



VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS  
NEUROBIOLOGIJOS IR BIOFIZIKOS KATEDRA

JULIUS KAVALIAUSKAS

**KLASIKINIO L-TIPO KALCIO KANALŲ BLOKATORIAUS VERAPAMILIO POVEIKIS  
ŽVAIGŽDĖTOJO MAURAŠAKIO (*NITELLOPSIS OBTUSA*) LĄSTELĖMS**

(Magistrinis baigiamasis darbas)

Darbo vadovais - Dr. Doc. Vilma Kisnierienė

Konsultantas - Doktr. Vilmantas Pupkis

Vilnius, 2021

## Turinys

SANTRUMPOS .....	4
ĮVADAS.....	5
TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	6
I. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
Kalcis augaluose ir kalcio kanalų įvairovė.....	7
Kalcio jonai ir kalcio jonų pernašos sistemos augalų ląstelių plazminėje membranoje.....	8
Depoliarizacijos aktyvinami kalcio jonams pralaidūs kanalai .....	8
Hiperpoliarizacijos aktyvuojami kalciui pralaidūs kanalai .....	10
Biologiškai aktyvių medžiagų – laminarino, chitopentozės ir lipopolisacharidų (elicitor) aktyvuojami kalciui pralaidūs kanalai.....	11
Tonoplaste esantys kalcio kanalai .....	12
Kalio jonai ir kalio jonų pernašos sistemos augaluose.....	13
Elektriniai signalai augaluose.....	13
Elektrinių signalų matavimo metodai .....	15
Veikimo potencialai .....	16
Variabilūs potencialai.....	19
Sisteminiai potencialai .....	20
Citoplazmos judėjimas – aktino ir miozino sąveika.....	20
Klasikinis L-tipo kalcio kanalų blokatorius – verapamilis.....	25
L tipo kalcio kanalų blokatoriaus verapamilio poveikis augalinėms ląstelėms.....	26
II. METODIKA.....	29
Tyrimo objektas .....	29
Tyrimo medžiagos surinkimas ir paruošimas.....	30
Ląstelių gyvybingumo tyrimas.....	30
Citoplazmos greičio matavimai.....	30
Viduląstelinį elektrinių signalų registravimas.....	32
Elektrinių signalų registravimo eiga .....	33
Veikimo potenciolo repoliarizacijos fazinių portretų sudarymas.....	34
Statistinė analizė.....	34
III. REZULTATAI.....	35
Žvaigždėtojo maurašakio – <i>Nitellopsis obtusa</i> gyvybingumo priklausomybė nuo verapamilio koncentracijos .....	35
Citoplazmos judėjimo greičio kaitos priklausomybė nuo verapamilio koncentracijos.....	36
Veikimo potencialo repoliarizacijos greičio pokytis paveikus žvaigždėtojo maurašakio ląsteles skirtingomis L- tipo kalcio kanalų blokatoriaus - verapamilio koncentracijomis.....	37
REZULTATŲ APTARIMAS .....	42
IŠVADOS .....	45

SANTRAUKA .....	46
SUMMARY .....	47
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	48

## **SANTRUMPOS**

ABA – abscizinė rūgštis

APW – dirbtinis tvenkinio vanduo

ATP – adenintrifosfatas

cADPR – ciklinė adenindifosfato ribozė

cDNR – komplementarioji deoksiribonukleidinė rūgštis

ECG – elektrokardiograma

EEG – elektroencefalograma

EMG – elektromiograma

IP3 – inozitol, 1, 4, 5 - trifosfatas

MYA1, MYA2, MYA3 – miozinų tipai

NAD(P)H – nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas

PSTV - paroksimalinė supraventrikuliarinė tachikardija

ROS – reaktyvios deguonies formos

SDS-PAGE - elektroforezės poliakrilamido gelyje metodas

TEA<sup>+</sup> - tetrametilamonis

VDCC2 – įtampos valdomi kalcio kanalai

VP – veikimo potencialas

## ĮVADAS

*Nitellopsis obtusa*, dar vadinamas žaliuoju aksonu, (Andjus, 1998) gėlavandenis makrodumblis, priklausantis Characeae šeimai. Dėl savo ląstelių makroskopiškumo yra vienas iš patogiausių fotosintetinančių organizmų stebėti ir analizuoti augaluose ir į juos panašiuose organizmuose vykstančius biologinius reiškinius ir reakcijas į besikeičiančias aplinkos sąlygas, biologinės kilmės atsakus į įvairios kilmės dirgiklius (Bush, 1995; Beilby ir kt., 2007). Tai labai patogus objektas tirti elektrinius signalus bei įvairias jonų pernašos sistemas (Fromm ir kt., 2007). Tam kad būtų perduodama informacija apie besikeičiančias aplinkos sąlygas ir būtų pakeičiamas ląstelėje vykstantis metabolizmas, kad ląstelės galėtų prisitaikyti prie aplinkos sąlygų dalyvauja kalcio jonai ir kalcio jonų pernašos sistemos. Norint analizuoti procesus, kuriuose dalyvauja kalcio jonai dažnai yra taikomi gyvūninių ląstelių kalcio jonų kanalų antagonistai padedantys nustatyti šių kanalų sandaros ir funkcinės savybes. Mūsų eksperimentuose pasirinktas L – tipo kalcio kanalų blokatorius, kurio veikimas gyvūninėse ląstelėse yra žinomas (Pineros ir kt., 1997). Verapamilis yra naudotas tirti augalų ląstelėse vykstančius procesus, kuriuose dalyvauja kalcio jonai – citoplazmos judėjime, ląstelės augime ir dalijimesi, genų ekspresijoje, signalų perdavime. Nors įvairiuose tyrimuose yra parodytas įvairus šio kalcio jonų kanalo antagonisto poveikis augalinėms sistemoms, rezultatai priklauso nuo tiriamosios rūšies ir jos plazminėje membranoje esančių kalcio jonams pralaidžių kanalų, kurių aktyvavimas reguliuojamas įtampos, kitų jonų ar specifinių kanalų aktyvatorių. Tačiau augaluose nėra nustatyti L-tipo kalcio kanalai, kurie yra blokuojami verapamilio, todėl išlieka neaišku, ar šis inhibitorius blokuoja kitus augalinėse membranose esančius kalcio kanalus, sutrikdydamas ląstelės gyvybines funkcijas. Taip pat trūksta informacijos apie verapamilio poveikį vidinių membranų kalcio kanalams ir jų aktyvumo pasikeitimams.

## TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Tikslas: Ištirti klasikinio L-tipo kalcio kanalų blokatoriaus verapamilio poveikį nuo kalcio priklausomiems procesams *Nitellopsis obtusa* ląstelėse

Uždaviniai:

1. Ištirti verapamilio tirpalų (0,1 mM ir 0,3 mM) poveikį žvaigždėtojo maurašakio (*Nitellopsis obtusa*) ląstelių gyvybingumui;
2. Nustatyti verapamilio tirpalų (0,1 mM ir 0,3 mM) poveikį žvaigždėtojo maurašakio (*Nitellopsis obtusa*) ląstelių citoplazmos judėjimui;
3. Ištirti verapamilio tirpalų (0,1 mM, 0,3 mM ir 1 mM) poveikį žvaigždėtojo maurašakio (*Nitellopsis obtusa*) repoliarizacijos greičiui sužadinimo metu.

## I. LITERATŪROS APŽVALGA

### Kalcis augaluose ir kalcio kanalų įvairovė

Kalcio jonų kanalai esantys augaluose yra svarbūs daugelyje augalų ląstelėse vykstančių procesų pradedant augalų augimu ir vystymusi (Bush, 1995), signalų perdavimu (White, 1999) ir daugeliu kitų ląstelės fiziologinių procesų citoplazmoje ir organoidų viduje (Bush, 1995), nes kalcio jonų kanalų pagrindinis vaidmuo yra greitas kalcio jonų pernešimas per plazminę ir viduląstelines membranas (White, 1998). Kalcio jonų kanalai yra gausiai išsidėstę augalinėse ląstelėse (White, 1999), ypač didelis jų tankis stebimas, kur galimi staigūs elektrocheminio gradiento pokyčiai – plazminėje membranoje, tonoplaste ir endoplazminiame tinkle. Šiose vietose elektrocheminis gradientas dažnai būna pusiausvyroje, jo pokyčiai yra dažni signalų transdukcijos metu (Bush, 1995). Didelis kalcio elektrocheminis gradientas yra siejamas su dideliais kalcio jonų kiekio skirtumais abipus plazminės membranos ir viduląstelinių membranų, nes augaluose kalcio jonai yra kaupiami ne tik endoplazminiame tinkle, bet didžioji jo dalis yra sandėliuojama vakuolėse, kurios užima apie 90 proc. viso ląstelės tūrio, ir kalcio išlaisvinimas iš vakuolės yra svarbus viduląstelinių signalų perdavime (White, 1999; Pottosin ir kt., 2007). Daug mažesni koncentracijos svyravimai yra stebimi abipus plastidžių ir mitochondrijų membranų, tačiau ir abipus jų visgi yra ženklūs pokyčiai kalcio jonų koncentracijų abipus membranas fotosintezės (Miller ir kt., 1987) ir ląstelinio kvėpavimo (Rizzuto ir kt., 1992) metu ląstelėse. Kartu dėl signalų transdukcijos citoplazmoje yra stebima nevienoda kalcio jonų koncentracija skirtingose citoplazmos vietose (Gilroy ir kt., 1991). Ir net tais atvejais, kai elektrocheminis gradientas yra stabilus, yra fiksuojamas dinaminis balansas tarp įtekėjimo ir ištekėjimo kalcio, per plazminėje membranoje esančius kalciui pralaidžius kanalus (Bush, 1995). Augaluose yra žinoma keletas skirtingų tipų kalcio jonams pralaidžių kanalų. Dalis kalcio jonams pralaidžių kanalų yra priklausomi nuo įtampos ar aktyvuojami sužadintojų – plazminėje membranoje ar viduląstelinėse membranose. Depoliarizacijos ar hiperpoliarizacijos aktyvuojami kalcio kanalai yra ne tik plazminėje membranoje, bet ir tonoplaste. Membranose yra ir ligandų (IP3 ir cADPR) valdomi kalcio kanalai arba kanalai aktyvuojami kitų antrinių signalinių molekulių, hormonų veikiančių kalcio jonams pralaidžių pernašos sistemų aktyvumą (White, 1999). Kalcio jonų reguliuojama citoplazminė kalcio jonų koncentracija apibūdina ląstelės fiziologinę būklę ir yra išlaikoma apie 100 nM, esant aktyvioms kalcio jonų ATPazėms ir kalcio jonų/protonų antiporteriams plazminėje membranoje (Bush, 1995; Sanders ir kt., 1999). Specifiniai citoplazminio kalcio jonų koncentracijos pokyčiai rodo tinkamą ląstelės fiziologinį atsaką į įvairius dirgiklius (Alexandre ir kt., 1992; Trewavas, 1999). Ir kalcio jonų koncentracijos pokyčiai, sukeliama skirtingų stimulų, atsiranda dėl kalcio jonų išlaisvinimo iš skirtingų šaltinių (White, 1999)

## **Kalcio jonai ir kalcio jonų pernašos sistemos augalų ląstelių plazminėje membranoje**

Nestimuliuotoje augalinėje ląstelėje citoplazminė kalcio koncentracija yra  $10^{-7}$  M, o nustatytas apoplastinis kalcio jonų lygis sausumos augaluose tipiška yra nuo  $10^{-4}$  iki  $10^{-3}$  M (Harker ir kt., 1991; Bjorkman ir kt., 1991). Membranos potencialas yra nuo -150 iki -200mV ir  $\mu(\text{Ca}^{2+})$  – cheminio potencialo vertė, apskaičiuota pagal Nernsto lygtį (Hille, 1992) yra 45-60 kJ\* $\text{mol}^{-1}$ . Tokia vertė yra palyginama su laisvosios energijos pokyčiu hidrolizuojant ATP, kuri vidutiniškai yra -44 kJ\* $\text{mol}^{-1}$  gyvose ląstelėse (Miller ir kt., 1990). Citoplazminis ir tarpląstelinis kalcio jonų kiekis yra pusiausvyras, nors didžioji dalis kalcio citoplazmoje yra surišta su polisacharidais, lipidais ir baltymais. Ženklaus kalcio jonų kiekio pokyčiai dėl išorinių stimulų yra stebimi *Chara corallina* ląstelių citoplazmoje, kurioje kalcio jonų koncentracija bendroje sumoje siekė iki 50 mM (Reid ir kt., 1992). Taip pat stimulai, kurie pakeičia ląstelės elektrinį potencialą ar ląstelės sienelės pH, gali mobilizuoti ląstelės sienelėje esančius kalcio jonus ir reikšmingai padidinti kalcio koncentraciją citoplazmoje. Tokie stimulai yra šviesa (Assamann ir kt., 1985; Serrano ir kt., 1988; Shimazaki ir kt., 1992) ir auksinas (Felle, 1988), nes jie hiperbolizuoja plazminę membraną, kartu paskatindami ląstelės sienelės parūgštėjimą, kuris gali daryti įtaką citoplazminio kalcio kiekio didėjimui ir tuo pačiu pakeisti kalcio judėjimą per membraną (Bush, 1995). Kalcio kanalai esantys plazminėje membranoje buvo nustatyti naudojant patch-clamp metodą augalinių ląstelių protoplastuose ir po inkorporavimo į plazminės membranos vezikules plokščiam lipidų dvisluoksnyje, kuriame buvo stebėtas kalcio jonams pralaidžių kanalų aktyvumas. Šiuos kanalus galima suskirstyti į depoliarizacijos aktyvuojamus, hiperpoliarizacijos aktyvuojamus ir įtampai nejautrius kanalus (Thuleau ir kt., 1998).

