašos sistemos yra neveikiamos. Kita vertus, yra teigiama, kad membraninio potencialo hiperpolarizacija ar depolarizacija nebūtinai parodo H^{+} siurblio aktyvumą, ir jei H^{+} ATPazės aktyvumas sumažėjo, ramybės potencialas vis tiek gali siekti pakankamai neigiamas vertes (Tsutsui & Ohkawa, 2001). Tokiu atveju membraninio potencialo kitimo dinamika VP serijos metu galėtų būti geresnis protonų siurblio veiklos indikatorius. Tačiau nors DCCD taikymas yra prilyginamas H^{+} siurblio srovės blokavimui (Kishimoto, 1984), o mūsų

duomenimis ACh poveikis VP repoliarizacijai nėra susijęs su H^+ -ATPazės inhibavimu, negalime atmesti galimybės, kad inhibavus H^+ -ATPazę yra sutrikdoma ląstelės joninė homeostazė ir ląstelė tampa jautresnė ACh. Pavyzdžiui, ACh poveikis pastoviam foniniam laidumui, tuo pačiu ir depoliarizuojantis poveikis, gali būti kompensuojamas ląstelės protonų siurblio veiklos. Kita vertus, H^+ -ATPazės aktyvumo sukurto gradiento ir neigiamo potencialo skirtumo dėka yra užtikrinamas K^+ ir Cl^- patekimas į ląstelę, todėl DCCD taikymas išryškina ACh poveikį išeinančiosioms srovėms. Mes nustatėme, kad ACh aktyvuoja K_{in} kanalus, o kadangi Cl^- patenka į ląstelę $2H^+/Cl^-$ simporto dėka (Beilby and Walker 1981), ryškiausiai ACh poveikis po protonų siurblio inhibavimo bus matomas išeinančiai Cl^- srovei. Taigi, jonų pernašos sistema, kuri sąlygoja platesnį VP dėl ACh poveikio, yra Cl^- kanalai. Dėl ACh poveikio padidėja išeinančių iš ląstelės neigiamų krūvių kiekis, kuris nėra taip greitai kompensuojamas pradėjusių veikti K^+ kanalų ir protoninių siurblių. Tokiu būdu galime paaiškinti tiek greitosios, tiek lėtosios fazių repoliarizacijos proceso pailgėjimą. Šiame darbe, naudodami fiksuotos įtampos metodą, parodėme, kad ACh labiausiai veikia laidumą Cl^- jonams. Nustatėme, kad 5mM ACh tirpale Cl^- srovė padidėja 3 kartus (**4.14 sk.**). ACh poveikis gali būti dvejopas - jis gali aktyvuoti tuos pačius Cl^- kanalus, kurie dalyvauja VP generacijoje, ilgindamas jų buvimą atviroje būsenoje arba aktyvina kitus (pvz. neselektyvius) kanalus, kurie atsidarę membranos depoliarizacijos metu, tampa laidūs Cl^- . Be to, ACh gali didinti tiek plazmalemos, tiek tonoplasto Cl^- kanalų laidumą. Gong ir Bisson, tirdami *Chara corallina* tonoplasto Cl^- kanalus fiksuotos įtampos/srovės metodu parodė, kad ACh didina šių kanalų atidarymo tikimybę (Gong & Bisson, 2002). Šių kanalų aktyvumo padidėjimu buvo aiškinamas repoliarizacijos proceso pailgėjimas. Buvo parodyta, kad Cl^- srovė padidėja, padidėjus citoplazminei Cl^- koncentracijai (Beilby & Shepherd, 2006b).

Tam, kad aktyvuotų tonoplasto kanalus, ACh turėtų patekti į citoplazmą. Mūsų atliktuose tyrimuose ACh poveikis buvo grįžtamas, vadinasi, arba ACh

nepatenka į ląstelę (tada tonoplasto kanalų aktyvacija galima dėl antrinių tarpininkų (pvz. Ca^{2+} veikimo), arba yra hidrolizuojamas.

Rezultatai parodė, kad dėl ACh poveikio ląstelės sužadintos prie žymiai neigiamesnių įtampų, t. y. tampa jaudresnės (**4.13 sk.**). Augalinių ląstelių VP generacija yra sąlygojama nuo įtampos priklausomų ir Ca^{2+} valdomų Cl^- kanalų atsidarymu plazminėje membranoje ir tonoplaste (Lunevsky et al., 1983). Yra nustatyta, kad Ca^{2+} valdomi Cl^- kanalai menturdumbliuose dažniausiai atsidaro prie -80 ir -100 mV įtampos (Okihara K. et al., 1991). Mūsų rezultatai APW tirpale taip pat patvirtino šiuos duomenis (**4.25 pav.**). Gali būti, kad ACh, palengvina šių kanalų atsidarymą prie mažesnės įtampos vertės, keisdamas fizines membranos savybes ir tokiu būdu mažindamas sužadavimo slenkstį. Jaudrumo padidėjimas taip pat gali būti aiškinamas ACh sąlygotu padidėjusiu Ca^{2+} laidumu. Literatūros duomenimis ACh augalinėse ląstelėse padidina vidinę Ca^{2+} jonų koncentraciją (Tretyn, 1987). ACh gali pagreitinti nuo Ca^{2+} priklausomų Cl^- kanalų aktyvacijai reikalingos Ca^{2+} jonų koncentracijos susikaupimą ląstelės viduje arba membranoje yra acetilcholino receptoriai - Cl^- jonams laidūs kanalai (Gong & Bisson, 2002). Mes nustatėme, kad veikiant ACh laidumas Ca^{2+} padidėja. Padidėjusi Ca^{2+} jonų koncentracija gali nulemti ir Cl^- srovės aktyvacijos latencijos sumažėjimą. ACh poveikio sąlygotas Cl^- srovės inaktyvacijos sulėtėjimas gali būti apspręstas Cl^- kanalų buvimo aktyvioje būsenoje laiko pailgėjimo. Šiuo atveju acetilcholinai gali turėti ir inhibuojantį poveikį, lėtinamas dalyvaujančių ląstelių sužadiniame Cl^- kanalų inaktyvaciją (Gong & Bisson, 2002). Kita vertus, padidėjusios Ca^{2+} koncentracijos palaikymas galėtų prailginti nuo Ca^{2+} priklausomų Cl^- kanalų buvimo aktyvioje būsenoje laiką (Beilby & Shepherd 2006b). Ca^{2+} jonai gali būti šalinami iš ląstelės dviem būdais. Manoma, kad $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporto fiziologinė funkcija yra pašalinti iš citoplazmos po signalo padidėjusį Ca^{2+} kiekį, o Ca^{2+} -ATPazės užtikrina pastovų žemą Ca^{2+} koncentracijos lygį citoplazmoje (Hirschi, 2001). Todėl mūsų parodytas VP išplatėjimas po DCCD panaudojimo taip pat gali būti aiškinamas tuo, kad padidėjusi Ca^{2+} koncentracija ląstelėje būna ilgesnį laiką, o

tuo pačiu prailgėja nuo Ca^{2+} priklausomų Cl^- kanalų buvimas aktyvioje būsenoje.

5.2. Acetilcholinesterazės aktyvumas menturdumblių ląstelėse

Fermentas acetilcholinesterazė (AChE), skaidantis ACh, buvo aptiktas daugelyje augalų (Sagane et al., 2005; Momonoki, 1997). AChE aktyvumas menturdumbliuose buvo nustatytas dar 1962 m. Buvo parodyta, kad *Nitella flexilis* AChE hidrolizinis aktyvumas yra $6,5 \mu\text{M/g/h}$. (Dettbarn, 1962). Mūsų rezultatai ne tik patvirtina AChE egzistavimą *Nitella flexilis* ląstelėse (4.8 sk.), bet ir parodo, kad šis fermentas gali būti išskirtas ir iš *Nitellopsis obtusa* menturdumblių (4.10 - 4.11 sk.). Galima daryti prielaidą, kad acetilcholinesterazės inhibitoriai, slopindami šį fermentą, didina acetilcholino kiekį apoplaste, tuo pačiu palengvina jo prisijungimą prie membranos arba patekimą į citoplazmą. Daugumoje augalų AChE aktyvumas buvo stebimas ląstelės sienelėje, tačiau buvo nustatytas ir apoplaste bei ląstelės viduje (Fluck & JaVe, 1974c; Fletcher et al., 2004). Didelės koncentracijos ACh poveikis taip pat gali būti aiškinamas AChE aktyvumu. Mūsų tyrimuose maksimalus ACh poveikis buvo gautas veikiant ląsteles 5mM ACh tirpalu. *Chara coralina* atveju didžiausias poveikis buvo stebimas nuo 1 iki 10 mM ACh tirpaluose (Gong & Bisson, 2002). Buvo parodyta, kad įvairių augalų AChE aktyvumas buvo stimuliuojamas ACh koncentracijai esant mažesnei nei 0.5 mM, bet jei ACh koncentracija buvo 1-6 mM, buvo stebima AChE inhibicija (Wiśniewska & Tretyn, 2003). Ilgindami ACh veikimo trukmę taip pat stebėjome poveikio stiprinimo efektą (4.7 sk.).

Yra žinoma, kad fermentinis AChE aktyvumas gali būti veikiamas tam tikrų ksenobiotinių medžiagų, pavyzdžiui metalų. Buvo parodyta, kad Cd^{2+} inhibuoja AChE aktyvumą *in vitro* (Frasco et al., 2005). Atlikę *Nitellopsis obtusa* ląstelių membraninio potencialo tyrimus galime daryti prielaidą, kad Cd^{2+} inhibuoja AChE *in vivo* (4.10 sk.). Tačiau yra žinoma, kad Cd^{2+} pasižymi toksiniu poveikiu ląstelėms (Cobbett & Goldsbrough, (2002). Paveikus

Nitellopsis obtusa ląsteles 0.1 mM arba 1 mM Cd^{2+} tirpalais, prasidėjo stipri membraninio potencialo depoliarizacija. Šis efektas gali būti aiškinamas poveikiu elektrogenezėje dalyvaujančių membranų pernašos sistemų laidumui (Karcz & Kurtyka, 2007; Astolfi et al., 2005; Moran et al., 1990). Literatūros duomenimis, buvo nustatytas stiprus kadmio poveikis kalcio pernašos sistemoms ir kalcio kiekio citoplazmoje reguliavimui *Arabidopsis* suspensijos ląstelėse (Perfus-Barbeoch, 2002). Mūsų eksperimentų metu stebėtas VP amplitudės mažėjimas dėl Cd^{2+} poveikio taip pat gali būti aiškinamas pasikeitusiu citoplazminio Ca^{2+} kiekio reguliavimu. Tačiau yra manoma, kad augalai gali turėti tam tikrą apsauginį mechanizmą ir tam tikrą koncentracijų ribose sugeba neutralizuoti toksinį Cd^{2+} poveikį (Cobbett & Goldsbrough 2002). Mes nustatėme, kad tokia slenkstinė neutralizuojama Cd^{2+} koncentracija *Nitellopsis obtusa* ląstelėse, kurių membraninis potencialas neigiamesnis nei -220 mV, yra 20 μM . Mes padarėme prielaidą kad labai neigiamą membraninį potencialą turinčiose ląstelėse kelias valandas trunkančiuose eksperimentuose 20 μM Cd^{2+} tirpalas inhibuoja AChE, o membranų pernašos sistemos nėra veikiamos. ACh ir ACh + 20 μM Cd^{2+} tirpaluose membraninis potencialas VP serijos metu kito pagal tą patį dėsnį (4.16 pav.). Galime daryti prielaidą, kad yra veikiami tie patys jonų pernašos procesai, tik kadmio stiprina acetilcholino veikimą. Panaudojus specifinį AChE inhibitorių neostigmino bromidą, kuris pats neįtakoja membraninio potencialo dinamikos, nustatėme, kad taip pat yra veikiamas antrojo VP amplitudė. Mes parodėme kad tiek Cd^{2+} , tiek NB stiprina depoliarizuojantį ACh poveikį membraniniam potencialui po pirmojo stimulo (4.21 pav.).

4.3. Augalų cholinerginės sistemos dalyvavimas signalų perdavime

Paveikus *Nitellopsis obtusa* ląsteles mikromolinės koncentracijos nikotino tirpalais taip pat buvo stebima membraninio potencialo depoliarizacija, poveikis antrajam VP ir dvigubi atsakai, vadinasi nikotinas veikia panašiai kaip 5 mM ACh, tik žymiai mažesnėmis koncentracijomis (4.12 sk.). Fiksuotos

įtampos/srovės metodu nustatytas 4 mM Ach ir 6 mM nikotino sinergistinis poveikis chloro kanalų atidarymo tikimybei *Chara* ląstelėse (Gong & Bisson, 2002), bet šiame darbe nikotino poveikis membraniniam potencialui nebuvo tirtas. Mūsų tyrime gauti nikotino poveikio rezultatai taip pat patvirtina galimą AChE egzistavimą menturdumblių ląstelėse. Be to, šie rezultatai neprieštaruoja nuomonei, kad menturdumblių ląstelių membranoje galėtų būti ACh prisijungiančios sritys ir leidžia daryti prielaidą, kad jei *Nitellopsis obtusa* ląstelėse egzistuoja ACh receptoriai, jie yra nikotininiai.

Acetilcholino receptorių buvimas parodytas *Vicia faba* žiotelėse. Jie apibūdinti kaip nikotininiai ACh receptoriai (Wang, 1998) ir metabotropiniai muskarininiai acetilcholino receptoriai (Meng et al., 2004), o kviečių lapų ląstelėse aptinkami acetilcholino kanalai, įvardinami kaip nikotininiai ACh receptoriai (Madhavan & Pinkerton, 1997).

Po nikotino poveikio sąlygotos depoliarizacijos stebėtas ląstelių spontaninis aktyvumas ir tolimesnė palaipsninė membraninio potencialo depoliarizacija buvo grįžtama, kitaip nei Cd^{2+} atveju (4.12 ir 4.9 sk.). Todėl galima daryti išvadą, kad nei ACh, nei nikotinas nepasižymi toksiniu poveikiu *Nitellopsis obtusa* ląstelėms.