### **Depoliarizacijos aktyvinami kalcio jonams pralaidūs kanalai.**

Depoliarizacijos aktyvuojami kalcio jonams laidūs kanalai yra randami plazminėje membranoje, visų augalų šaknų ląstelėse (White, 1998; Kiegle ir kt., 1998; Thion ir kt., 1998), lapų mezofilyje (Thion ir kt., 1998) ir suspensijose kultūrinių ląstelių (Thuleau ir kt., 1994; Thion ir kt., 1996). Taip pat galima išskirti skirtingas šių kanalų klases pagal jų jautrumą  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ , verapamiliumi (White, 1998). Yra pažymima, kad keletas kalcio jonų pernašos sistemų gali būti inhibuojams rutenio raudonuoju, tačiau preparatas yra nenaudingas diagnozuojant kalcio jonų mobilizaciją viduląstelinėse saugyklose. Pirmieji nuo depoliarizacijos priklausomi kanalai buvo nustatyti protoplastuose, gautuose iš morkų ląstelių suspensinės kultūros (Thuleau ir kt., 1994a,b; Thion ir kt., 1996) ir tik vėliau protoplastuose lapų mezofilio ir šaknų ląstelėse *Arabidopsis* (Kiegle ir kt., 1998; Thion ir kt., 1998). Protoplastuose gautuose iš *Arabidopsis* šaknų ląstelių depoliarizacijos srovė buvo inhibuojama naudojant mibefradilą (Kiegle ir kt., 1998). Depoliarizacijos srovės kanalai tarpininkauja pernešant divalenčius jonus –  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  ir  $\text{Sr}^{2+}$ . (Thuleau ir kt., 1994a,b) ir tuo



pačiu turi vienakryptį laidumą 13 pS esant 40 mM kalcio jonų koncentracijai, išorinėje terpėje. Kalcio srovės yra aktyvuojamos esant teigiamesnei įtampai nei  $-140$  mV ir jų veikimas sulėtėja ir yra grįžtamai inaktyvuojamas, kai įtampa tampa ekstremaliai neigiama (Thuleau ir kt., 1994a,b). Atliktuose tyrimuose su *Arabidopsis ton2* mutantų protoplastais, kuriuose buvo stebėtas kalcio kanalų aktyvumas parodytas buvimas baltymų, kurie suriša mikrovamzdelius su plazmine membrana (Thion ir kt., 1998). Jau seniai buvo žinoma, kad mikrovamzdeliai dalyvauja reguliavime aktyvumo ir padėties membranos baltymų. Paviršiniai mikrovamzdeliai dalyvauja daugelyje fiziologinių procesų tokių kaip – atsakas į osmotinį ir mechaninį dirginimą, morfogenezė ir ląstelės dalijimasis ir mikrovamzdelių persitvarkymas yra dėl ankstyvo atsako į biotinius ar abiotinius stimulus (Shibaoka, 1994; Marc, 1997). Taip pat yra duomenų, jog citoskeleto mikrovamzdeliai yra siejami su augimo krypties reguliavimu (Bibikova ir kt., 1999). Depolarizacijos aktyvinami kanalai yra susiję su aklimatizacija į šalčio jautrumą, augaluose augančiuose žemose temperatūrose (White, 1998). Manoma kad tai inicijuoja kalcio įtekėjimą per plazminę membraną ir tarpininkauja reikšmingame padidėjime citoplazminės kalcio jonų koncentracijos. Dėl neigiamos temperatūros sunyksta paviršiniai mikrovamzdeliai ir sunykimas yra sukeltas poveikio  $10$  mM  $\text{La}^{3+}$ , bet ne  $10$  mM  $\text{Gd}^{3+}$  buvimo tarpląstelinėje terpėje (Mazaris ir kt., 1997). Atliekant tyrimus su kviečių šaknų ląstelėmis plazminių membranų vezikulėmis, kurios buvo įterptos į plokščią lipidų dvisluoksnį, nustatyti 2 tipai depolarizacijos aktyvinamų kalciui pralaidžių kanalų. Kurie buvo pavadinti rca/VDCC2 (White, 1994; 1997) ir maxi-katijonų kanalai (White, 1993; 1997). Nesant kalcio jonų, VDCC2 kanalai yra pralaidūs vienvalečiams ir divalečiams katijonams. Įskaitant katijonus, kuriems L-tipo kalcio kanalai gyvūninėse ląstelėse yra santykinai pralaidūs –  $\text{Mg}^{2+}$  ir  $\text{Mn}^{2+}$  jonams arba blokuojami  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ir  $\text{Ni}^{2+}$  (Pinos ir kt., 1995; 1997; White ir kt., 2000). Šio tipo kanalai turi platų spektrą cheminių medžiagų, kurios veikia slopinančiai esant mikromolinėms jų koncentracijoms –  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ , verapamilio, diltiazemo ir rutenio raudonojo, tačiau šie kanalai nėra paveikūs 1,4-dihidropiridinui ir bepredilui (White, 1998; Pineros ir kt., 1997) Maxi-katijonų kanalai buvo tirti plazminėje membranoje ryžių šaknų, kuriose jie buvo pralaidūs įvairiems vienvalečiams ir divalečiams katijonams (White, 1993;1997). Susiformavęs pernašos modelis per šias kanalų poras –  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ir  $\text{Ba}^{2+}$  jonams (White ir kt., 1999). Aplinkos streso sąlygos sukelia dominuojantį kalcio jonų antplūdį,  $\text{Ca}^{2+}$  pralaidžiuose kanaluose yra laikomas dominuojančiu jonų srautu ir bet tai neparodo kanalo farmakologinio kompleksškumo (White, 2000). Kanaluose esančios srovės yra slopinamos mikromolinių koncentracijų rutenio raudonojo, o tuo tarpu katijonų ištekėjimo srautai slopinami, ne tik rutenio raudonojo, bet ir diltiazemo, verapamilio ir kuinino mikromolinių koncentracijų ir  $\text{TEA}^+$  milimolinių koncentracijų. Stebint šių kanalų kinetiką ir pernašą per juos yra siūloma jog maxi-katijonų kanalai yra atsakingi už trumpalaikį kalcio koncentracijos padidėjimą citoplazmoje

sukeliamą šalčio (White ir kt., 1999) ir tikėtina, kad tai yra bandymas imituoti aklimatizaciją žemai temperatūrai. Dažnai depoliarizacijos aktyvuojami kanalai yra siejami su signalų perdavimu esant stresinėms sąlygoms, iššaukiamoms aplinkos, vystymosi ar patogenų. Depoliarizacija gali būti sugeneruota vieno iš daugelio mechanizmų ir tai formuoja globalų signalą (White, 2000) Kalbant apie šių kanalų laidumą, tai reiktų jį sieti su daugeliu sudedamųjų aspektų: energetiniu barjeru, elektrine varomąja jėga ir katijonų patekimu į porą iš aplinkos. Kalbant apie poras tiek maxi-katijonų kanalų, tiek VDCC2 kanalų, jos yra modeliuojamos taip kad turėtų 2 aukšto afiniškumo sritis, kuriose katijonai yra atskiriami vienas nuo kito ir tuo pačiu nuo išorinės aplinkos energetinio barjero. Abi surišimo vietas gali užimti katijonai tuo pačiu metu, bet katijonai patekę į porą išstumia vienas kitą. Panašus modelis buvo naudojamas apibūdinti katijonų pernašą per L tipo kalcio kanalus gyvūninių ląstelių membranose. Ir tai leido suformuoti keletą išvadų apie kanalų porų struktūrą (White, 1999). Katijonų surišimo sritys maxi-katijonų ir VDCC2 kanaluose turi žemą afiniškumą divalenciams katijonams ir didelį afiniškumą vienvalenciams katijonams, lyginant šiuos kanalus su L-tipo kalcio kanalais gyvūninėse ląstelėse. Tai siūlo, jog kanalo poros struktūra augalų plazminės membranos kalcio kanalų ir L-tipo kalcio kanalų gyvūninių ląstelių plazminėje membranoje skiriasi. Augalų kalcio kanalai yra mažiau selektyvūs kalciumui nei L-tipo kalcio kanalai gyvūninių ląstelių membranose. Tačiau šis skirtumas gali atspindėti skirtingas jonines koncentracijas ir įtampas po kurių augalinėse ir gyvūninėse ląstelėse esantys kanalai yra aktyvuojami. Poros struktūra kalcio kanalo yra susijusi su katalizuojamu kalcio įtekėjimu, kuris yra palaikomas ekstremaliai neigiamam membranų potencialo, būdingo augalams.

### **Hiperpoliarizacijos aktyvuojami kalciumui pralaidūs kanalai**

Hiperpoliarizacijos aktyvuojami kalciumui pralaidūs kanalai buvo atrasti protoplastuose, įvairiuose ląstelių tipuose, dėl to yra manoma, jog jie dalyvauja daugelyje ląstelėje vykstančių procesų (White, 2000) Nustatyta, jog hiperpoliarizacijos aktyvinami kalcio kanalai svogūnų epidermio ląstelių plazminėje membranoje yra aktyvuojami įtempio, kas leidžia daryti prielaidą, jog jie veikia kaip mechanoreceptoriai. Taip pat žiotelėse hiperpoliarizacija aktyvuoja kalcio kanalus dėl kurių yra sukeliama plazminės membranos depoliarizacija, kuri koordinuoja jonų ištekėjimą ir žiotelių užsivėrimą. Šaknų endotelio ląstelėse šie kanalai vaidina svarbų vaidmenį mineralinėje mityboje, o pomidorų ląstelių suspensinėje kultūroje šie kanalai yra įtraukiami į sužadinto signalo perdavimą. Šio tipo kanalai yra įtraukiami į turgorinio slėgio palaikymą ląstelėje ir informacijos apie mechaninį stresą perdavime (Pickard ir kt., 1993). Kanalų sąsaja su paviršiniaus mikrovamzdeliais padeda koordinuoti ląstelės plėtimąsi, remiantis kaimyninių ląstelių padėtimi. To analogas gali būti ilgėjančio augimo pavyzdys dumblių rizoiduose ar grybų hifuose, nes specifinį vaidmenį mechanojautrūs kalcio kanalai

atlieka elongacijos metu šakniaplaukiuose (White, 1998) ir žiedadulkių dulkiadaigiuose (Taylor ir kt. 1997) Šiuo metu nėra pakankamai informacijos kaip šio tipo kalcio kanalai dalyvauja daugelyje fiziologinių procesų: ląstelės sienelės lankstymąsi, lokalizuotame turgoro susidaryme, plazminės membranos įtempime, sekretinių vezikulių judėjime link plazminės membranos ir egzocitozėje. Tam tikri cheminiai preparatai veikia įvairius nuo  $\text{Ca}^{2+}$  priklausomus reiškinius, kalcio jonų koncentracijos pokyčius, mangano įtekėjimą ir ląstelių elongaciją, bet tai gali nereikšti tiesioginės šių medžiagų sąveikos su pačiais kalcio jonams pralaidžiais kanalais. Taip pat apie signalinį vaidmenį hiperpolarizacijos aktyvuojamų kalcio kanalų yra žinoma varstomųjų ląstelių plazminėse membranose. Žiotelių ramybės potencialas varijuoja tarp hiperpolarizuotos būsenos (-200 mV) ir būsenos kuri yra artima kalio jonų pusiausvyriniam potencialui (Grabov ir kt., 1998). Neginčijamai hiperpolarizacija žiotelėse yra iššaukiama kalcio jonų antplūdžio ir vėliau padidėjusios citoplazminės kalcio koncentracijos, kai įtampos slenkstis vidutiniškai siekia -120 mV (Grabov, 1998, 1999). Padidėjimas citoplazminės kalcio koncentracijos yra jautrus ekstraląstelinei kalcio koncentracijai,  $\text{Gd}^{3+}$ , ir kalcikluidinui - inhibitoriui L-tipo kalcio kanalų gyvūnuose. Yra siūloma, kad hiperpolarizacijos aktyvuojami kalcio kanalai yra kaip integralus komponentas varstomųjų ląstelių atsake į ARBA poveikį. Kanalų aktyvumas yra paveikiamas staigių temperatūros pokyčių, terpės rūgštėjimo nuo 7 pH iki 5 pH ir slopinamas mikromolinių koncentracijų  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ . Tai siūlo idėją, jog šie kanalai veikia kaip sensoriai integruojantys elektrinius, terminius ir cheminius signalus.

### **Biologiškai aktyvių medžiagų – laminarino, chitopentozės ir lipopolisacharidų (elicitor) aktyvuojami kalciumi pralaidūs kanalai**

Buvo aprašyti 2 biologiškai aktyvių medžiagų (elicitor) aktyvuojami kalciumi pralaidūs kanalai esantys plazminėje membranoje. Kalcio srautas per šiuos kanalus rodo ankstyvą pasiruošimą gynybinio atsako į patogenus. Pirmasis kalcio kanalas, aktyvuojamas kai įtampa yra žemesnė nei -120 mV, aprašytas pomidorų (*Lycopersicon esculentum* L.) ląstelių suspensinėje kultūroje (Gelli ir kt., 1997). Šie kanalai buvo slopinami mikromolinėmis koncentracijomis  $\text{La}^{3+}$  ir nifedipino. Antrasis kalcio jonams pralaidus kanalas buvo pavadintas – didelio laidumo iššaukėjų (elicitor) aktyvuojamu kanalu ir aprašytas petražolių (*Petroselinum crispum*) protoplastuose ląstelių suspensinėse kultūrose (Zimmermann ir kt., 1997). Taip pat buvo stebimas ir kalio laidumas per šiuos kanalus. Ir buvo slopinami mikromolinių koncentracijų  $\text{La}^{3+}$  ir  $\text{Gd}^{3+}$

## Tonoplaste esantys kalcio kanalai

Vakuolė augalinėse ląstelėse užima apie 90 procentų jos tūrio ir yra laikoma didžiausiu kalcio jonų šaltinių ląstelėje. Kalcio jonų elektrocheminis gradientas kertant tonoplastą yra labai didelis. Tonoplasto ramybės potencialas (-20 mV - -50 mV) ir skirtumas tarp citoplazmoje ir vakuolėje esančio kalcio koncentracijos lemia kalcio jonų judėjimą iš vakuolės į citoplazmą. Kalcio jonų judėjimas iš vakuolės į citoplazmą lemia citoplazminio kalcio koncentracijos padidėjimą reikalingą signalų transdukcijai. Kai signalas sukėlė padidinimą citoplazminio kalcio koncentracijos, tai buvo pavadinta indukuotu kalcio jonų išlaisvinimu. Diskutuojamas vakuolėje esančių kalcio aktyvuojamų kalcio kanalų buvimas. Iki šiol žinomi tik 4 tipai tonoplaste esančių kalcio kanalų – iš kurių 2 yra valdomi įtampos, kiti 2 kalcio jonų kanalai yra valdomi ligandų tonoplasto membranoje (Pottosin ir kt., 2007). Depoliarizacijos aktyvuojami kalcio kanalai įskaitant ir lėtuosius vakuolės kanalus, turi pagrįstą laidumą divalentiems jonams, bet jų fiziologija išlieka neaiški. Hiperpoliarizacijos aktyvuojami kalcio kanalai taip pat turi savitą selektyvumą divalentiems jonams ir katalizuoja kalcio ištekėjimą į citoplazmą ir turi savo vaidmenį ląstelės signalų perdavime. Taip pat kalcio kanalai aktyvuojami antrinių signalų molekulių IP3 ir cADPR. Šie kanalai yra labiau selektyvūs divalentiems jonams nei vienvalečiams jonams. Taip pat yra stebimi vadinamieji lėtieji tonoplasto kanalai, tarpininkaujantys ne tik jonų pernašoje, bet ir reguliavime daugelyje viduląstelinių mechanizmų. Šio tipo kanalai buvo identifikuoti *TPC1* geno *Arabidopsis*. Ir tai buvo išskirtinis atradimas nes manyta jog *TPC1* geno lemiami kanalai yra tik plazminėje membranoje (Pottosin ir kt., 2007). Lėtieji vakuolės kanalai yra aktyvuojami nuo teigiamo tonoplasto potencialo, kai kiti tonoplasto nuo įtampos priklausomi kanalai yra aktyvinami neigiamo tonoplasto potencialo. Lyginant šių dviejų nuo įtampos priklausomų kanalų savybes yra gaunami ryškūs panašumai ypač jeigu šie tyrimai yra atliekami su ta pačia rūšimi (Pottosin ir kt., 2007). Yra manoma, jog šios dvi kanalų rūšys yra vienodos savo funkcinėmis savybėmis, bet skirtingai išsidėstę plazminėje membranoje. Įvairiuose šaltiniuose lėtieji tonoplasto kalcio kanalai yra apibūdinami, kaip ganėtinai tankiai išsidėstę tonoplaste ir tai nustatyta naudojant patch-clamp metodą (Schulz-Lessdorf ir kt., 1995; Pottosin ir kt., 1997). Lėtieji vakuolės kanalai yra paplitę visuose sausumos augaluose (*Embryophytes*) įskaitant ir paparčius ir kerpsamanes (Hedrich ir kt., 1988). Tačiau analizuojant šiuos kanalus trūksta informacijos apie tretinę šių kanalų struktūrą ir manoma, jog poros diametras gali būti nustatomas taikant blokavimą skirtingo diametro katijonais (Dobrovinskaya ir kt., 1999). Nustatyta, kad medžiagos, kurių diametras yra mažesnis arba lygus 7 Å (dydis pilnai hidratuoto magnio jono) gali prasiskverbti pro porą. Ir pagal tai yra sprendžiama, jog kanalai turi pralaidumą šarminių metalų katijonams (Amodeo ir kt., 1994; Paganetto ir kt., 2001). Kalcis į vakuolę yra pernešamas aktyviojo

transporto pagalba prieš elektrocheminio potencialo gradientą tarpininkaujant P tipo kalcio pompom (Geisler ir kt., 2000; Sze ir kt., 2000) ir vandenilio/kalčio antiporteriams (Shikagi ir kt., 2006).