VP amplitudė, trukmė, jonų srautų ir dinamikos kitimas VP serijos generavimo metu ne tik turi fiziologinę prasmę bet ir gali būti naudojama tam tikrų medžiagų nustatymui ar stebėsenai. VP gali ne tik atspindėti įvairių medžiagų poveikį, bet potencialų serijos generavimas gali pagreitinti ląstelių žūtį (Shepherd, 2008). Todėl kuo neigiamesnis membraninis potencialas, tuo menturdumblių ląstelės yra atsparesnės įvairių medžiagų toksiniam poveikiui. Yra manoma (Shabala et al., 2006), kad augalijos pasaulyje informacijos apie aplinką kodavimui gali būti naudojama ne tik signalo amplitudės moduliacija, bet ir signalų dažnis. Gali būti, kad ląstelės palaikymas labiau depoliarizuotoje būsenoje po pirmojo VP veikiant ACh turi fiziologinę prasmę. Pavyzdžiui, depoliarizacija antrojo VP metu nuo teigiamesnio membraninio potencialo reikalaus mažiau ląstelės energetinių resursų. Gal būt tik po antrojo VP ląstelės citoplazmoje yra sukaupiamas pakankamas Ca^{2+} kiekis, kad ląstelėje būtų

iššaukiamas fiziologinis atsakas. Būtent dviejų, tam tikru kritiniu intervalu atskirtų VP būtinumas *Dionaea sp.* lokomotorinėse reakcijose yra gerai įrodytas (Trebacz et al., 1996, Volkov et al., 2008). Yra įmanoma, kad dviejų VP dalyvavimas fiziologiniuose atsakuose būdingas ir kitoms augalų rūšims. Tokiu būdu mūsų pastebėtas ACh poveikis antrajam VP gali rodyti ACh dalyvavimą elektriniame signalų perdavimo mechanizme.

6. IŠVADOS

1. Acetilcholiną aktyvina pagrindines menturdumblių membraninio potencialo genezėje dalyvaujančias jonų pernašos sistemas - K^+ kanalus ramybės būsenoje ir fotoindukcinę reakciją *Nitella flexilis* ląstelėse bei Cl^- ir Ca^{2+} kanalus sužadavimo metu *Nitellopsis obtusa* ląstelėse.
2. Acetilcholiną ir nikotinas ilgina veikimo potencialų repoliarizacijos trukmę.
3. Acetilcholinesterazės inhibitoriai - dimetoatas, Cd^{2+} ir neostigmino bromidas - stiprina acetilcholino poveikį menturdumblių ląstelių membranų elektrofiziologiniams parametrams.
4. Acetilcholiną ir nikotinas didina menturdumblių *Nitellopsis obtusa* ląstelių jaudrumą.
5. Įvairių cheminių medžiagų sąlygota membraninio potencialo depoliarizacija, pasiekus sužadavimo slenkstį, sukelia *Nitellopsis obtusa* ląstelių spontaninį aktyvumą.

7. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, Hedrich R. (2000). GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, isaK^+ -selective, K^+ -sensing ion channel. *FEBS Lett.* **486**, 93–98.
2. Alexandre J., Lassalles J.P. and Kado R.T. (1990). Opening of Ca^{2+} -channels in isolated red beet vacuole membrane by inositol-1,4,5-triphosphate. *Nature.* **343**, 567–570.
3. Allen GJ, Muir SR, Sanders D. (1995). Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both InsP_3 and cyclic ADP-ribose. *Science.* **268**, 735–737.
4. Andjus P. R. (1998). Harvesting the biophysical field of the 'green axon'. *Jugoslav.physiol .pharmacol. acta.* **34** (1), 1-9.
5. Astolfi S., Zuchi S., Passera C. (2005). Effect of cadmium on H^+ -ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from roots of different S-supplied maize (*Zea mays L.*) plants. *Plant Sci.* **169**, 361-368.
6. Axelsen, K.B., and Palmgren, M.G. (2001). Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**, 696–706.
7. Ballal S, Ellias R, Fluck R, Jameton R, Leber P, Lirio R, Salama D. (1993). The synthesis and bioassay of indole-3-acetylcholine. *Plant Physiol Biochem.* **31**, 249–255.
8. Balushka F., Mancuso S., Volkmann D., Baklou P.(2004). Root apices as plant command centres: the unique „brain – like“ status of the root apex transition zone. *Biologia, Bratislava,* **59** (13), 7 – 19.
9. Barbier-Brygoo H., Vinauger M., Colcombet J., Ephritikhine G., Frachisse J.-M., Maurel C. (2000). Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1465**, 199-218.
10. Baudenbacher F., Fong L. E., Thiel G., Wacke M., Jazbinsek, V. Holzer, J. R., Stampfl A, and Trontelj Z. (2005). Intracellular Axial Current in *Chara*

- corallina* Reflects the Altered Kinetics of Ions in Cytoplasm under the Influence of Light. *Biophys J.* **88**(1), 690–697.
11. Baxter I, Tchieu J, Sussman MR, Boutry M, Palmgren M, Gribskov M, Cosgrove DJ, Hedrich R. (1991). Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba L.* *Planta.* **186**, 143–153.
 12. Beilby M. J. (2007). Action potential in Charophytes, *Int.Rev. Cytol.* **257**, 43-82.
 13. Beilby M. J. (2007a) Modeling Oscillations of Membrane Potential Difference. In: Mancuso S. and Shabala S (Eds.). *Rhythms in Plants: Phenomenology, Mechanisms, and Adaptive Significance*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 341-355.
 14. Beilby M.J. & Shepherd V.A. (2006b) The characteristics of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels of the salt-tolerant charophyte *Lamprothamnium*. *Plant, Cell & Environment.* **29**, 764–777.
 15. Berecki, G., Eijken, M., Van Iren, F. and Van Duijn, B. (2001) Tonoplast anion channel activity modulation by pH in *Chara corallina*. *J. Membr. Biol.* **184**, 131–141.
 16. Berecki, G., Varga, Z., Van Iren, F. and Van Duijn, B. (1999) Anion channels in *Chara corallina* tonoplast membrane: calcium dependence and rectification. *J. Membr. Biol.* **172**, 159–168.
 17. Blakeley S.D., Thomas B., Hall J.L. and Vince-Prue D. (1983). Regulation of swelling of etiolated-wheat-leaf protoplasts by phytochrome and gibberellic acid. *Planta.* **158**, 416-421.
 18. Blatt M.R. (2004). Membrane transport in plants. *Annual Plant Reviews.* **15**, 72 -92.
 19. Braun M, Foissner I., Lühring H., Schubert H. and Thiel G. (2007) Characean Algae: Still a Valid Model System to Examine Fundamental Principles. *Plants Progress in Botany.* **68**, 193-220.

20. Cobbett C., Goldsbrough P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **53**, 159-182.
21. Conn P. J., Jones C. K. and C. W. Lindsley. (2009). Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders. *Trends in Pharmacological Sciences.* **30** (3), 148-155.
22. Czempinski K, Gaedeke N, Zimmermann S and Muller-Rober B. (1999). Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *Journal of Experimental Botany.* **50**, 955-966.
23. Daram P, Urbach S, Gaymard F, Sentenac H, Cherel I. (1997). Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. *EMBO Journal* **16**, 3455–3463.
24. Davies E. (2004). New functions for electrical signals in plants. *New Phytologist.* **161** (3), 607-610.
25. Demidchik V, Maathuis FJM. (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist.* **175**, 387–404.
26. Dettbarn W.D. (1962). Acetylcholinesterase activity in *Nitella*. *Nature.* **194**, 1175-1176.
27. DUBY G. & Boutry M. (2009). The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Eur J Physiol* **457**, 645–655.
28. Dziubinska H, Trebacz K, Zawadzki T. (1989) The effect of excitation on the rate of respiration in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Physiol Plant.* **75**, 417–423.
29. Dziubinska, H., Filek, M., Koscielniak, J., and Trebacz, K. (2003). Variation and Action Potentials Evoked by Thermal Stimuli Accompany Enhancement of Ethylene Emission in Distant Non-Stimulated Leaves of *Vicia faba minor* Seedlings, *J. Plant Physiol.* **160**, 1203–1210.
30. Fisahn J, Herde O, Willmitzer L, Pena-Cortes H. (2004). Analysis of the Transient Increase in Cytosolic Ca²⁺ during the Action Potential of Higher

- Plants with High Temporal Resolution: Requirement of Ca^{2+} Transients for Induction of Jasmonic Acid Biosynthesis and PINII Gene Expression. *Plant and Cell Physiology*. **45**(4), 456–459.
31. Fletcher S. P., Geyer B. C., Smith A., Evron T., Joshi L., Soreq H. and Mor T. S. (2004). Tissue distribution of cholinesterases and anticholinesterases in native and transgenic tomato plants. *Plant Molecular Biology*. **55**, 33–43.
 32. Fluck R. A & Jaffe M. J. (1974a) Cholinesterase from plant tissues. III. Distribution and subcellular localization in *Phaseolus aureus* Roxb. *Plant Physiol.* **53**, 752–758.
 33. Fluck R. A. & Jaffe M. J. (1974b). Cholinesterases from Plant Tissue.V. Cholinesterase Is Not Pectin Esterase. *Plant Physiol.* **54**(5), 797–798.
 34. Fluck R. A. & Jaffe M. J. (1974c) The distribution of cholinesterases in plant species. *Phytochemistry*. **13**, 2475–2480.
 35. Fluck R. A. & Jaffe M. J. (1975) Cholinesterase from plant tissues. VI. Preliminary characterization of enzymes from *Solanum melongena* L. and *Zea mays* L. *Biochim Biophys Acta*. **410**, 130–134.
 36. Frasco M.F., Fournier D., Carvalho F., Guilhermino L. (2005). Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*. **10**, 360-375.
 37. Fromm J. & Fei H. (1998). Electrical signaling and gas exchange in maize plants of drying soil. *PlantSci*. **132**, 203–213.
 38. Fromm J. & Lautner S. (2005). Characteristics and functions of phloem-transmitted electrical signals in higher plants. In: Baluska F, Mancuso S, Volkmann D (eds) *Communication in plants—neuronal aspects of plant life*. Springer, Berlin Heidelberg New York.
 39. Fromm J. & Lautner S. (2007). Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, Cell and Environment*. **30**, 249–257.
 40. Fromm J. and Spanswick R. (1993). Characteristics of Action Potentials in Willow (*Salix viminalis* L.). *Journal of Experimental Botany*. **44**, (264), 1119-1125.

41. Gaitonde D, Sarkar A, Kaisary S, Silva CD, Dias C, Rao DP, Ray D, Nagarajan R, De Sousa SN, Sarker S, Patill D. (2006). Acetylcholinesterase activities in marine snail (*Cronia contracta*) as a biomarker of neurotoxic contaminants along the Goa coast, West coast of India. *Ecotoxicology*. **15**, 353–358.
42. Gambale, F. and Uozumi, N. (2006). Properties of shaker-type potassium channels in higher plants. *J. Membr. Biol.* **210**, 1-19.
43. Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, Bouchez D, Bruneau D, et al. (1998). Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell*. **94**, 647–55.
44. Ge'vaudant F., Duby G., von Stedingk E., Zhao R., Morsomme P., and Boutry M. (2007). Expression of a Constitutively Activated Plasma Membrane H⁺-ATPase Alters Plant Development and Increases Salt Tolerance. *Plant Physiology*. **144**, 1763–1776.
45. Gong X. -Q., Bisson M. A., (2002). Acetylcholine-activated Cl⁻ Channel in the Chara Tonoplast. *J. Membrane Biol.* **188**. 107-113.
46. Gradmann D., Hoffstadt J. (1998) Electrocoupling of Ion Transporters in Plants: Interaction with Internal Ion Concentrations. *J. Membrane Biol.* **166**, 51–59.
47. Grams T E. E, Lautner S., Felle H. H., Matyssek R. & Fromm J. (2009). Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf. *Plant, Cell & Environment*. **32**(4), 319–326.
48. Greppin, H. & Horowitz. B. A. (1975). Floral induction and the effect of red and far-red preillumination on the light-stimulated bioelectric response of spinach leaves. *Z. t'flanzenphysiol.* **75**: 243-249.
49. Gupta A, Thakur S. S., Uniyal P.L., Gupta R. (2001). A survey of bryophytes for presence of cholinesterase activity. *American Journal of Botany*. **88**(12), 2133–2135.
50. Gupta A. and Gupta R. (1997). A survey of plants for presence of cholinesterase activity. *Phytochemistry*. **46**, 827–831.

51. Gupta, A., M. R. Vijayaraghavan, Gupta. R. (1998). The presence of cholinesterase activity in marine algae. *Phytochemistry*. **49**, 1875–1877.
52. Hadačová V., Vacková K., Klozová E., Kutáček M., Pitterová K. (1983) Cholinesterase activity in some species of the *Allium* genus. *Biol. Plant*. **25**, 209-215.
53. Hamilton DW, Hills A, Kohler B, Blatt MR. (2000). Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 4967–72.
54. Hamilton, D. W. A., Hills, A., and Blatt, M. R. (2001). Extracellular Ba²⁺ and voltage interact to gate Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells *FEBS Letters*. **491** (1), 99-103.
55. Harper J. F., Axelsen K. B. (2003) Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*. **132**, 618–628.
56. Hartmann E., Gupta R. (1989). Acetylcholine as a signaling system in plants. In: *Second Messengers in Plant Growth and Development*, ed. by W.E. Boss, D.J. Marre, A.R. Liss, Alan R. Liss Inc., Oxford: 257-288.
57. Hartmann E., Kilbinger K. (1974a). Gas-liquid chromatographic determination of light-dependent acetylcholine concentration in moss callus. *Biochem. J*. **137**, 249-252.
58. Hartmann E., Kilbinger K. (1974b). Occurrence of light-dependent acetylcholine concentrations in higher plants. *Experientia*. **30**, 1387-1388.
59. Hedrich R, Neher E. (1987). Cytoplasmic calcium regulates voltage-dependent ion channels in plant vacuoles. *Nature*. **329**, 833–836.
60. Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd edition, Sinauer (Sunderland, MA).
61. Hirschi K. (2001). Vacuolar H⁺/Ca²⁺ transport: who's directing the traffic? *Trends Plant Sci*. **6**, 100-104.
62. Hodick D, Sievers A. (1988). The action potential of *Dionaea muscipula* Ellis. *Planta*. **174**, 8–18.