### **Kalio jonai ir kalio jonų pernašos sistemos augaluose**

Kalis yra antra pagal svarbą augalams mineralinė medžiaga po azoto, dalyvaujanti ląstelės metabolizme (Marschner ir kt., 1995). Augalo ūgliuose kalio kiekis gali sudaryti nuo 4 iki 8 procentų augalo sausosios masės. Vienas iš svarbiausių kalio vaidmenų augalinėse sistemose yra turgorinio slėgio palaikymas. Kartu kalio jonai aktyvuoja eilę metabolinių fermentų įskaitant ir dalyvaujančius fotosintezėje, oksidaciniame fosforiliniame ir baltymų sintezėje (Marschner ir kt., 1995). Išskirtinai svarbų vaidmenį jis atlieka augalų judėjime, kaip to pavyzdys žiotelių varstomųjų ląstelių atsivėrimas ir užsivėrimas. Pagrindinės kalio jonų saugyklos augalinėje ląstelėje yra vakuolė ir citoplazma. Citoplazminis kalio kiekis tarp skirtingo tipo ląstelių varijuoja nežymiai ties 100 mM riba (Cuin ir kt., 2003), tačiau kalio kiekis skirtingo tipo ląstelių vakuolėse gali ženkliai skirtis – nuo 120 mM šaknų ląstelių vakuolėse (Walker ir kt., 1996) iki 230 mM lapų mezofilio ląstelėse (Cuin ir kt., 2003). Augalų evoliucijos eigoje kalio jonams atliekant daug svarbių funkcijų augalinėse ląstelėse susiformavo ganėtinai didelė įvairovė kalio jonams pralaidžių pernašos sistemų, kurių šiuo metu *Arabidopsis* yra suskaičiuojamos net septynios šeimos (Shabala, 2003). Kalio jonų pernašos sistemos skirstomos į nešiklius - antiporterius, simporterius ir uniporterius ir kanalus skirstomus į nuo įtampos priklausomus ir nepriklausomus kanalus, kalį įnešančias ir išnešančias jonų pernašos sistemas (Dreyer ir kt., 2011). Gyvūninėse ląstelėse kalio jonai dalyvauja veikimo potencialo repoliarizacijos metu, kai yra pašalinami iš ląstelės pro nuo įtampos priklausomus kalio kanalus (Bean, 2007). Atitinkamas kalio jonų vaidmuo ir augalinėse ląstelėse generuojant veikimo potencialus (Minguet-Parramona ir kt., 2016). Kalio vaidmuo veikimo potencialų repoliarizacijos metu buvo nustatytas naudojant augalų mutantus, neturinčius GORK tipo kalio kanalus koduojančio geno, kas įrodė kalio dalyvavimą repoliarizacijos metu, kai kalis yra pašalinamas iš ląstelės pro depoliarizacijos aktyvuojamus arba nuo kalčio jonų koncentracijos citoplazmoje padidėjimo nuo 0,1  $\mu\text{M}$  iki 1  $\mu\text{M}$  priklausomus, kalio kanalus ir tai yra svarbu veikimo potencialo sklidimui ir susidarymui (Cuin ir kt., 2018).

### **Elektriniai signalai augaluose**

Elektriniai signalai yra laikini elektrinio potencialo gradiento pokyčiai abipus plazminę membraną (Vodeneev ir kt., 2015) arba tonoplastą (Novikova ir kt., 2017). Elektrinių signalų sužadimas ir perdavimas yra pagrindinė priemonė leidžianti greitai ir efektyviai perduoti informaciją dideliais atstumais nuo sužadavimo vietos link atsako srities. Toks signalų perdavimas

yra gerai žinomas daugelyje aukštesniųjų augalų ir žaliadumblių (Fromm ir kt., 2007). Elektrinių signalų buvimas gyvūninėse ir augalinėse ląstelėse rodo ir atitinkamų joninių kanalų buvimą ląstelių plazminėse membranose ir membraninėse organelėse, kas leidžia perduoti informaciją dideliais atstumais. Pirmieji elektriniai signalai ir jų sklidimas buvo stebėtas eksperimentuose su *Dionaea* lapuose vykstančiais fiziniiais pokyčiais sukeltais išorinių stimulų (Burdon-Sanderson, 1873), parodant elektrinių signalų buvimą ne tik gyvūninėse sistemose. Pirmieji elektrinių signalų matavimai su viduląsteliniais elektrodais buvo atlikti *Nitella* ląstelėse 1930 metais (Umrath, 1930), kai tokiu būdu pirmieji gyvūninėse ląstelėse atlikti matavimai buvo atlikti tik po dviejų dešimtmečių (Nastuh ir Hodghen, 1950; Tasaki, 1952). 1950 metais Sibaoka atlikti tyrimai su jautriąja mimozą (*Mimosa pudica*), kurių metu buvo stebėti veikimo potencialai (VP) ir jų sklidimas, bei tolimesni tyrimai su kitomis augalų rūšimis, parodė elektrinių signalų svarbą augalinėms sistemoms ir jų indėlį reguliuojant fiziologinius procesus – genų ekspresiją, fotosintezės aktyvumą, ATP sintezę, fitohormonų (jazminų rūgšties) produkavimą, transpiraciją, atsparumą šalčiui ir greitus motorinius judesius (Sibaoka, 1969; Pickard 1973; Sibaoka ir kt., 1991; Retivin ir kt., 1997; Vodeneev ir kt., 2018; Sukhov ir kt., 2019). Minėtų procesų koordinuotas reguliavimas yra svarbus visuose organizmo lygmenyse (Shah ir Zeier, 2013; Hilleary ir Gilroy, 20118). Atliktuose tyrimuose su *Chara coralina* ląstelėmis nustatyta, jog plazminėje membranoje susidarę veikimo potencialai yra perduodami į tilakoidų membranas, ko pasekoje atsiranda fluorescencijos pokyčiai, dėl pH gradiento padidėjimo abipus tilakoido membraną, kas rodo įvykusius pokyčius fotosintezės efektyvume (Bulychev ir kt., 2006).

Buvo įrodytas augaluose generuojamų veikimo potencialų panašumas į gyvūninėse ląstelėse (neuronuose) generuojamus elektrinius signalus. Svarbus klausimas analizuojant augalinėse sistemose generuojamus elektrinius signalus yra jonų kanalai ir atitinkamų jonų pernaša, bei jų panašumas su jonų kanalais esančiais gyvūninėse ląstelėse bei perduodamos informacijos kodavimas, kuris yra siejamas su veikimo potencialų forma, depoliarizacijos slenkstine verte ir generuojamų signalų dažniu (Fromm ir kt., 2007)

Nors augalai ir neišvystė specifinės sistemos skirtos ilgų nuotolių elektrinių signalų perdavimui, jie pritaikė turimas medžiagų pernašos sistemas – apytakos indus (fleomą ir ksilemą), kurių pagalba informacija apie aplinkoje esančius stresinius faktorius gali būti greitai perduodama ir augalai gali greičiau atsakyti į aplinkos dirgiklius, keisdami fiziologinius parametrus (Lautner ir kt., 2005). Taip yra dėl apytakos indus sudarančių ląstelių plazminėse membranose esančių  $K^+$  ir  $Ca^{2+}$  jonų kanalų gausos nustatytos daugelyje augalų (kukurūzuose, pupelėse ir kt.) (Lacombe ir kt., 2000; Volk ir kt., 2000). Lyginant su augaluose esančiais cheminiais signalais, perduodamais fitohormonų,

elektriniai signalai yra daug greitesnė priemonė. Ir tai žadina didesnę mokslininkų susidomėjimą elektrinių signalų poveikiu fiziologiniams procesams augaluose (Trebacz ir kt., 2006). Be to yra keliamos įvairios hipotezės apie glaudų elektrinių signalų ryšį su ROS transmisija ir  $Ca^{2+}$  jonų kiekio pokyčiais/svyravimais ląstelėse (Hilleary ir Gilroy, 2018) kartu apimant ir streso hormonų sintezę (pvz., ABA) (Hlavinka ir kt., 2012) ar siejant su hidraulinių bangų sklidimu augaluose (Stahberg ir kt. 2006).

### **Elektrinių signalų matavimo metodai**

Metodai, taikomi matuoti augaluose generuojamus elektrinius signalus dažniausiai skirstomi pagal elektrodų tipą: ekstraląsteliniai ir intraląsteliniai. Pirmuoju atveju naudojami išoriniai elektrodai paviršiniams matavimams. Tokiu būdu registruojami signalai daugelyje aukštesniųjų augalų, kuriuose elektriniai signalai yra fiksuojami ilgą laiką. Intraląsteliniai – dažniausiai naudojant stiklinius elektrodus užpildytus KCl tirpalu, įvedamus tiesiai į ląstelę. Šis metodas yra daug patikimesnis ir suteikia informacijos apie trumpo laikotarpio elektrinius signalus augalinėse ląstelėse. Tačiau šis metodas turi ir trūkumų, nes įvesti mikroelektrodai gali pakeisti ląstelės biologines savybes signalo registravimo metu (Fromm ir kt., 2007).

Ekstraląsteliniai matavimai yra dažnai taikomi gyvūnų elektrinių signalų matavimams taikomiems medicininėje praktikoje– ECG, EEG, EMG. Šie matavimai yra tinkami registruoti tik specifinių ląstelių grupių generuojančių elektrinius signalus. Augalinėse ląstelėse šis metodas yra taikomas dvejopai, taikant paviršinius elektrodus arba naudojant įterpiamuosius elektrodus įterpiamus tarp augalų audinių, bet tokiais atvejais elektrodai turi būti ploni (Ag/AgCl; skersmuo 0,4-1,0 mm) ir nepažeisti šalia esančių ląstelių. Tokie įterpti elektrodai kontaktuoja su aplink juos esančiomis ląstelėmis, tokio matavimo pirmieji tyrimai buvo atlikti su–brazdo zonos ląstelėmis įvairiuose sumedėjusiuose augaluose (Fensom, 1936) ir pupelėse, joms reaguojant į mėlynos šviesos sukeltus elektrocheminius signalus (Volkov, 2006). Tačiau lyginant su įterpiamais elektrodais paviršiniai matavimai yra dažniau pasirenkami dėl neinvaziškumo bei fizinio stabilumo ir tuo pačiu tokio tipo matavimai leidžia stebėti ir kitus augaluose vykstančius fiziologinius procesus, kaip fotosintezės aktyvumas, dujų mainai, fitohormonų sintezė (Fromm ir kt., 1998). Kaip ir įterpiamiesiems elektrodams, taip ir paviršiniams elektrodams gaminti yra naudojama Ag/AgCl viela, kuri yra drėkinama 0,1 proc. (w/v) KCl agare arba sudrėkintu medvilnės pluoštu, tokiu būdu užtikrinant didelį elektrinį kontaktą su augalo paviršiumi (Fromm ir kt., 1993), arba Ag/AgCl elektrodai gali būti pritvirtinami prie augalo naudojant laidžius vandeninio pagrindo gelius, kurie yra panašūs į taikomi gyvūninių ląstelių paviršiniams matavimams kaip ECG, EEG (Mancuso, 1999).

Antras elektrodas tada tvirtinamas distaliniame augalo regione arba įtvirtinamas į dirvožemį, kuriame augalas auga. Į dirvožemį įkištas elektrodas atlikta referentinio elektrodo funkciją. Taikant šio tipo elektrinių signalų matavimą galima stebėti elektrinių signalų sklidimą visame augale, kai paduodamas apikalinis stimulus sklindantis augalu žemyn. Panašūs eksperimentai buvo atliekami su saulėgražomis analizuojant susidariusių veikimo ir variabilių potencialų charakteristikas (Stankovic ir kt., 1998).

Vidulasteliniai matavimai yra atliekami membranos potencialų ir elektrinių signalų registravimui. Šių matavimų metu naudojami stikliniai mikroelektrodai, kurių galiuko skersmuo turi būti mažesnis nei 1  $\mu\text{m}$ . Elektrodai yra užpildyti KCl, jie yra įtvirtinami Ag/AgCl laikikliu, sujungtu su didelės įvesties impedanso stiprintuvu. Elektrodas į ląstelės citoplazmą arba vakuolę yra įvedamas naudojant mikromanipuliatorių. Elektrodai pervėrus ląstelės plazminę membraną yra registruojamas neigiamas potencialo pokytis, kuris dažniausiai augalinėse ląstelėse yra intervale nuo – 80 mV iki – 200 mV (Fromm ir kt., 2007). Vienintelė išskylanti intraląstelinis matavimų problema yra ilgų nuotolių signalų matavimas augaluose, kurie sklinda augalo apytakos indais, floema. Floema, kaip ir kiti augalo apytakos indai yra išsidėstę gilesniuose augalo sluoksniuose ir juos pasiekti su stikliniais mikroelektrodois yra sudėtinga. Dėl to norint išmatuoti floemoje sklindančius elektrinius signalus, buvo pasinaudota vabzdžiais, amarais, mintančiais būtent floema tekančiais augalo skysčiais, nes amaro straubliukas lengvai gali perverti augalo audinius ir pasiekti floemą (Fromm ir kt., 1994). Atliekant šį tyrimą amarai yra paliekami nakties laikotarpiui ant tiriamojo augalo, vėliau vabzdžio kūnas yra atskiriamas nuo straubliuko, kurio pagalba vabzdys maitinasi ir straubliukas yra panaudojamas kaip elektrodo laikiklis, į kurį įmontuojamas registracijai skirtas elektrodas (Fromm ir kt., 1988). Matavimas priklauso nuo tirpalo koncentracijos skirtumo tarp citoplazmos ir mikroelektrodų, nustatyta, jog rėtiniuose induose esanti terpė turi nuo 50 iki 100 mM  $\text{K}^+$  jonų (Fromm ir kt., 1989). Tuo pačiu gali būti paklaidos skaičiuojant straubliuko elektrinę varžą, nes preliminarūs skaičiavimai jau atlikti 1981 metais (Wright ir kt., 1981), kurie parodė, jog straubliuko varža yra 3 kartus didesnė, nei varža standartiniuose elektroduose. Vienas šio metodo privalumas yra elektros srovės izoliacija, kuri susidaro iš likusių amaro išskyrų.