63. Horiuchi Y, Kimura R, Kato N, Fujii T, Seki M, Endo T, Kato T, Kawashima K. (2003). Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sci.* **72**, 1745–1756.
64. Itier V., Bertrand D. (2001). Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function. *FEBS Letters.* **504**, 118-125.
65. Jaffe M.J. (1970). Evidence for the regulation of phytochrome-mediated process in bean roots by the neurohumor, acetylcholine. *Plant Physiol.* **46**, 768-777.
66. Johnson B. R., Wyttenbach R. A., Wayne R., Hoy R. R. (2002). Action potentials in a giant algal cell: a comparative approach to mechanisms and evolution of excitability. *The Journal of Undergraduate Neuroscience Education.* **1**(1), 23-27.
67. Johnson R. Bruce, Wyttenbach A. Robert, Wayne Randy and Hoy R. Ronald. (2002). Action potentials in a giant algal cell: a comparative approach to mechanisms and evolution of excitability. *The Journal of Undergraduate Neuroscience Education.* **1**(1), A23-A27.
68. Karcz W., Kurtyka R. (2007). Effect of cadmium on growth, proton extrusion and membrane potential in maize coleoptile segments. *Biol. Plantarum.* **51**, 713-719.
69. Kasturi R., Vasantharajan V.N. (1976). Properties of acetylcholinesterase from *Pisum sativum*. *Phytochemistry.* **15**, 1345–1347.
70. Kawashima K, Misawa H, Moriwaki Y, Fujii YX, Fujii T, Horiuchi Y, Yamada T, Imanaka T, Kamekura M. (2007). Ubiquitous expression of acetylcholine and its biological functions in life forms without nervous systems. *Life Sciences.* ume **80** (24-25), 2206-2209.
71. Kikuyama, M. (1986). Tonoplast action potential of Characeae. *Plant Cell Physiol.* **27**, 1461–1468.
72. Kishibayashi A, Ishii A, Karasawa A. (1994). Inhibitory effects of KW-5092, a novel gastroprokinetic agent, on the activity of acetylcholinesterase in guinea pig ileum. *Jpn J Pharmacol.* **66**, 397–403.

73. Kishimoto U., Kami-ike N., Takeuchi Y. and Ohkawa T. (1984). "A kinetic analysis of the electrogenic pump of *Chara corallina*: 1. Inhibition of the pump by DCCD", *J. Membr. Biol.* **80**, 175–183.
74. Knight H. & Knight M. R. (2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends In Plant Science.* **6**(6), 262-267.
75. Koziol C, Grams TEE, Schreiber U, Matyssek R, Fromm J. (2004). Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals. *New Phytologist.* **161**, 715-722.
76. Krol E. and Trebacz K. (2000). Ways of Ion Channel Gating in Plant Cells. *Annals of Botany.* **86**, 449-469.
77. Lautner S., Grams T. E., Matyssek R., Fromm J. (2005) Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis. *Plant Physiol.* **138**, 2200–2209.
78. Lees, G. L., Thompson, J. E. (1975). The effects of germination on the subcellular distribution of cholinesterase in cotyledons of *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia plantarum.* **34**, 230-237.
79. Linder B, Raschke K. (1992). A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing. *FEBS Lett.* **313**, 27–30.
80. Llamas A., Ullrich C. and Sanz A. (2000). Cd²⁺ effects on transmembrane electrical potential difference, respiration and membrane permeability of rice (*Oryza sativa* L) roots. *Plant and Soil.* **219**, 21–28.
81. Lunevsky V. Z., Zherelova O. M., Vostrikov I. Y., Berestovsky, G. N. (1983) Excitation of Characeae cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels. *J. Membr. Biol.* **72**, 43-58.
82. Maathuis F. (2004). Ligand – gated ion channels, in Membran transport in plants. Annual Plant Reviews (eds. M. R. Blatt). Blackwell Publishing, **15**, 193 – 221.
83. Madhavan S. and Pinkerton S. T. (1997). Do plant cells have the receptor for acetylcholine? Immunodetection of acetylcholinesterase and acetylcholine receptor in leaf cells. *Plant Physiol.* **114**, 3–4.

84. Madhavan S., Sarath G., Lee B. H. and Pegden R. S. (1995). Guard cell protoplasts contain acetylcholinesterase activity. *Plant Sci.* **109**, 119–127.
85. Maeshima M. (2000). Vacuolar H₂-pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1465**, 37-51.
86. Mansfield D. H., Webb G., Clark D. G., Taylor I. P. (1978). Partial purification and some properties of a cholinesterase from bush bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots. *Biochem. J.* **175**, 769–777.
87. Martinoia E., Maeshima M. and Neuhaus H. E. (2007). Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany.* **58**(1), 83-102.
88. McAinsh M. R. and Pittman J. K. (2009). Shaping the calcium signature. *New Phytologist.* **181**, 275–294.
89. McCourt R. M., Delwiche C. F. and Karol K. G. (2004). Charophyte algae and land plant origins. *Trends in Ecology & Evolution.* **19**(12), 661-666.
90. Meng F., Miao L., Zhang S., Lou C. (2004). Ca²⁺ is involved in muscarine-acetylcholine-receptor- mediated acetylcholine signal transduction in guard cells of *Vicia faba* L. *Chinese Science Bulletin.* **49** (5), 471-475.
91. Mimura T. (1995). Physiological characteristics and regulation mechanisms of the H⁺ pumps in the plasma membrane and tonoplast of characean cells. *J.Plant.Res.* **108**, 249–256.
92. Miura G. A., Broomfield C. A., Lawson M. A., Worth- Icy E.G. (1982). Widespread occurrence of cholinesterase activity in plant leaves. *Physiol. Plant.*, **56**, 28-32.
93. Miura G. A., Shih T.-M. (1984). Cholinergic constituents in plants: Characterization and distribution of acetylcholine and choline. *Physiol. Plant.*, **61**, 417-421.
94. Miyazawa A., Fujiyoshi Y., Unwin N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423** (6943), 949–55.
95. Momonoki Y. S. (1992) Occurrence of acetylcholine-hydrolyzing activity at the stele-cortex interface. *Plant Physiol.* **99**, 130–133.