### **Veikimo potencialai**

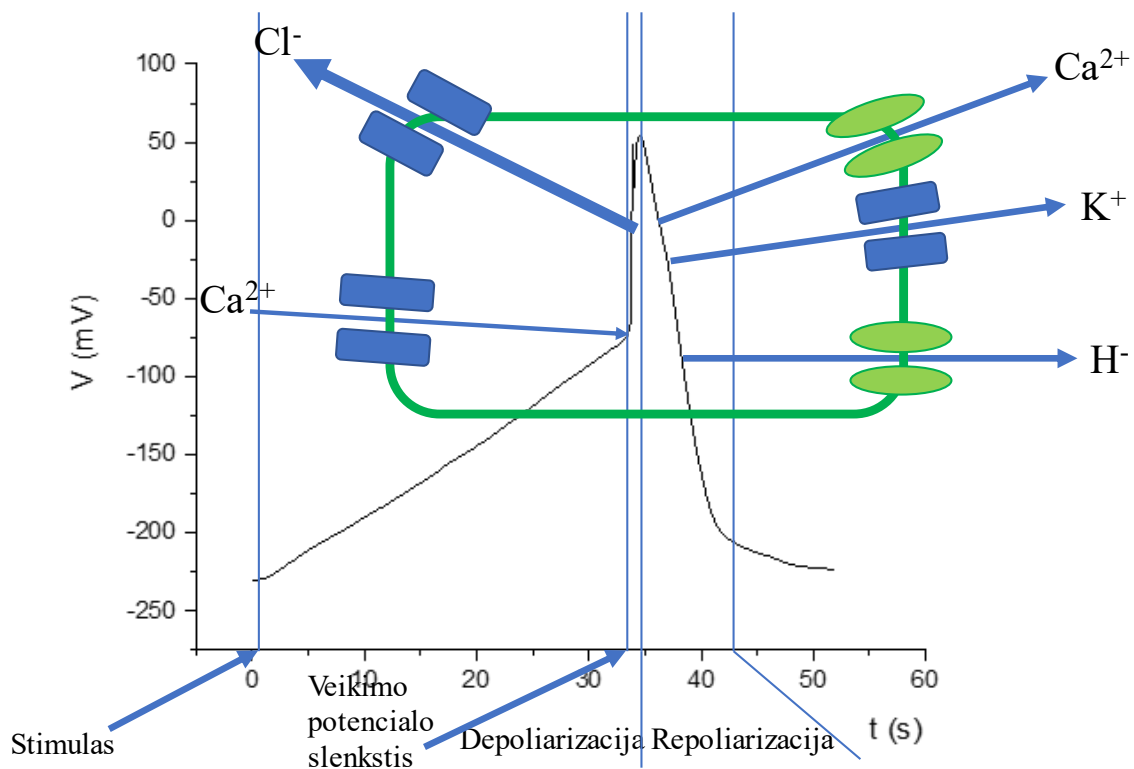
Augalai reaguodami į spontaninius aplinkos pokyčius generuoja įvairius elektrinius signalus, bet kurioje simplasto vietoje. Dažniausiai sutinkami elektriniai signalai yra veikimo potencialai (VP), kurie pirmiausia pasižymi staigia plazminės membranos depoliarizacija, ir tai yra pastebėta ganėtinai seniai atliekant tyrimus su įvairiomis menturdumblių *Chara* rūšimis (Kishimoto,



1968). Tuo pačiu veikimo potencialų generavimas buvo stebėtas šių dumblių tonoplasto membranoje (Beilby ir kt., 2007) ir aukštesniuose augaluose (Novikova ir kt., 2017). Veikimo potencialai yra trumpi elektriniai signalai, trunkantys nuo kelių iki keliasdešimt sekundžių. Veikimo potencialus sudaro 2 fazės. Depoliarizacija (Trebacz ir kt., 2006; Fromm ir kt., 2007), kurios pagrindinis sukėlėjas yra kalcio jonų įtekėjimas į citoplazmą iš išorės ar viduląstelių saugyklų – vakuolės ir endoplazminio tinklo (Reid ir kt., 1992). Depoliarizacijoje dalyvauja ir chloro jonai ištekantys iš ląstelės pro chloro jonams pralaidžius kanalus (Hope ir kt., 1964). Nustatyti 2 chloro jonų išnešančių kanalų tipai, vienas iš jų yra ypač selektyvus chloro jonams ir aktyvuojamas kalcio jonų koncentracijos padidėjimo citoplazmoje iki 1  $\mu\text{M}$  (Okihara ir kt., 1991). Repoliarizacija yra siejama su aktyvuotomis  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazėmis, aktyvuojamomis didelės kalcio jonų koncentracijos repoliarizacijos pradžioje. Repoliarizacijos metu taip pat dalyvauja ir depoliarizacijos ir/ar kalcio jonų aktyvuoti kalio jonų kanalai (Beilby ir kt., 2007). Norint pasiekti depoliarizacijos fazę stimulus turi būti pakankamai intensyvus, kitu atveju tai būtų tik receptorinis potencialas, ir tik pasiekus slenkstinę vertę membrana staigiai depoliarizuojasi kol yra sugeneruojamas veikimo potencialas. Šis potencialas gali būti sugeneruojamas dėl mechaninio, (Kishimoto, 1968), terminio, (Krol ir kt., 2006) šviesinio stimuliavimo (Trebacz ir kt., 2006) ar elektrinio stimuliavimo (Kisnierienė ir kt., 2016), tačiau svarbu, jog šie stimulai nesukeltų pažeidimų augalo audiniuose. Pastebėta, jog kartais stimulus neturi būti per intensyvus, kad sužadintų veikimo potencialą, bet tai priklauso nuo stimulo savybių (Retivin ir kt., 1997). Sugeneruoti veikimo potencialai yra perduodami iš vienos ląstelės kitai per plazmodezmas simplasto būdu (Van Bel ir kt., 2004) tai įrodyta eksperimentiškai *Nitella* ląstelėse, kai vienoje ląstelėje sugeneruotas veikimo potencialas sklido per keletą gretimų ląstelių tolyn (Spanswick ir kt., 1967). Tokio principo tyrimai buvo pakartoti ir *Elodea* lapuose (Spanswick, 1972). Kaip ir gyvūninėse sistemose, taip ir augalinėse, veikimo potencialai pasižymi viskas arba nieko principu ir nepriklausomai nuo stimulo intensyvumo jų amplitudė yra pastovi (Trebacz ir kt., 2006). Veikimo potencialai augalinėse sistemose sklinda tik gyvais audiniais ir pastoviu greičiu (1-100 mm/s), kuris priklauso nuo paties augalo (Huber ir kt., 2016). Didžiausias elektrinio signalo greitis yra motoriniuose augaluose (100-200 mm/s), kas yra panašu į veikimo potencialų greičius *Anodonta* nervinėse ląstelėse (45 mm/s), bet žinoma yra daug lėčiau nei *Octopus* (3 m/s) ar žinduolių nervinėse ląstelėse (iki 100 m/s) (Lüttge ir kt., 2005). Taip pat veikimo potencialams būdingas refrakterinis periodas, kurio metu nėra generuojami veikimo potencialai. Augalinėse sistemose nesužadinanumo periodai yra ilgi, išimtis motoriniuose, vabzdžiaėdžiuose augaluose generuojami veikimo potencialai (Krol ir kt., 2016). Bet nesužadinanumo periodas yra ilgesnis nei samanose ir dumbliuose (Favre ir kt., 2007). Gyvūninėse sistemose sugeneruotų veikimo potencialų absoliutus ir reliatyvus

refrakterinis periodas 0,001-0,01 s, kai augalinėse sistemose *Characeae* - 4-40 s, o *Conocephalum* jis gali trukti iki 4 min (Lüttge ir kt., 2005)

Gyvūninėse sistemose veikimo potencialų generavimui yra būtini  $\text{Na}^+$  ir  $\text{K}^+$  jonai, tuo metu augaluose ši vaidmenį atlieka  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  ir  $\text{K}^+$  jonai (1 pav.). Augalinėse sistemose veikimo potencialų generavimas yra siejamas su  $\text{Ca}^{2+}$  jonų pralaidžių kanalų aktyvacija ir šių jonų įtekėjimu į citoplazmą (Heidrich ir kt., 1994). Eksperimentiškai buvo įrodyta, jog augalui patyrus įvairaus pobūdžio stimuliaciją yra padidinamas  $\text{Ca}^{2+}$  jonų kiekis citoplazmoje, kaip atsakas į stresą (Knight ir kt., 1991). Veikimo potencialų generavimas daro įtaką įvairiems fiziologiniams procesams vykstantiems ląstelėse. Tyrimuose su *Characeae* internodalinėmis ląstelėmis nustatyta, jog  $\text{Ca}^{2+}$  jonų įtekėjimas aktyvuoja  $\text{Cl}^-$  jonų kanalus ir stabdo citoplazmos judėjimą (Lunevsky ir kt., 1983). Taikant mangano gesinimo techniką, buvo parodyta, jog  $\text{Ca}^{2+}$  jonai yra išlaisvinami iš ląstelių viduląstelinio saugyklo (tikėtina, jog endoplazmonio tinklo) veikimo potencialų metu (Plieth ir kt., 1999). Taip pat yra siūloma, jog  $\text{Ca}^{2+}$  jonų įtekėjimas į ląstelės citoplazmą gali vykti pro neselektyvius katijonų kanalus plazminėje membranoje (Beilby ir kt., 2014)



1 pav. Veikimo potencialo pavyzdys augalinėse ląstelėse (*Nitellopsis obtusa*) ir veikimo potencialo generavime dalyvaujantys jonai

## Variabilūs potencialai

Variabilūs potencialai yra antra grupė elektrinių signalų, generuojamų aukštesniuosiuose augaluose, (Vodeneev ir kt., 2015), bet gali būti ir *Characeae* ląstelėse. Variabilūs potencialai nuo veikimo potencialų skiriasi savo forma (Salvador-Recatala ir kt., 2014), trukme (yra ilgesni, jų trukmė yra nuo minutės iki kelių dešimčių minučių (Hlavačkova ir kt., 2006), amplitude ir sklidimo greičiu (kas priklauso nuo pažaidos intensyvumo ir atstumo nuo stimuliavimo zonos)(Sukhova ir kt., 2018). Variabilaus potencialo sklidimo greitis varijuoja nuo 0,2 mm/s iki 20 mm/s (Vodeneev ir kt., 2018). Priešingai nei veikimo potencialai, variabilūs potencialai gali skliti ir negyvoje augalo ląstelėje (Fromm ir kt., 2007) ir taip pat skliti veikimo potencialo refrakterinio periodo metu (Oprytov ir kt., 1991). Šių potencialų susidarymo priežastis yra mechaniniai pažeidimai (Beilby ir kt., 2014) ir poveikis ugnimi, kas paskatina hidraulinės bangos susidarymą (Stahlberg ir kt., 2006) (hidraulinės bangos sklidimo greitis daugeliu atvejų yra didesnis nei variabilaus potencialo sklidimo greitis (Vodeneev ir kt., 2015)) ir sklidimą ksilema, veikiant ląstelių plazminėse membranose esančius jonų kanalus, kurių atsivėrimas ir sužadina variabilius potencialus (Fromm ir kt., 2007). Be hidraulinės bangos susidarymo yra stebimas ir įvairių cheminių medžiagų išsiskyrimas pažeidimų metu į ksilemą, kas irgi gali skatinti variabilių potencialų susidarymą (Sukhov, 2016). Išskylanti problema yra žemas šių cheminių junginių difuzijos greitis (nuo keleto  $\mu\text{m/s}$  (Storti ir kt., 2018) iki 1 mm/s (Huber ir kt., 2016)). Be to yra diskutuojama dėl skirtingų junginių susidariusių pažeidimų metu įtakos variabilių potencialų generavimui –  $\text{H}_2\text{O}_2$  (kas tikėtina yra pagrindinis cheminis signalas (Vodeneev ir kt., 2015) galintis aktyvuoti skirtingo tipo kalcio jonų kanalus esančius membranose (Demidchik ir kt., 2018)); jazminų rūgštis (Hlavinka ir kt., 2012); absizinė rūgštis (Leon ir kt., 2001); glutamatas (Toyota ir kt., 2018). O tai parodo, jog skirtingos augalų rūšys yra prisitaikiusios savitai reaguoti į aplinkos pokyčius ir perduoti informaciją. Variabilūs potencialai, kaip ir veikimo potencialai yra sudaryti iš 2 fazių. Pirmos stadijos (depolarizacijos) metu generuojant variabilius potencialus yra aktyvinami mechanojautrūs, ir ligandų valdomi  $\text{Ca}^{2+}$  jonų kanalai (aktyvacija įvyksta dėl hidraulinės bangos sklidimo ar pažaidų metu susidariusių cheminių junginių (Kaiticheva ir kt., 2018)). Yra tikėtina, jog  $\text{Ca}^{2+}$  jonų kiekio padidėjimas citoplazmoje sukelia  $\text{H}^+$ -ATPazių inaktyvaciją, kas prisideda prie ilgai trunkančios depolarizacijos (Sukhova ir kt., 2017). Kartu yra siejama, jog aktyvaus  $\text{Ca}^{2+}$  transporto slopinimas, dėl energijos ląstelėje trūkumo, irgi gali prisidėti prie ilgai trunkančios depolarizacijos fazės. Tačiau generuojamos greitos depolarizacijos ir į veikimo potencialą panašaus staigaus membranose potencialo padidėjimo atsiradimas yra siejamas su aktyvacija nuo įtampos priklausomų  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų ir papildomos  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracijos citoplazmoje (Kaiticheva ir kt., 2014). Tolimesni variabilaus potencialo formavimosi procesai yra panašūs į veikimo potencialus, dėl  $\text{Ca}^{2+}$  jonų aktyvuojamų anijonų kanalų ir vystymosi elektrinių atsakų. Sklindant

variabiliems potencialams yra fiksuojami tiek intraląsteliniai, tiek ekstraląsteliniai pH,  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracijos pokyčiai (padidėjimas keletu  $\mu\text{M}$ ), ir tuo pačiu kitų ląstelei būtinų jonų kiekis (iki keletos mM ar daugiau) (Sukhov ir kt., 2013). Taigi pats variabilių potencialų mechanizmas yra panašus į veikimo potencialų generavimo mechanizmą (Vodeneev ir kt., 2015), o specifinės šių signalų savybės yra sietinos su skirtingais signalo sklidimo mechanizmais.

### **Sisteminiai potencialai**

Mažiausiai ištirta elektrinių signalų grupė augaluose. Kaip yra pastebėta sisteminių potencialų sklidimas yra siejamas su ląstelės membranos hiperpoliarizacija. Tokio tipo signalai yra aptariami keliuose darbuose (Vinalham-Eckert ir kt., 2018) ir tai siejama su ląstelių stimuliavimu specifiniais cheminiais agentais, kaip  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$  jonai ar ABA. Tuo pačiu sisteminius pokyčius ląstelėse sužadina ir aplinkos veiksniai kaip mechaniniai pažeidimai susidarę dėl biotinio ir abiotinio aplinkos poveikio ar augalo kaitinimas, kas rodo sąsają tarp skirtingų elektrinių signalų sužadinimų (Zimmermann ir kt., 2016). Tačiau sisteminių potencialų pranašumas yra gebėjimas skliti augalo dalimis, kuriomis veikimo ar variabilūs potencialai nesklinda ir kaip variabilūs potencialai, sisteminiai potencialai gali skliti veikimo potencialų refraktorinio periodo metu (Zimmermann ir kt., 2009). Sisteminių potencialų sužadinimas yra siejamas ir su stimuliuojama zona augale. Atliktame eksperimente su tuopomis buvo pastebėta, jog pakaitinus pirmąjį, viršūninį lapą augale generuojamas sisteminis potencialas, bet jeigu yra kaitinami tolimesni lapai einantys nuo viršūnės, tai lemia variabilių potencialų generavimą (Lautner ir kt., 2005). Lyginant elektrinių signalų greičius sisteminiai potencialai, kaip ir variabilūs potencialai yra lėti – 0,4-1,0 mm/s (Zimmermann ir kt., 2009) arba kituose šaltiniuose yra teigiama jog greitis gali siekti iki 4-8mm/s (Lautner ir kt., 2005). Sisteminiai potencialai kartu sukelia ir jonų pokyčius simplaste ir apoplaste, vieni iš pagrindinių pokyčių tai yra  $\text{Ca}^{2+}$  jonų koncentracijos sumažėjimas apoplaste (nuo 1mM iki 0,5 mM) ir  $\text{K}^+$  (nuo 18 mM iki 2 mM) ir padidėjimas  $\text{Cl}^-$  jonų koncentracijos apoplaste (nuo 3mM iki 40mM), kartu tai paskatina ir apoplasto pH pokyčius (padidėjimas nuo 4,5 iki 5 pH) (Zimmermann ir kt., 2009)

### **Citoplazmos judėjimas – aktino ir miozino sąveika**

Citoplazmos judėjimas pirmą kartą buvo aprašytas Bonaventura Corti's, augalinėse ląstelėse (Corti, 1774). Toks judėjimas buvo pastebėtas amebose (Allen ir kt., 1978), dumbliuose ir sausumos augaluose (Shimmen, 2007) bei grybuose (Cole ir kt., 1998). Citoplazmos judėjimas atlieka svarbų vaidmenį ląstelės metabolizme (Pickard, 2003; Shimmen, ir kt., 2004; . Shimmen, 2007; Verchot-Lubicz ir kt., 2010). Augaluose judėjimas yra sukliamas citoplazmoje esančių motorinių baltymų miozinių, judančių išilgai aktino filamentų išsidėsčiusių greta plazminės membranos ir

tempiančių mikroskopinis pūsleles ir organoidus (Kachar ir kt., 1988) ir taip kartu sukeldami citoplazmos srautą. Citoplazmos judėjimas vyksta dėl miozino - motorinio baltymo, kuris konvertuoja cheminę energiją išlaisvintą iš ATP, dėl ATP hidrolizės, į kryptingą judėjimą aktino filamentais. Judėjimo greitis skirtingų rūšių ląstelėse yra nevienodas ir priklauso nuo miozino tipo bei sandaros. Miozinas yra klasifikuojamas į 18 subšeimų iš kurių tik trys yra aptinkamos augaluose – VIII, XI, XIII (Reichelt, 2013).

Ciklozė – *Chara* ir *Nitella* ląstelėse – motorinio baltymo miozino judėjimas aktino filamentais transportuojant vezikules (endoplazminio tinklo) (Nothnagel ir kt., 1982). *Chara* ir *Nitella* menturdumblių miozinas pasižymi dideliu judėjimo greičiu aktino filamentais- 40 - 60  $\mu\text{m/s}$ , tačiau gali pasiekti net 100  $\mu\text{m/s}$  priklausomai nuo aplinkos sąlygų: temperatūros ir ląstelės geometrijos (greitas miozino judėjimas aktino filamentais pastebėtas ląstelėse, kurių skersmuo didesnis nei 0,5mm, vidutinis *Characean* ląstelės skersmuo - 1mm (Goldstein ir kt., 2008).) (Kimura ir kt., 2003) kas yra 10 kartų greičiau nei raumeninėse ląstelėse ar aukštesniuose augaluose esančio miozino (Higashi-Fujime, 1980; Rivolta ir kt., 1995. Daugelyje augalų judėjimo greitis yra tik keli mikrometrai per sekundę (Shimmen ir kt., 2004)

Pirminė motorinio baltymo miozino struktūra - sudaryta iš motorinio/galvos domeno, šešių IQ motyvų, prie kurių specifiskai prisitvirtina kalmodulinas – lengvoji miozino grandinė, specifinės ritės struktūros galinės dimerizuotės ir globulininės formos uodegos domenas, prie kurio tvirtinasi nešamas krovinys. Manoma, jog struktūra gali turėti įtakos miozino judėjimo greičiui (Rivolta ir kt., 1995). *Chara* miozinas savo sandara buvo panašus į kituose augaluose esančius miozinius ir priskirtas miozinių XI klasei. *Chara* miozino molekulinė masė – 225 kDa remiantis SDS-PAGE (Rivolta ir kt., 1995).

*Chara* miozinas taip pat pasižymi ganėtinai trumpomis specifinėmis kilpomis – 1 ir 2, kurios tikėtina yra susijusios su *Chara* miozino mechanocheminėmis savybėmis (Morimatsu ir kt., 2000) ypač trumpa kilpa-2 lyginant su kitais mioziniais manoma yra reikšmingas struktūrinis pagrindas lemiantis greitą *Chara* miozino judėjimą aktino filamentais. Yra stebimi skirtumai tarp kilpos-1 ir kilpos-2 sekų skirtinguose miozinuose, dėl to yra teigiama, jog šie skirtumai irgi charakterizuoja skirtingų klasių miozinius. Pastebima, jog kilpa-1 yra išsidėsčiusi arčiau ATP prisijungimo vietos, kai tuo tarpu kilpa-2 yra arčiau miozino ir aktino sąveikos srities. Sukūrus chimerinius miozinius su kilpomis iš kitų klasių miozinių, buvo nustatyta, kad jų mechanocheminės savybės ženkliai sulėtėjo (Sweeney ir kt., 1998; Uyeda ir kt., 1994).

Kitame darbe naudojant chimerinius miozinius su pakeistais motoriniais/galvos domenais buvo tiriama, kaip fiziologinės citoplazmos srauto savybės priklauso nuo miozino mechanocheminių savybių. Eksperimentas buvo atliktas naudojant *Arabidopsis thaliana* mioziną, kaip bazinį vienetą, kuriame yra pakeičiami motoriniai domenai (miozino greitis - 5µm/s). Pakeitimai buvo atliekami su besiskiriantį judėjimo greitį turinčiais miozinais – *Chara* miozinas - judėjimo greitis – 50 µm/s ir lėto judėjimo miozinas iš žmogaus raumeninių ląstelių, kurio greitis siekia tik 0,2 µm/s. Stebint šių mutantinių augalų augimą buvo pastebėtas jų dydžio pokytis, lyginant su nemodifikuotą mioziną turinčiais augalais. Augaluose turinčiuose greito judėjimo miozinius pastebėta, jog jie yra didesni, lėtojo miozino augalai buvo mažesni, tačiau tai yra ne dėl ląstelių kiekio skirtumo tarp augalų, o su miozino judėjimo greičiu ląstelėse, nes didelio greičio miozinas lėmė tai jog susiformavo didesnės ląstelės (Tominaga ir kt., 2015). Tai patvirtino, jog citoplazmos judėjimo greitis yra glaudžiai susijęs su augalų augimu ir manoma, jog tai galėtų tapti raktiniu reguliatoriumi lemiančiu augalų dydį (Tominaga ir kt., 2013)

Raumenyse esančio miozino veikimo mechanizmas aiškinamas remiantis – sverto/rankos modeliu (Uyeda, ir kt., 1996), tačiau kyla klausimas ar galima šiuo modeliu remiantis suprasti *Chara* miozino didelio judėjimo priežastį, nes miozino kaklo domenai nėra 10 kartų ilgesni nei raumenų miozino (Yamamoto, ir kt., 1995), tuo pačiu aktino aktyvuota ATPazė irgi nėra 10 kartų aktyvesnė nei esanti raumenyse.

*Chara* miozino domenų analizės metu buvo pastebėta esant struktūriniais atitikmenims su kituose augaluose esančiais miozinais, pavyzdžiui, motorinio/galvos domeno sudaryto iš 739 aminorūgščių liekanų, atitikimas yra 65, 64, 63 ir 62 proc. – *Helianthus annuus* (saulėgražas), *Zea mays* (kukurūzas), *Arabidopsis thaliana* MYA1 ir MYA2 atitinkamai. Lyginant su gyvūninės kilmės miozinais, N-terminaliniuose regionuose skeleto raumenų miozinai ilgesni apie 88 aminorūgščių liekanomis, lyginant su kitomis sekomis miozinų I, kai *Chara* miozino esančios 50 aminorūgščių yra panašios į XI ir V klasės miozinius. Kaklo domenai yra apibūdinami šešiais IQ motyvais, kurie yra specifiski prisijungti kalmoduliną ir yra jautrūs kalcio jonams (Cheney ir kt., 1993). Ir tai yra glaudžiai susiję su citoplazmos srauto pokyčiais atsirandančiais dėl membranos depoliarizacijos, sukeltos elektrinės stimuliacijos ar mechaninio poveikio (Hayama ir kt., 1979; Shimmen ir kt., 1999; Shimmen ir kt., 1994, Tazawa ir kt., 2001), kas lemia citoplazminio kalcio jonų kiekio padidėjimą, dėl kalcio jonų išlaisvinimo iš viduląstelių talpyklų. Kintanti kalcio jonų koncentracija ląstelėse gali skirtingai paveikti motorinius baltymus – miozinius priklausomai nuo jų sandaros savybių, nes padidėjusi kalcio koncentracija gali veikti tiek slopinančiai, tiek aktyvuojančiai (Williamson, 1986). Tyrimuose naudojami miozinai išgauti iš skirtingų organizmų grupių – triušų,

moliuskų ir gleivūnų kurie skiriasi savo jautrumu kalciui. Iš triušių raumeninių ląstelių išgautas miozinas yra nejautrus kalcio koncentracijos pokyčiams, nes kalciui jautri zona yra ant aktino filamentų. Priešingai yra moliuskų raumenyse ir gleivūnų (*Physarum*), kurių miozinas turi kalciui jautrias zonas mikromolinėms kalcio koncentracijoms, kurios moliuskuose stimuliuoja aktino aktyvuotą Mg-ATPazę, bet slopina *Physarum* miozino aktyvumą (Williamson, 1986). Naudojantis pūslelėmis padengtomių skirtingo tipo miozinais ir įterptos į *Characea* ląsteles eksperimentiškai buvo įrodyta, judėjimo pokytis priklausomas nuo citoplazminio kalcio koncentracijos ir miozino tipo. Šis judėjimas dėl padidėjusios citoplazminės kalcio koncentracijos nepakisdavo, sulėtėdavo arba būdavo stimuliuojamas. (Kohana ir kt., 1985; Vale ir kt., 1984). *Characea* ląstelėse kalcio jonų kiekio padidėjimas lemia trumpalaikį citoplazmos judėjimo sustojimą (Hill, 1941; Sibaoka ir kt., 1956; Shimmen ir kt., 1994) tačiau atliktuose stebėjimuose in vitro *Chara* miozinas neparodė jautrumo kalcio jonams (Higashi-Fujime, ir kt., 1995) ir tai pastebėta keletą kartų, nors *Chara* miozinas ir turi IQ motyvą ir yra asocijuotas su kalmodulinu sunkiojoje grandinėje (Awata ir kt., 2001). In vitro judrumo tyrimuose naudojant tabako mioziną XI buvo gauta, kad šis miozinas yra neigiamai reguliuojamas kalcio jonų sukeltos kalmodulino disociacijos nuo kaklo domeno (Yokota ir kt., 1999). Naudojant elektroninę mikroskopiją buvo pastebėta, jog kaklo domenai tabako XI miozino buvo trumpesnis 30 proc. dėl pCa 4. Atlikus molekulinę struktūrinę analizę buvo pastebėta, jog miozino žingsnis nuo pradinio 35 nm, esant pCa 4 sutrumpėjo iki 27 nm kai apkrova yra maža ir iki 22 nm esant didelei apkrovai. Taip pat pastebima, jog aktinas gali surišti troponin-tropomiozino kompleksą, kuris sukeltų aktino filamentų jautrumą citoplazminio kalcio koncentracijos padidėjimui, kaip panašiai yra triušių skersaruožuose griaučių raumenyse, kuriuose šis kompleksas neleidžia miozinui sąveikauti su aktinu, nebent citoplazminė koncentracija padidėja nuo 0,1 μM iki 1 μM (Williamson 1986). Kyla klausimų ar *Chara* miozino judėjimas kinta dėl tiesioginio kalcio jonų prisijungimo prie kalmodulino ar ne, ar tai gali būti siejama su kalcio jonų aktyvuotomis fosfatazėmis ir ar padidėjusi kalcio koncentracija paveikia ir aktino filamentus, tačiau tai nustatyti yra reikalingi tikslesni biocheminiai tyrimai

Hidrofobinis regionas – 875K – 1635V suformuoja ritės pavidalo struktūrą galinčią dimerizuotis, suformuojant dvigalvę struktūrą. Domenai nuo 1076Q iki 1630S yra specifiskai charakterizuojami dėl šioje dalyje esančio tandeminio pasikartojimo 33 aminorūgščių vienetų, nors kai kuriuose iš šių pasikartojimų būdavo pasikeitusios 1 arba 2 aminorūgščių liekanos. Šio tipo tandeminiai pasikartojimai nebuvo pastebėti kituose miozinų tipuose. Nors MYA3 išgautas iš *Arabidopsis thaliana* irgi turi 33 aminorūgščių pasikartojimus, tačiau *Chara* miozino pasikartojantys vienetai nėra homologiški MYA3 (Morimatsu ir kt., 2000). Po šių tandeminių pasikartojimų

išliekantis C-terminalinis regionas neparodo išskirtinių struktūrinių savybių ir suformavo globulinę uodegą, kuri struktūriškai yra panaši į XI klasės miozinas.

Lyginant skirtingų klasių miozinas buvo pastebėti skirtumai tarp judėjimo būdo, miozinių priklausančių V klasei judėjimas yra paremtas miozino judėjimu dideliais žingsniais aktino filamentais (Mehta, ir kt., 1999), kai raumenyse esantis miozinas S1 juda dėl daugiažingsniškumo esančio vieno ATPazės ciklo metu (Kitamura ir kt., 1999).

Citoplazmos judėjime dalyvauja ir mikrovamzdeliai, specifinės baltymų struktūros, kurios pagal savo sudėtį yra ganėtinai konservatyvios, dėl to tai leidžia suprasti citoplazmos judėjimą vykstantį augaluose remiantis gyvūninių ląstelių modeliu (Williamson, 1986) Tai yra stebima daugelyje ląstelėse vykstančių procesų: chloroplastų judėjime link šviesos šaltinio (Allen ir kt., 1978) branduolio judesiuose citomorfogenezės metu; mitozės metu chromosomų judėjime link centriolių esančių skirtinguose ląstelės poliuose ir Goldžio komplekso vezikulių judėjime citokinezės metu (Williamson, 1986). Tačiau kinezino judėjimo greitis mikrovamzdeliais yra tik 150 nm/s (Romagnoli ir kt., 2003) ir dažnai lieka nepastebėtas, lyginant su miozino judėjimu aktino filamentais.