96. Momonoki Y. S. (1997). Asymmetric distribution of acetylcholinesterase in gravistimulated maize seedlings. *Plant Physiol.* **114**, 47–53.
97. Momonoki Y. S., Momonoki T. (1993) Changes in acetylcholine-hydrolyzing activity in heat-stressed plant cultivars. *Jpn J Crop Sci.* **62**, 438–446.
98. Momonoki Y. S., Momonoki T. (1991). Changes in acetylcholine levels following leaf wilting and leaf recovery by heat stress in plant cultivars. *Jpn. J. Crop. Sci.*, **60**, 283-290.
99. Momonoki Y. S., Momonoki T. (1992). The influence of heat stress on acetylcholine content and its hydrolyzing activity in *Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro. *Jpn. J. Crop. Sci.*, **61**, 112-118.
100. Moran N., Fox D., Satter R. L. (1990). Interaction of the depolarization-activated K⁺ channel of *Samanea saman* with inorganic ions: a patch-clamp study. *Plant Physiol.* **94**, 424-431.
101. Navazio, L., Bewell, M. A., Siddiqua, A., Dickinson, G. D., Galione, A., Sanders, D. (2000). Calcium release from the endoplasmic reticulum of higher plants elicited by the NADP metabolite nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate Source. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **97**, 8693-8698.
102. Navazio, L., Mariani, P., Sanders, D. (2001). Mobilization of Ca²⁺ by cyclic ADP-ribose from the endoplasmic reticulum of cauliflower florets. *Plant Physiology.* **125**, 2129-2138.
103. Okihara K., Ohkawa T., Tsutsui I. and Kasai M. A. (1991). Ca²⁺- and Voltage-Dependent Cl⁻-Sensitive Anion Channel in the *Chara* Plasmalemma: A Patch-Clamp Study. *Plant and Cell Physiology.* **32** (5), 593-601.
104. Palmgren M. G. (2001). Plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 817-845.
105. Pandey S, Zhang W, Assmann S. M. (2007). Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Lett.* **581**, 2325–36.

106. Perfus-Barbeoch L., Leonhardt N., Vavasseur A., Forestier C. (2002). Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J.* **32**, 539-548.
107. Plieth C., Hansen U.P. (1996). Methodological aspects of pressure loading of fura-2 in Characean cells. *J. Exp. Bot.* **47**, 1601-1612.
108. Portillo F. (2000). Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta.* **10**, 31-42.
109. Pottosin I. I. and Schönknecht G. (2007). Vacuolar calcium channels. *Journal of Experimental Botany.* **58**, (7), 1559-1569.
110. Pottosin I. I., Tikhonova L. I., Hedrich R., Schönknecht G. (1997). Slowly activating vacuolar ion channel cannot mediate Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *Plant Journal.* **12**: 1387–1398.
111. Purves R.D. (1981). Microelectrode methods for intracellular recording and ionophoresis, Academic Press, London.
112. Putrenko I., Zakikhani M., and Dent J. A. (2005). A Family of Acetylcholine-gated Chloride Channel Subunits in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **280** (8), 6392-6398.
113. Pyatygin S. S., Opritov V. A., Abramova N. N. and Vodeneev V. A. (1999). Primary Bioelectric Response of Higher Plant Cells to the Combined Action of Stress Factors. *Russian Journal of Plant Physiology.* **46** (45), 30–536.
114. Pyatygin S. S., Opritov V. A., Vodeneev V. A. (2008). Signaling Role of Action Potential in Higher Plants. *Fiziologiya Rastenii.* **55** (2), 312–319.
115. Qi Z., Stephens N. R., Spalding E. P. (2006). Calcium entry mediated by GLR3.3, an Arabidopsis glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiol.* **142**, 963–71.
116. Rea P. A., Poole R. J. (1993). Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 157–180.
117. Riov J. and Jaffe M. J. (1973). Cholinesterase from plant tissues. I. Purification and characterization of a cholinesterase from mung bean roots. *Plant Physiol.* **51**, 520–528.

118. Roberts S. K. (2006). Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytologist*. **169**, 647–666.
119. Roshchina V. V. (2001). Neurotransmitters in plant life, Science publishers, USA.
120. Roshchina, V. V. (1987). Action of acetylcholine agonists and antagonists on reactions of photosynthetic membranes. *Photosynthetica* **21**, 296-300.
121. Sagane Y., Nakagawa T., Yamamoto K., Michikawa S., Oguri S., and Momonoki Y. S. (2005). Molecular Characterization of Maize Acetylcholinesterase. A Novel Enzyme Family in the Plant Kingdom. *Plant Physiol.* **138** (3), 1359–1371.
122. Sanders D., Brownlee C., Harper J. F. (1999). Communicating with calcium . *Plant Cell*. **11** (4), 691–706.
123. Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., Harper, J. F. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*. **14**, 401-417.
124. Schmidt C., Schroeder J. I. (1994). Anion selectivity of slow anion channels in the plasma membrane of guard cells (large nitrate permeability). *Plant Physiol.* **106**, 383–91.
125. Schroeder J. I. (1988). K⁺ transport properties of K⁺ channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *J. Gen. Physiol.* **92**, 667–83.
126. Shabala S. (2003). Regulation of Potassium Transport in Leaves: from Molecular to Tissue Level. *Annals of Botany*. **92**, 627-634.
127. Shabala S., Shabala L., Gradmann D., Chen Z., Newman I., Mancuso S. (2006). Oscillations in plant membrane transport: model predictions, experimental validation, and physiological implications. *J. Exp. Bot.* **57**, 171-184.
128. Shepherd V. A., Beilby M. J., Al Khazaaly S., Shimmen T. (2008). Mechano-perception in *Chara* cells: the influence of salinity and calcium on touch-activated receptor potentials, action potentials and ion transport. *Plant Cell Environ.* **31**, 1575-1591.

129. Shiina, T. and Tazawa, M. (1986). Action Potential in *Luffa cylindrica* and Its Effects on Elongation Growth. *Plant Cell Physiol.* **27**, 1081–1089.
130. Shimmen T., Mimura T., Kikuyama M., Tazawa M. (1994). Characean cells as a tool for studying electrophysiological characteristics. *Cell struct.funct.* **19**, 263-278.
131. Sletten D. M., Nickander K. K., Low P. A. (2005). Stability of acetylcholine chloride solution in autonomic testing. *Journal of the Neurological Sciences.* **234**, 1-3.
132. Sokolik A. I. and Yurin V. M. (1986). Potassium Channels in Plasmalemma of *Nitella* Cells at rest. *J. Membr. Biol.* **89**, 9–22.
133. Sondergaard T. E. Schulz A. and Palmgren M. G. (2004). Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.* **136**, 2475–2482.
134. Standaert F. (1990) Neuromuscular physiology. In R Miller, ed, Anesthesia. Churchill-Livingstone, New York, 650–684.
135. Stankovic B., Davies E. (1997). Intercellular communication in plants: electrical stimulation of proteinase inhibitor gene expression in tomato. *Planta.* **202**, 402–406.
136. Sunarpi, Horie T., Motoda J., Kubo M., Yang H., Yoda K., Horie R., Chan W.Y., Leung H.Y., Hattori K., Konomi M., Osumi M., Yamagami M., Schroeder J.I., Uozumi N. (2005). Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology.* **44**(6), 928-38.
137. Sze H., Li X., and Palmgren M. G. (1999). Energization of Plant Cell Membranes by H-Pumping ATPases: Regulation and Biosynthesis. *Plant Cell.* **11**, 677-690.
138. Tabata T. and Sibaoka T. (1987). Conduction Velocity and Blockage of Action Potential in *Chara* Internodal Cells. *Plant and Cell Physiology.* **28** (7), 1187-1194.

139. Tanner W., Caspari, T. (1996). Membrane transport carriers. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 595-626.
140. Tester M. (1990). Plant ion channels: whole-cell and single channel studies. *New Phytol.* **114**, (5), 305-340.
141. Thiel G., Homann U., Plieth C. (1997). Ion channel activity during the action potential in *Chara*: a new insight with new techniques. *J. Exp. Bot.* **48**, 609-622.
142. Thuleau P., Ward J. M., Ranjeva R., Schroeder J. I. (1994). Voltage-dependent calcium-permeable channels in the plasma membrane of a higher plant cell. *EMBO J.* **13**:2970–75.
143. Tikhonova L. I., Pottosin I. I., Dietz K-J, Schönknecht G. (1997). Fast-activating cation channel in barley mesophyll vacuoles. Inhibition by calcium. *Plant Journal.* **11**, 1059–1070.
144. Trebacz K., Busch M. B., Hejnowicz Z., Sievers A. (1996), Cyclopiazonic acid disturbs the regulation of cytosolic calcium when repetitive action potentials are evoked in *Dionaea* traps. *Planta.* **198**, 623-626.
145. Trebacz K., Schonknecht G., Dziubinska H. and Hanaka A. (2007). Characteristics of Anion Channels in the Tonoplast of the Liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant Cell Physiol.* **48**(12), 1747–1757.
146. Tretyn A. (1987). Influence of red light and acetylcholine on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by oat coleoptile cells. *Cell Biol. Int. Rep.* **11**, 887-896.
147. Tretyn A. and Kendrick R. E. (1991). Acetylcholine in plants: presence, metabolism and mechanism of action. *Bot. Rev.* **57**, 33–73.
148. Tretyn A., Kendrick R. E., Bossen M. E., and Vredenberg W. J. (1990). Influence of acetylcholine agonists and antagonists on the swelling of etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) mesophyll protoplasts. *Planta.* **182**, 473-479.
149. Tretyn A., Tretyn M. (1990). Oscillations of acetylcholine in oat seedlings. *Chronobiologia.* **17**, 45-52.

150. Tsutsui I. and Ohkawa T. (2001). Regulation of the H⁺ Pump Activity in the Plasma Membrane of Internally Perfused *Chara coralline*. *Plant Cell Physiol.* **42**, 531–537.
151. Vacková K., Kutáček M. and R. M.deAlmeida. (1984). Some properties of pea cholinesterase and its activity in plant parts at different growth stages. *Biologia plantarum.* **26**, 275-284.
152. Vahisalu T., Kollist H., Wang Y. F., Nishimura N., Chan W. Y., et al. (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature.* **452**, 487–91.
153. van Koppen C. J.; Kaiser B. (2003). Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol & Ther.* **98**, 197-220.
154. Very A.-A. and Sentenac H. (2003). Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 575–603.
155. Volkov A. G., Adesina T., Markin V. S. and Jovanov E. (2008). Kinetics and Mechanism of *Dionaea muscipula* Trap Closing. *Plant Physiology.* **146**, 694-702.
156. Volkov A. G., Collins D. J., Mwesigwa J. (2000). Plant electrophysiology: pentachlorophenol induces fast action potentials in soybean. *Plant Sci* **153**, 185–190.
157. Wang H., Wang X., Zhang S. and Lou C. (1998) Nicotinic acetylcholine receptor is involved in acetylcholine regulating stomatal movement. *Science in China Series C Life Sciences.* **41**(6), 650-656.
158. Ward J. M., Mäser P. and Schroeder J. I. (2009). Plant Ion Channels: Gene Families, Physiology, and Functional Genomics Analyses. *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 59–82.
159. Ward J. M., Schroeder J. I. (1994). Calcium-activated K⁺ channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *Plant Cell.* **6**, 669–83.

160. Wayne R. (1994). The excitability of plant cells: With a special emphasis on Characean internodal cells. *Bot. Rev.* **60**, 265-367.
161. Wessler I., Kilbinger H., Bittinger F., Unger R., Kirkpatrick C. J. (2003). The non-neuronal cholinergic system in humans: Expression, function and pathophysiology. *Life Sciences.* **72**. 2055–2061.
162. White, P.J. (2000). Calcium channels in higher plants. *Biochem. biophys. Acta.* **1465**, 171-189.
163. Wildon D. C., Thain J. F., Minchin P. E. H., Gubb I. R., Reilly A. J., Skipper Y. D., Doherty H. M., O'Donnell P. J., Bowles D. J. (1992). Electrical signal and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature.* **360**, 62–65.
164. Wiśniewska J. and Tretyn A. (1999). The effect on the level of acetylcholine in seedlings of the wild-type and phytochrome mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Acta Physiol. Plant.* **21**, 221–230.
165. Yamamoto K. and Momonoki Y. S. (2008). Subcellular localization of overexpressed maize AChE gene in rice plant. *Plant Signal Behav.* **3**(8), 576–577.
166. Yamamoto K., Oguri S., Momonoki Y. S. (2008). Characterization of trimeric acetylcholinesterase from a legume plant, *Macroptilium atropurpureum* Urb. *Planta.* **227**, 809-22.
167. Zawadzki T., Davies E., Dziubinska H., Trebacz K. (1991). Characteristics of action potentials in *Helianthus annuus* L. *Physiological Plantarum.* **83**, 601–604.
168. Zimmermann S., Ehrhardt T., Plesch G. and Müller-Roßber B. (1999). Ion channels in plant signaling. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 183–203.
169. Zimmermann S., Sentenac H. (1999). Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions. *Current Opinion in Plant Biology.* **2**, 477–482.
170. Юрин В.М., Соколик А.И., Кудряшов А.П. (1991). Регуляция функций мембран растительной клетки. – Минск: Навука і тэхніка, – 267 с.

171. Winšiewska J. and Tretyn A. (2003). Acetylcholinesterase activity in *Lycopersicon esculentum* and its phytochrome mutants. *J Plant Physiology and Biochemistry*.**41** (8), 711-717.

8. PUBLIKACIJOS

1. V. Kisnieriene, V. Sakalauskas. The effect of aluminium on bioelectrical activity of the *Nitellopsis obtusa* cell membrane after H⁺-ATPase inhibition. Central European Journal of Biology, 2007, Vol.2, No. 2, p. 222-232.
2. V. Kisnierienė, K. Beitas, V. Sakalauskas, A. Daktariūnas. Information technologies for biology education: computerized electrophysiology of plant cells. Informatics in education, 2008, Vol. 7, No.1, p. 91-104.
3. V. Kisnierienė, V. Sakalauskas, A. Pleskačiauskas, V. Yurin, O. Rukšėnas. The combined effect of Cd²⁺ and ACh on action potentials of *Nitellopsis obtusa* cells, Central European Journal of Biology, 2009, Vol. 4, No. 3, p. 343-350.