Pirmieji moksliniai darbai, kurie buvo skirti analizuoti molekulinį mechanizmą citoplazmos judėjimo buvo atlikti naudojantis vadinamomis gigantinėmis internodalinėmis ląstelėmis: *Characean* dumbliuose – *Chara* ir *Nitella* (Kamiya ir kt., 1956); gyvūnuose pasitelkiant kalmarų gigantiškųjų neuronų aksonus (Williamson, 1986), tik po 200 metų nuo šio proceso atradimo. Tyrimuose su *Nitella* dumblių ląstelėmis buvo pastebimas sukamasis judėjimas, kurio mechanizmas yra sukiamas slydimo tarp endoplazmos ir ektoplazmos sąsajos ir šis judėjimo mechanizmas yra galimas, nes lyginant su kitomis augalinėmis ląstelėmis, *Nitella* ląstelių chloroplastai yra tvarkingai inkorporuoti nejudriame ektocitoplazmos sluoksnyje (Kamiya ir kt., 1956). Taip pat lyginant citoplazmos judėjimą augalinėse (remiantis *Chara corallina* modeliu) ir gyvūninėse ląstelėse (neuronų aksonuose) yra pastebimi akivaizdūs skirtumai. *Chara corallina* ląstelėse stebimas judėjimas dviem priešingomis kryptimis išilginėmis juostomis sudarytomis iš aktino filamentų pluoštų (Skimmen, 2007; Sheetz ir kt., 1983). Aktino filamentai išsidėstę dumbliuose *Chara* šalia plazminės membranos. Nustatyti, kad aktino filamentai dalyvauja citoplazmos judėjimo generavime buvo naudojami farmakologiniai tyrimai su aktino filamentų polimerazės inhibitoriumi – citochallasinu, tyrimai parodė, jog citoplazmos srautas atsistato po paveikimo citochallasinu (Williamson ir kt., 1972). Ir remiantis įvairių tyrimų rezultatais buvo įtvirtinta, jog aktinas ir miozinas kaip bendra sistema esanti arti plazminės membranos lemia citoplazmos judėjimą. Kiekvienas kabelis yra sudarytas iš daugelio individualių aktino filamentų kurių kiekvienas formuoja visam kabeliui būdingą poliškumą (Kersey ir kt., 1976) ir miozinas juda filamentais suformuota kryptimi nuo



neigiamo aktino filamento poliaus link teigiamo (Kersey ir kt., 1976)., filamentus skiria indiferentinė zona – linija, kurioje nėra įtvirtintų chloroplastų, kas yra kaip riboženklis skiriantis skirtingų kryptių citoplazmos sukamąjį judėjimą (Woodhouse ir kt., 2013). Judėjimas citoplazmos *Chara* ir *Nitella* ląstelėse yra lyginamas su anterogradiniu judėjimu neuronų aksonuose, kuris irgi vyksta kryptimi nuo neigiamo poliaus link teigiamo, tik neuronuose šis judėjimas yra atliekamas ne miozino, o kinezino (Williamson, 1986). Kai tuo tarpų neuronų aksonuose vykstantis dvikryptis transportas vykta išilgai vieno mikrovamzdelio anterogradine ir retrogradine kryptimi, skirtingų nešiklių (Williamson, 1986).

Išlieka klausimas, kaip susiformuoja šis paprastas, bet ryškus modelis morfogenezės metu ir kokie procesai yra atsakingi už formavimąsi dviejų vienodų aktino filamentų pluoštų (Woodhouse ir kt., 2013). Bandant suprasti šį mechanizmą buvo panaudotas citochalinas D ir orizalinas, kuriais buvo paveikiamos jaunos *Chara* ląstelės, norint sustabdyti citoplazmos judėjimo srautą ir išardyti aktino filamentų kabelius (Foissner ir kt., 2000). Ir šio tyrimo eigoje buvo pastebėta, jog aktino filamentai atsistato gradualiai, nors pirminėse atsistatymo stadijose yra stebimas netvarkingas judėjimas. Vėliau yra stebimas vietinių srautų susidarymas ir galiausiai atkuriamas galutinis aktino filamentų išsidėstymas, tik stebimas skirtumas tarp dviejų aktino filamentų gijų išsidėstymų, aktino filamentai būna pakeitę padėtį ląstelėje, remiantis indiferentine zona – linija, skirianti „up“ ir „down“ citoplazmos srauto juostas, kurioje nėra ektooplazmoje inkorporuotų chloroplastų, padėties pasikeitimu arba kitaip tai galima įvardinti modulio pasisukimu aplink centrinę ašį (Foissner ir kt., 2000).

Lyginant augaluose aptinkamus XI klasės miozinius su jų homologais gyvūninėse ląstelėse V klasės miozinais yra pastebimi akivaizdūs skirtumai jų įvairovėje. Atliktuose tyrimuose su *Arabidopsis thaliana*, buvo gauti net 13 skirtingų izoformų XI klasės miozinai (Tominaga ir kt., 2012) kai gyvūninėse ir grybų ląstelėse yra sutinkamos tik 2-3 V klasės miozinų izoformos. Naudojant fluorescuojančius dažus, buvo nustatyta, jog skirtingos XI klasės miozino izoformos yra prisitaikiusios pernešti tik tam tikrus organoidus, kaip pavyzdys iš *Arabidopsis thaliana* esantis XI-1 miozinas perneša Goldžio komplekso pūsleles ir peroksisomas, kai XI-2 yra pritaikytas pernešti tik peroksisomas, (Li ir kt., 2007) taip pat tabako augaluose miozinas XI-F yra pritaikytas chloroplastų transportui (Sattarzadeh ir kt., 2009).

### **Klasikinis L-tipo kalcio kanalų blokatorius – verapamilis**

Verapamilio yra kalcio kanalų blokatorius priklausantis fenilalkilaminų grupei, kuri turi aukštą afiniškumą  $\alpha_1$  subvienetui L tipo kalcio kanalo komplekse, todėl sukelia kalcio kanalo blokavimą kanalo ertmėje, prisitvirtindamas prie selektyvumo filtro, S6 segmento, III ir IV domenų.

(Striessnig ir kt., 1998; Hockerman et al., 1997; Hofmann et al., 1999; Striessnig, 1999). Kartu yra stebimas verapamilio poveikis ir kitiems nuo įtampos priklausomiems kalcio jonų kanalams kaip T-tipo kalcio kanalams žmogaus smegenyse (Freeze ir kt., 2006), P- ir tikėtina N- ir Q- tipo kalcio kanalams žiurkių smegenyse (Randall ir kt., 1995), nuo įtampos priklausomuose hERG geno koduojamuose kalio kanaluose esančiuose žinduolių centrinėje nervų sistemoje (Becchetti ir kt., 2002; Tfelt-Hansen ir kt., 2009). Taip pat buvo parodytas H<sup>+</sup> ir K<sup>+</sup> ATPazių slopinimas parietalinėse ląstelėse (Blakeman ir kt. 1984). Verapamilis yra lipofilinė medžiaga (Hardman ir kt., 1996), kas lemia greitą verapamilio perėjimą per kraujo-smegenų barjerą, tačiau dėl P-glikoproteinų verapamilis yra greitai pašalinamas iš galvos smegenų (Toornvliet ir kt., 2006). Klinikoje jis naudojamas gydyti širdies ir kraujagyslių ligas dėl gausaus L- tipo kalcio kanalų buvimo šiuose organuose ir stabilaus verapamilio prisijungimo (Morel ir kt., 1998). Verapamilio taikymo medicinoje pavyzdžiais galima laikyti – paroksimalinės supraventrikuliarinės tachikardijos gydymą (PSTV) (Tintinalli, 2004), skilvelių atsako ir prieširdžių virpėjimo kontroliavimą. Verapamilis vartojamas norint kontroliuoti vazospastinę, lėtinę stabilią ir nestabilią angina, hipertenziją. (Prisant, 2001). Tyrimuose yra parodomas ir verapamilio apsauginis poveikis miokardui ir gebėjimas sumažinti miokardo nekrozės dydį, eksperimentiškai sukeltos gyvūnuose (Millard ir kt., 1982; Nayler ir kt., 1980). Verapamilio perdozavimas gali sukelti hipotenziją, bradidistritmiją ir širdies sustojimą (Derlet ir kt., 1995). Augaluose yra taikomas kaip priemonė analizuoti nuo kalcio priklausomus procesus.

### **L tipo kalcio kanalų blokatoriaus verapamilio poveikis augalinėms ląstelėms**

Analizuojant gyvūninių ir augalinių ląstelių kalcio kanalų struktūrinius ir funkcinius panašumus ir skirtumus tyrimuose dažnai yra taikomi įvairūs organiniai kalcio kanalų antagonistai, kurių veikimas gyvūninėse ląstelėse jau yra žinomas (Pineros ir kt., 1997). Tokie antagonistai yra suskirstyti į keletą klasių pagal savo veikimo savybes iš kurių dvi pagrindinės grupės fenilalkilaminai, tokie kaip verapamilis ir D600, bei dihidropiridiniai – nifedipinas ir Bay K8644. Visi jie buvo naudoti charakterizuojant gyvūnų ląstelėse aptinkamus kalcio kanalus, pateikiant išsamią informaciją apie jų sandarą ir funkcijas (Campbell ir kt., 1988; Miller, 1992). Atliktuose tyrimuose, kuriuose yra apžvelgiamas verapamilio poveikis yra pateikiama įvairių įrodymų apie verapamilio poveikį augaluose esančioms kalcio jonų pernašos sistemoms, priklausomai nuo verapamilio koncentracijos ir veikimo trukmės (Pineros ir kt., 1997). Veikiant *rca* tipo kalcio kanalus išoriškai mažesnės nei 0,5μM koncentracijos verapamilio tirpalu. buvo stebimas įtekančiųjų kalcio srovių blokavimas, tačiau signalo amplitudė nesumažėjo (Pineros ir kt., 1997). Panašūs duomenys gauti gyvūninėse ir augalinėse ląstelėse. Kalcio įtekėjimo blokavimas *Physcomitrella patens* (Schumaker ir kt. 1993), *Daucus carota* (Graziana ir kt., 1988) ir *Amaranthus tricolor* (Rengel ir kt., 1992) protoplastuose

buvo stebimas dėl verapamilio ir jo darinių, tokių kaip D600 ir D888 – desmotoksiverapamilio, poveikio. Kalcio įtekėjimo blokavimas nebuvo stebimas *Triticum aestivum* (Huang ir kt., 1994) ir *Zea mays* (Marshall ir kt., 1994), kai verapamilio koncentracija buvo padidinta iki 10  $\mu\text{M}$ . Tačiau vis dėlto interpretacija šių farmokologinių rezultatų išlieka atvira, kaip ir poveikio organinių antagonistų membranos potencialui. Verapamilis gali veikti įvairius kanalus esančius augalinėse ląstelėse, sumažindamas jų atsivėrimo trukmę, tonoplastuose (Gelli ir kt., 1993), endoplazminiame tinkle (Klusener ir kt., 1995), plazminėje membranoje – aukštesniųjų augalų (Thuleau ir kt., 1993) ir dumblių (Aleksandrov ir kt., 1990). Šiuose tyrimuose kalcio kanalų nustatymui buvo naudojamas patch-clamp metodas (Alexandre ir kt., 1990). Verapamilis gali paveikti augalinėse ląstelėse vykstančius procesus, kurie yra susieti su kalcio tarpininkavimu: mitozės metu anafazės stadijoje (Wolniak ir kt., 1986), dulkiadaigių daigume ir viršūniniame augime (Reis ir kt., 1985) taip pat ir *Fucus* zigotų augime (Kropf ir kt., 1987) ir pumpurų sužadiniame *Funaria* (Conrad ir kt., 1988). Buvo parodyta, kad verapamilis jungiasi prie augalinių ląstelių membranų (Andrejauskas ir kt., 1985; Graziana ir kt., 1988) Dumblio *Micrasterias* ląstelėse, verapamilis paveikia citoplazmos judėjimą, kurį reguliuoja kalcio jonai (Lehtonen, 1984). Taip pat yra stebėtas verapamilio poveikis *Funaria hygrometrica* viršūniniame augimui ir buvo nustatyta, jog skirtingos koncentracijos gali turėti nevienodą įtaką. Po 2-8h verapamilio veikimo, Knop agare auginamuose augaluose buvo stebimas viršūninės zonos sutrumpėjimas ir pabrinkimas ir augimo greičio sumažėjimą iki 0-6  $\mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$  esant  $1\cdot 10^{-3}$  M verapamilio koncentracijai ir 3-15  $\mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$  esant  $5\cdot 10^{-4}$  M verapamilio koncentracijai. Šio tyrimo metu buvo stebėta ir viršūninių ląstelių vakuolizacija, kuri irgi galėjo būti paskatinta verapamilio veikimo (Wacker ir kt., 1990). Kituose tyrimuose yra pastebima, jog verapamilis gali būti panaudojamas kaip priemonė kovojant su augalų virusais, nes verapamilis užblokuoja plazminės membranos ir vidinių membraninių organoidų kalcio kanalus (Spedding ir kt., 1992), gali pažeisti kalcio tarpininkaujamus signalus reikalingus virusų dauginimuisi ir judėjimui ląstelėje (Singht ir kt., 2011). Naudojant fluorescuojančius žymenis buvo tirtas verapamilio poveikis kalcio srovėms *Arabidopsis* augaluose buvo stebima, jog 100  $\mu\text{M}$  verapamilio koncentracijos tirpalas negrįžtamai inhibuoja hiperpoliarizacijos aktyvuotas kalcio sroves (Kiegle ir kt., 2000), tačiau kitų tyrimų metu pastebėta, kad 0,5  $\mu\text{M}$  verapamilio sukelia kalcio srovių blokadą kviečių šakniaplaukiuose, blokuojant kalciui laidžius kanalus (Píneros ir kt., 1997).

Kalbant apie menturdumblių elektrofiziologinių savybių pokyčius yra nustatyta, jog verapamilis, kurio koncentracija yra 100  $\mu\text{M}$  depoliarizuoja ramybės potencialą nuo -203 mV iki -179 mV. Taip pat pastebėtas veikimo potencialo prailgėjimas nuo 3,5 s iki 4,9 s, o veikimo potencialo pikas pakyla nuo -51 mV iki -35 mV, kartu sumažėja membranos laidumas piko metu nuo 720 iki

450  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^2$  . Veikiant verapamilu, taip pat nėra fiksuotas citoplazmos judėjimo sustojimas veikimo potencialio metu, visi šie stebėjimai yra gauti atliekant tyrimus su *Chara corallina* (Tsutsui ir kt., 1987).

## II. METODIKA

### Tyrimo objektas

*Nitellopsis obtusa* – žvaigždėtasis maurašakis Šiaurės pusrutulyje aptinkama menturdumblių *Characeae* rūšis, natūraliai paplitusi Europoje ir Azijoje, nors šiuo metu tam tikruose regionuose stebimas šios rūšies individų skaičiaus sumažėjimas (Kato ir kt., 2014) ir net tam tikruose regionuose rūšis įtraukiama į saugomų rūšių sąrašus (Šveicarijoje (Auderset Joye ir kt., 2012), Vokietijoje (Korsch ir kt., 2008)), bet dėl klimato kaitos aptinkamas vis didesniame areale, pastaraisiais dešimtmečiais (Mason-Delmotte ir kt., 2013). Kaip invazinė rūšis užregistruota Šiaurės Amerikoje 1978m, į kurią manoma pateko prisitvirtinusi prie transatlantinių laivų (Geis ir kt., 1981). Tai yra vienintelė šios genties rūšis, susidariusi jau Kreidos – Tartero periodų sandūroje (Soulie – Marsche, 1979) ir remiantis iškastiniais įrodymais išplitusi tik Europos žemyne (~10 mlj. m). *Characeae* genties augalai yra vieni pirmųjų daugialąsčių augalų ir yra laikomi daugelio aukštesniųjų augalų protėviais (Boot et al. 2012, Zhong et al. 2015).

*Nitellopsis obtusa* yra prisitaikęs augti giliuose gėlo vandens telkiniuose (Boissezon ir kt., 2017) 2-14 m gylyje (Korsch ir kt., 2008) arba silpnai sūriuose vandens telkiniuose, nes gali išgyventi esant 50mM NaCl koncentracijai (Winter ir kt., 1999). *Nitellopsis obtusa* ląstelės nėra prisitaikiusios palaikyti turgorinį slėgį reguliuodamos Cl<sup>-</sup> ir K<sup>+</sup> jonų įtekėjimą ir ištekėjimą, ką gali kitos *Characean* rūšys, *Chara longifolia* (Hoffmann ir kt., 1986) ir *Lamprothamnium* (Bisson ir kt., 1980), kas lemia jų gebėjimą augti sūriuose vandenyse ar neįjautriai reaguoti į jonų kiekio pokyčius aplinkoje (Al Khazaaly ir kt., 2007).

Šie mentrudumbliai yra dvinamiai augalai, užaugantys nuo 0,3 iki 2 m aukščio ir suformuojantys tankias povandeninius giraites (Pullman ir kt., 2010; Larkin ir kt., 2018). Dauginimasis vyksta lytiniu ir nelytiniu būdu per žvaigždės formos „svogūnėlius“ – žvaigžduotes, kurioa yra prisitvirtinę prie stiebo apačios ir rizoidų ir turintys sudėtingą morfologinę sandarą (Fritsch, 1948; John, 2002). Šiuo būdu *N. obtusa* dauginasi po hibernacijos periodo (Bharathan, 1987). *N. obtusa* dauginimas nelytiniu būdu yra naudingas, nes suteikia galimybę dauginti augalus laboratorinėmis sąlygomis (Beilby ir kt., 2014). Dumblio spalva priklauso nuo fenologijos ir augimo sąlygų ir gali varijuoti nuo ryškiai žalios iki rudos spalvos (Larkin ir kt., 2018). Pagrindinis augalo stiebas yra tvirtas ir plonas – skersmuo 0,7 – 2 mm. Šakelės išsidėsto menturiškai po 5-8 ir jų ilgis yra iki 9 cm ir dažnai sudarytos iš 2-3 segmentų (Larkin ir kt., 2018). Talomas sudarytas iš daugiabranduolių, ilgų (iki 30 cm ilgio ir 0,5 mm storio), tarpubamblinių ląstelių, sujungtų bambliais, ląstelės tarpusavyje yra susijungusios plazmodezmozėmis (Beilby ir kt., 2014) ir galinčios gyventi

nepriklausomai viena nuo kitos kaip atskiri organizmai (Pupkis ir kt., 2021). Ląstelių tūrio didžiąją dalį užima vakuolė, kas lemia jog endoplazmos storis esantis tarp plazminės membranos ir tonoplasto yra ~10 μm. Endoplazma aplink vakuolę juda spirališkai iki 100 μm/s greičiu (Beilby ir kt., 2014). Tarpubamblinės ląstelės dėl savo dydžio, morfologinių ir fiziologinių savybių yra dažnai naudojama įvairiuose elektrofiziologiniuose augalų tyrimuose.

### **Tyrimo medžiagos surinkimas ir paruošimas**

*Nitellopsis obtusa* – žvaigždėtojo maurašakio subrendę gniužulai surinkti rugsėjo – lapkričio mėnesiais Stankos ežere (Vilniaus apsk., Trakų raj.) iš 4 – 8 m gylio ir transportuoti į laboratoriją talpyklose su ežero vandeniu. Laboratorijoje buvo perkelti į skaidraus stiklo akvariumus pripildytus vandentiekio vandeniu, kambario temperatūroje ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ), apšviesti standartiniu apšvietimu 12 h per parą ( $95 \pm 0,19 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Prieš atliekant eksperimentus tarpubamblinės ląstelės buvo atskiriamos nuo kitų šalia esančių ląstelių ir sudedamos į atskirą talpyklą su vandeniu (ląstelių gyvybingumo ir citoplazmos judėjimo tyrimams) arba į talpyklas su kontroliniu tirpalu (APW) elektrofiziologiniams matavimams. Buferinį/kontrolinį APW (dirbtinis tvenkinio vanduo) tirpalą sudaro – 0,1 mM KCl ir 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM NaCl ir 1,5 mM TRIS ir 3 mM HEPES. Šio tirpalo pH buvo 7,2. Skirtingų koncentracijų verapamilio tirpalai yra ruošiami, tirpinant verapamilį buferiniame tirpale APW. Paruošiamos 3 skirtingos verapamilio koncentracijos – 0,1 mM, 0,3 mM ir 1 mM.

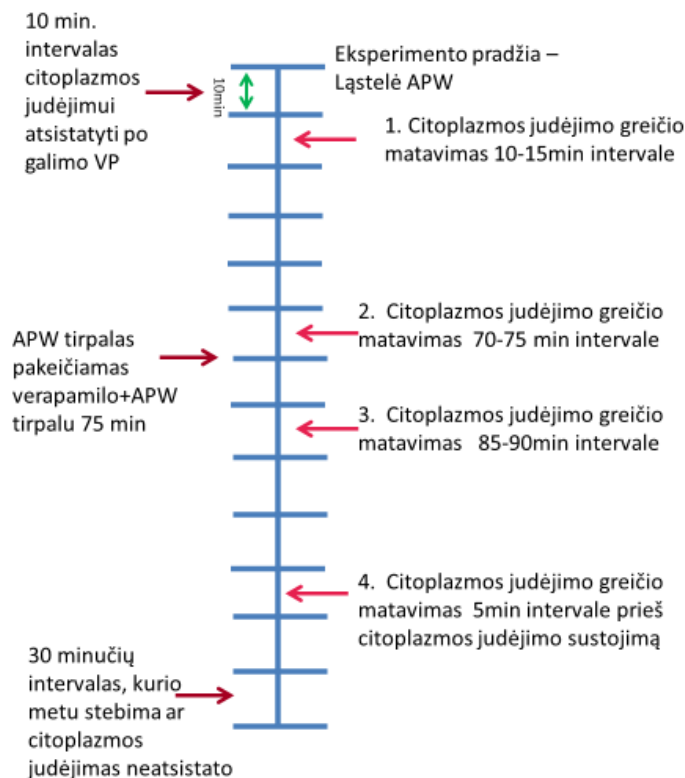
### **Ląstelių gyvybingumo tyrimas**

Paruošiamos trys organinio stiklo vonelės su skirtingų koncentracijų verapamilio tirpalais (0,1 mM ir 0,3 mM) ir buferiniu tirpalu APW. Į voneles yra panardinama 15 ląstelių ir tikrinama kas 30 min. Ląstelių gyvybingumas nustatomas vizualiniu būdu įvertinant turgorinio slėgio nebuvimą. Gauti duomenys suvedami į statistinę duomenų analizės programą – Origin Pro 2018

### **Citoplazmos greičio matavimai**

Ląstelės yra panardinamos į organinio plastiko kamerą pripildytą APW tirpalu ir padedama po šviesiniu mikroskopu – Nikon Eclipse FN1 vaizdas didinamas 100 kartų, su vaizdo stebėjimo programa – NIS-Elements F, kurioje stebimajame laukelyje fiksuojama 500 μm atkarpa, horizontaliai, sutampanti su ląstelėje esančia indiferentine linija, stebėti judėjimą ląstelėje dvejomis kryptimis. Vaizdas įrašomas naudojantis OBS Studio 24.0.3 vaizdo įrašymo programa. Vezikulių judėjimo laikas nustatytoje atkarpoje matuojamas chronometru.

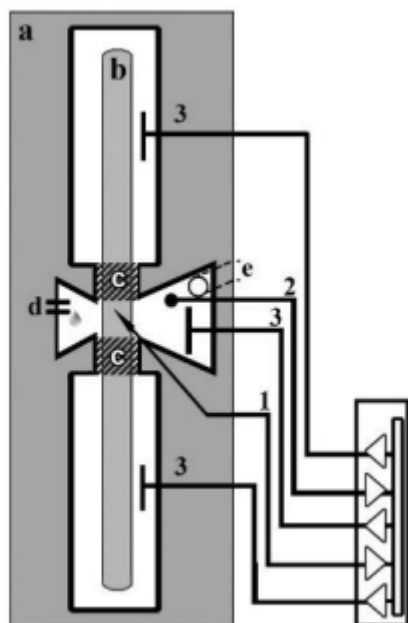
Eksperimento pabaigoje gauti įrašai buvo analizuojami 4 kartus (įrašų analizės schema pavaizduota 2 pav.). Vieno stebėjimo trukmė 5 min. Kiekvieno stebėjimo metu fiksuojamas 20 panašaus diametro vezikulių judėjimo laikas (po 10 vezikulių skirtingomis kryptimis) Pirmas stebėjimas atliekamas po 10 min nuo stebėjimo pradžios, eliminuojant galimo veikimo potencialo sugeneravimo dėl mechaninio stimulo perkeliant ląstelę iš ląstelių talpyklos į stebėjimo kamerą įtaką. Antras matavimas atliekamas prieš paveikiant ląstelę verapamilio tirpalu 70-75 stebėjimo minutę. Atliekamas tirpalų pakeitimas, pašalinamas kontrolinis APW tirpalas ir ląstelė yra užpilama verapamilio tirpalu (0,1 mM/ 0,3 mM). 85-90 stebėjimo minutę yra atliekamas trečias stebėjimas pirminei ląstelės reakcijai į verapamilį nustatyti. Ketvirtas matavimas atliekamas prieš citoplazmos judėjimo sustojimą (sustojimo momentas skirtingose ląstelėse priklauso nuo daugelio papildomų faktorių, kas lemia laiko momento skirtumus). Citoplazmai sustojus stebėjimas tęsiamas 30 min stebint ar citoplazmos judėjimas neatsistato. Tyrimo pabaigoje vizualiniu būdu įvertinamas ląstelės turgorinis slėgis.



2 pav. Citoplazmos judėjimo greičio matavimo schema

### Viduląstelinių elektrinių signalų registravimas

Tarpubamblinių ląstelių bioelektriniai signalai registruojami naudojant viduląstelinę mikroelektrodinę techniką, taikant dviejų elektrodų porų fiksuotos srovės ir fiksuotos įtampos metoda. (3 pav.).



3 pav. Registravimo kameros schema ir elektrodų išsidėstymas (Lapeikaitė, 2020)

- a) **Organinio stiklo kamera**
- b) **Tarpubamblinė ląstelė**
- c) **Centrinė kameros dalis izoliuota vazelinu**
- d) **Perfuzinė sistema (siurbliukas)**
- e) **Perfuzinė sistema (peristaltinė pompa)**
- 1. **Viduląstelinis stiklinis elektrodas**
- 2. **Referentinis stiklinis elektrodas**
- 3. **Išoriniai stimuliuojantys elektrodai (Ag/AgCl)**

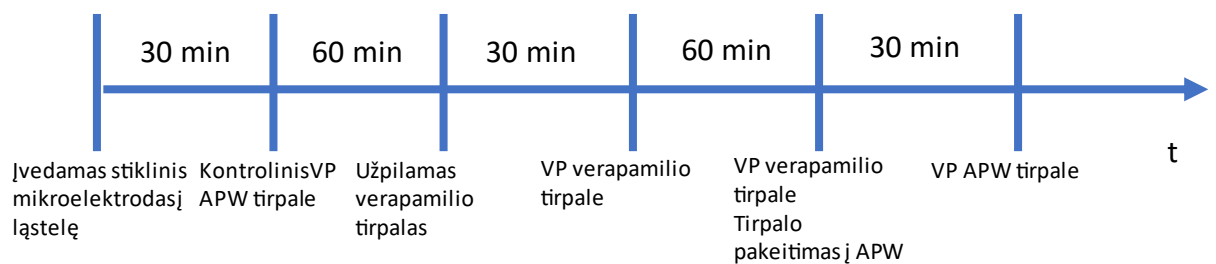
Viduląsteliniai mikroelektrodai gaminami iš borosilikatinių stiklo kapiliarų (vidinis  $\varnothing$  0,84 mm, World Precision Instruments) naudojant stakles (Sutter Instrument P-1000), suformuojant 1-3  $\mu\text{m}$  (8 – 20  $\text{M}\Omega$ ) elektrodo galiuko diametrą. Referentinio elektrodo galiuko diametras  $\sim$  100  $\mu\text{m}$ . Mikroelektrodai yra papildomi 3 M KCl tirpalu, referentinis elektrodas – agar-agaro (2,5%) 3 M KCl tirpalu. Elektrodų laikikliai yra paruošiami iš gyvsidabrio/kalomelio ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ), pripildyti 3 M KCl tirpalu. Nuolatinė elektros srovė, tarp atskirų kameros dalių leidžiama išoriniais sidabro chlorido elektrodais. Duomenys registruoti fiksuotos įtampos/srovės stiprintuvu TEC-10CX (NPI Electronic), analogas-kodas keitiklis Digidata 1440A (Molecular Devices), kontroliuojamas pCLAMP 10.2 (Molecular Devices) programinės įrangos. Naudotas diskretizacijos dažnis: 100-1000 Hz, signalas stiprintas 10 kartų. Tirpalų pratekėjimas ( $\sim$ 1 ml/min) centrinėje kameros dalyje realizuotas naudojant peristaltinę pompą ir vakuuminį siurbliuką (Scientifica PPS). Mikroelektrodai į ląstelę įvedami manimuliumi (PatchMan, Eppendorf), stebint binokuliaru (7x didinimas). Dėl didelio vakuolės tūrio ( $\sim$ 95% Beilby ir kt., 2014), mikroelektrodas įvedamas į vakuolę, tai lemia, jog yra registruojami ne tik plazminės membranos veikimo potencialai, bet ir tonoplasto. Mikroelektrodo pozicija nustatoma pagal veikimo potencialo formą (Kisnierienė ir kt., 2019).



### Elektrinių signalų registravimo eiga

Eksperimentas atliekamas kambario temperatūroje ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ), dienos metu, esant standartiniui apšvietimui ( $95 \pm 0,19 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Tarpubamblinė ląstelė yra paguldoma į registravimo kamerą, centrinė ląstelės dalis (plotis – 5mm) yra izoliuojama vazelinu, visos kameros dalys užpildomos APW tirpalu, centrinė kameros dalis perfuzuojama. Centrinėje kameros dalyje greta ląstelės tvirtinamas referentinis elektrodas, viduląstelinis elektrodas įvedamas į ląstelę. Po elektrodo įvedimo perfuzuojant kontroliniu tirpalu laukiama mažiausiai valandą. Nusistovėjus ramybės potencialui (RP) pradedama registravimų serija. Eksperimentai atlikti su 24 ląstelėmis, kurių ramybės potencialas po elektrodo įvedimo buvo neigiamesnis nei  $-175 \text{ mV}$ . Tokiais ramybės potencialais pasižymintiose ląstelėse, esančiose aktyvuotos protonų pompos būsenoje, būdinga, kai ląstelių aplinkos pH yra apie 7, o  $[\text{K}^+]$  išorėje yra apie  $0,1 \text{ mM}$ . Plazminės membranos protonų pompos aktyviai perneša protonus į užląstelinę erdvę, taip hiperpolarizuodamos membranos potencialą.