Publikacijos konferencijų medžiagose.

V. Kisnierienė. Bioelektriniai reiškiniai augaluose, Mokslas Gamtos Mokslų fakultete, 2006, p.84-92.

Юрин В.М., Сакалаускас В., Кисниериене В., Дитченко Т. И. Нейромедиаторы и их влияние на плазматическую мембрану растительных клеток. Международная конференция “Сигнальные механизмы регуляции физиологических функций”, Минск, 2007. стр. 328-330

В. Киснерене, В. Сакалаускас, М. Куйсис, О. Севрюкова: Използование характеристик потенциала действия клеток *Nitellopsis obtusa* для биологического тестирования кадмия. Международная конференция “Ксенобиотики и живые системы” Минск, 2008. стр. 61-63.

Publikacijos neįtrauktos į disertaciją

V. Kisnieriene, V. Sakalauskas: “Al³⁺ induced membrane potential changes in *Nitellopsis obtusa* cells”, *Biologija*, Vol 1, (2005), pp. 31-34.

Сакалаускас В., Кисниериене В. Изучение действия ионов Al³⁺ на электрические характеристики биомембран на модельной системе клетках харовой водоросли *Nitellopsis obtusa*, Материалы V международной конференции ”Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы”, Минск, 2007, стр. 317-319

Pranešimai konferencijose

Rokas Buišas, Vidmantas Sakalauskas, Vilma Kisnierienė. K-anestezijos ir mikroelektrodinio metodų taikymas tiriant Cd²⁺ ir Co²⁺ poveikį menturdumblio *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranų bioelektriniams parametrams, *Mokslas Gamtos mokslų fakultete*, 2006, p. 246-247.

Rokas Buišas, Vilma Kisnierienė. Automatizuotos duomenų rinkimo ir valdymo sistemos taikymas ląstelių membranų elektrinių parametrų matavimams, *Virtualūs instrumentai biomedicinoje*, 2007, p. 91-96.

Vilma Kisnierienė. The role of H⁺-ATPases activity in aluminium toxicity, Ninth international summer school on biophysics. *Supramolecular structure and function*, 2006, p. 137.

Vilma Kisnierienė, Vidmantas Sakalauskas. Influence of Al³⁺ on membrane bioelectrical parameters of *Nitellopsis obtusa* cell. Eighth Keele Meeting on Aluminium, Třešť, Czech Republic, 2009, p. 13-14.

Кудряшов А. П., Юрин В. М., Сакалаускас В., Киснерене В., Кишштейнер О. А. Влияние алкаидов *Nicotiana Tabacum* на возбудимые ионные каналы лазмалеммы клеток *Nitella Flexilis*. 5 международная научная конференция "Регуляция роста, развития и продуктивности растений" Минск, 2007, стр. 117.

В. Сакалаускас, Р. Буйшас, В. Киснерене. Влияние кадмия и кобальта на параметры потенциала действия клеток *Nitellopsis obtusa*. Материалы 3 международной научной конференции "Озерные экосистемы: биологические процессы, антропогенная трансформация, качество воды", Минск – Нарочь, 2007, стр. 336-337.

9. PADĖKA

Norėčiau išreikšti kuo didžiausią padėką ir pagarbą savo moksliniam vadovui prof. dr. Osvaldai Rukšėnui už pasitikėjimą, visokeriopą pagalbą ir nuoširdų rūpinimąsi.

Ypatingai esu dėkinga dr. Vidmantui Sakalauskui už perduotą patirtį, ir ištiestą pagalbos ranką.

Norėčiau nuoširdžiai padėkoti moksliniam konsultantui, Baltarusijos valstybinio universiteto prof. dr. Vladimirui Jurinui už pasidalintas idėjas ir suteiktas galimybes.

Esu be galo dėkinga visiems Gamtos fakulteto bendradarbiams biofizikams už pagalbą, supratimą ir draugystę, o taip pat studentams Rokui Buišui, Olgai Sevriukovai, Mindaugui Kuisiui.

Dėkoju Baltarusijos valstybinio universiteto Augalų fiziologijos ir biochemijos katedros darbuotojams už šiltą atmosferą ir nuoširdžią pagalbą, ypatingai dr. Tatjanai Ditčenko ir dr. Anatolijui Kudriašovui.

Labai ačiū visiems mano draugams, ypatingai Joanai Vanagienei ir Janinai Adomaitienei.

Ir galiausiai, bet visų svarbiausiai, noriu padėkoti savo šeimai.

10. CURRICULUM VITAE

Vardas, pavardė Vilma Kisnierienė
Gimimo data ir vieta 1966.03.14, Raseiniai, Lietuva
Adresas n. P. Vileišio 20-4
d. Čiurlionio 21/27

Telefonas +370 68370724
E-paštas vilma.kisnieriene@gf.vu.lt

Šeimyninė padėtis Ištekėjusi. Trys vaikai.

Išsilavinimas

1983-1988 Aukštasis, Vilniaus universitetas, biologė, biologijos - chemijos dėstytoja.

2005-2009 iki šiol Biofizikos krypties doktorantūros studijos VU GMF.

Darbo patirtis

1988-1997 Mokslinis - gamybinis susivienijimas "Fermentas", inžinierė-mikrobiologė

1997-2007 VU GMF biochemijos ir biofizikos katedra, vyr. laborantė

2007-2009 VU GMF biochemijos ir biofizikos katedra, jaunesnioji mokslo darbuotoja

2005-2008 VU, GMF, Biochemijos ir biofizikos katedra, darbas pagal papildomą darbo sutartį - projekto „Biofizika: biofizikos magistrinių ir doktorantūros studijų programų modernizavimas“, finansuojamo ES struktūrinių fondų lėšomis ir Lietuvos Respublikos bendrojo finansavimo lėšomis.

Profesinė narystė

Nuo 2003 m. Lietuvos neuromokslų asociacijos (LNA) narė.

Pedagoginė patirtis

Biofizikos laboratoriniai darbai 3 kurso molekulinės ir ekologinės biologijos, 2 kurso biofizikos specialybės studentams. Vadovavimas bakalaurų baigiamiesiems darbams.

Kvalifikacijos kėlimas

2006 09 16-28 dalyvavimas 9 tarptautinėje biofizikos vasaros mokykloje SUPRAMOLECULAR STRUCTURE AND FUNCTION (Rovinj, Croatia, 2006)

2007 05 14-18 3rd International Symposium on Plant Neurobiology, Štrbske Pleso, Slovakia, 2007)

2007 11 02-11 The 37th annual meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, 2007)

2007 02 01 - 2007 05 31 stažuotė Baltarusijos valstybiniame universitete, Biologijos fakulteto Augalų Fiziologijos ir biochemijos katedroje (Minskas)

2007 11 26 – 30 Tarptautinė mokykla „Advanced methods in biophysics“, Trakai, Lietuva.

2006–2008 Seminarų ciklas (8 seminarai) „Kursų nuotolinės studijoms rengimas“, Lietuva.