Po valandos, yra sužadunami 2 veikimo potencialai kas 5 min, kontrolinėmis sąlygomis. Praėjus valandai po kontrolinio ląstelės sužadavimo APW tirpale yra užpilamas verapamilio tirpalas (skirtingų eksperimentų metu užpilamos skirtingos verapamilio koncentracijos  $0,1 \text{ mM}$ ,  $0,3 \text{ mM}$ ,  $1 \text{ mM}$ ). Verapamilium buvo veikiami tik 5 mm ląstelės dalis esanti izoliuotoje centrinėje kameroje. Praėjus 30 min po ląstelės paveikimo verapamilium ląstelė yra sužadinama 2 kartus. Antras stimuliavimas vyksta po 100 min nuo ląstelės paveikimo verapamilium, ląstelė stimuliuojama 2 kartus (antras ląstelės stimuliavimas po verapamilio poveikio ne visada galimas atlikti, dėl stebimos ankstyvos ląstelių žūties, sukeltos didelės verapamilio koncentracijos). Sužadinus ląstelę po 100 min nuo poveikio verapamilium pradžios, verapamilis yra pašalinamas ir ląstelė grąžinama į kontrolinį APW tirpalą. Po 30 min nuo ląstelių grąžinimo į kontrolines sąlygas, ląstelės vėl sužadamos 2 kartus, siekiant įsitikinti ar poveikis verapamilium yra grįžtamas. Eksperimento schema pavaizduota 4 paveiksle. Kartais fiksuojamas spontaninių potencialų generavimas priklausomas nuo ląstelės individualių savybių ir verapamilio koncentracijos.



4 paveikslas. Elektrinių signalų registravimo schema

### Veikimo potencialo repoliarizacijos fazinių portretų sudarymas

Repoliarizacijos įvertinimui buvo skaičiuojamas maksimalus repoliarizacijos potencialo kitimo greitis  $dV/dt$ . Imami 90 sekundžių trukmės membranos potencialo vertės nuo veikimo potencialo smailės repoliarizacijos metu. Repoliarizacijos greičio priklausomybei nuo potencialo nustatyti buvo sudaromi faziniai portretai. 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.

### Statistinė analizė

Statistinė analizė atlikta naudojantis OriginPro 2018

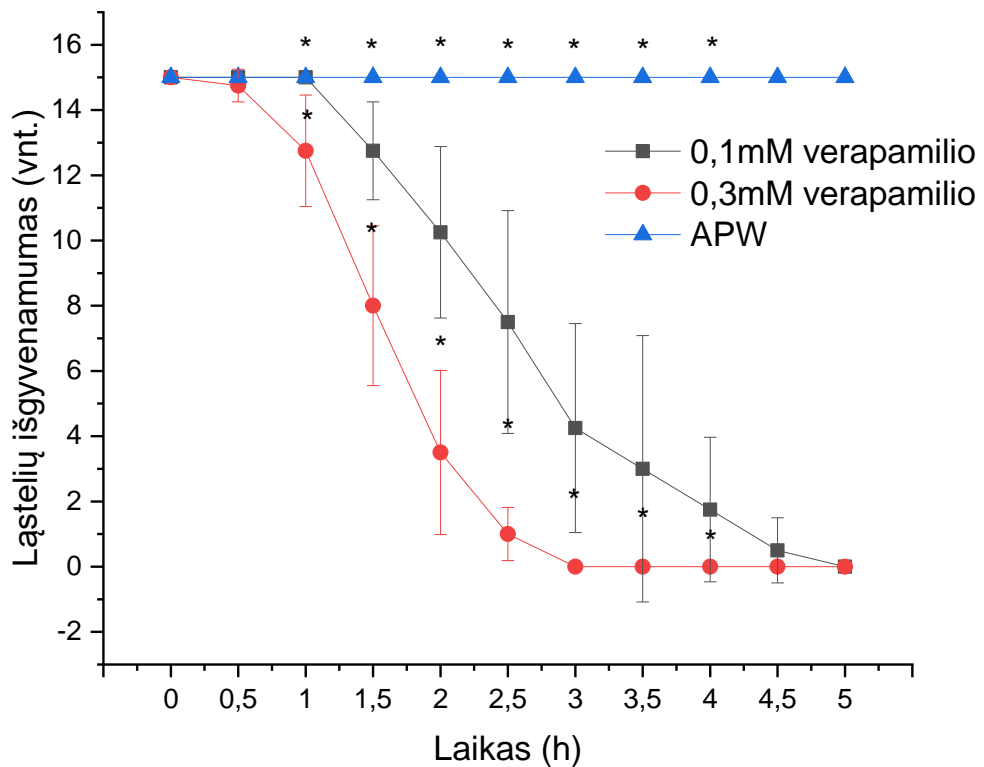
Ląstelių gyvybingumo tyrime statistinė analizė atlikta taikant Fisher tikslųjį testą

Citoplazmos judėjimo ir elektrofiziologiniuose tyrimuose – veikimo potencialo repoliarizacijos fazinių portretų tyrimuose duomenų normalumas tikrintas naudojant Shapiro-Wilk testą. Porinėms imtims analizuoti naudojamas Student T testas porinėms imtims, neporinėms – Student T testas nepriklausomoms imtims, atitikus duomenų normalųjį skirstinį. Neatitikus normaliojo skirstinio taikytas Mann-Whitney ir Wilcoxon kriterijai, priklausomai ar gauti duomenys buvo neporinės ar porinės imties

Pateikiami duomenų imčių vidurkiai  $\pm$  standartinis nuokrypis.

### III. REZULTATAI

#### Žvaigždėtojo maurašakio – *Nitellopsis obtusa* gyvybingumo priklausomybė nuo verapamilio koncentracijos

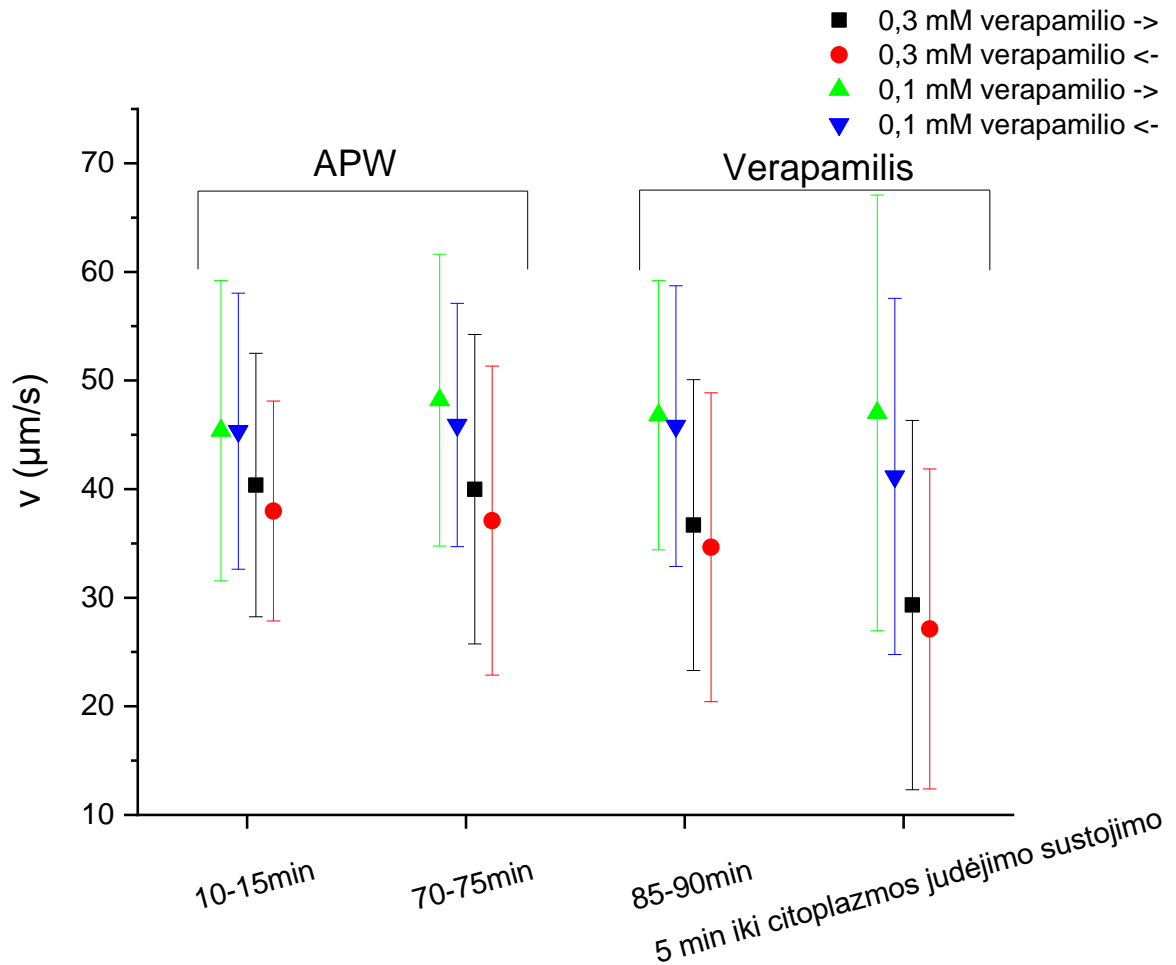


5 pav. *Nitellopsis obtusa* ląstelių gyvybingumo priklausomybė nuo verapamilio koncentracijos

*Nitellopsis obtusa* ląstelių gyvybingumas priklauso nuo verapamilio koncentracijos APW tirpale pavaizduotas 5 paveiksle. Atliktus ląstelių gyvybingumo testus (vieno eksperimento metu naudojama 15 ląstelių kiekvienai koncentracijai) ( $n=4$ ) gautas rezultatas parodė, jog esant didesnei verapamilio koncentracijai (0,3 mM), gyvų ląstelių procentinė dalis mažėja sparčiau, nei mažesnėje koncentracijoje (0,1 mM). Atlikus statistinę analizę, gautas reikšmingas skirtumas tarp skirtingų koncentracijų 1 – 4 valandų intervale. Taip pat lyginant su kontroliniais duomenimis (APW) tirpale, atlikus statistinę analizę gautas reikšmingas statistinis skirtumas veikiant 0,1 mM ir 0,3 mM verapamilio koncentracijos tirpalais. Sparčiausia ląstelių žūtis stebėta 1 – 3 valandų intervale. 0,3 mM tirpale, ląstelės žuvo po 3h nuo eksperimento pradžios, 0,1 mM tirpale ląstelės išgyveno iki 5 valandų, tam įtakos galėjo turėti ir ląstelės individualios fiziologinės savybės. Taip pat buvo atliktas pilotinis eksperimentas naudojant 1 mM verapamilio koncentracijos tirpalą, kuriame ląstelių žūtis buvo greita

– visos ląstelės žuvo po 1h (rezultatai nepateikiami) Gauti rezultatai atitinka atliktus tyrimus analizuojant vėžinių ląstelių gyvybingumo priklausomybę nuo verapamilio koncentracijos, didesnėse koncentracijose buvo stebimas mažėjantis vėžinių ląstelių gyvybingumas ir proliferacija, dėl ATP sintezės sutrikdymo mitochondrijose ir paskatintos autofagijos (Kania ir kt., 2017).

### Citoplazmos judėjimo greičio kaitos priklausomybė nuo verapamilio koncentracijos

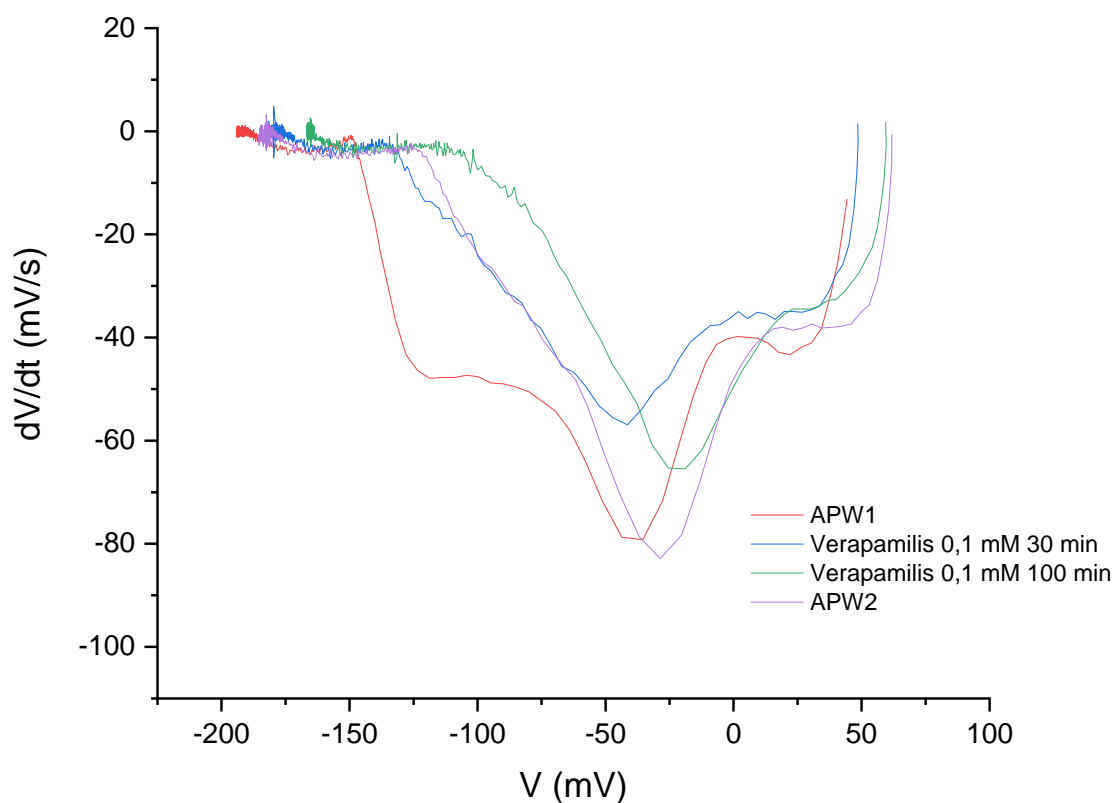


6 pav. Citoplazmos judėjimo greičio priklausomybė nuo verapamilio koncentracijos skirtingomis vezikulių judėjimo kryptimis

Citoplazmos judėjimo tyrimo rezultatai rodo, jog verapamilis nepaveikia citoplazmos judėjimo greičio, nes atlikus statistinę analizę, gautas citoplazmos judėjimo greičio skirtumas yra nereikšmingas intervale prieš paveikiant verapamiliumi, tiek po, nepriklausomai nuo verapamilio koncentracijos. Taip pat stebėtas citoplazmos judėjimas ląstelėje skirtingomis judėjimo kryptimis (skirtinguose aktino filamentų pluoštuose) atlikus statistinę analizę reikšmingo citoplazmos judėjimo greičio skirtumo neparodė. Gautos didelės duomenų paklaidos, dėl didelio duomenų išsibarstymo. Didelį rezultatų išsibarstymą galėjo lemti ląstelių biologinių savybių skirtumai – ATP kiekis ląstelėje,

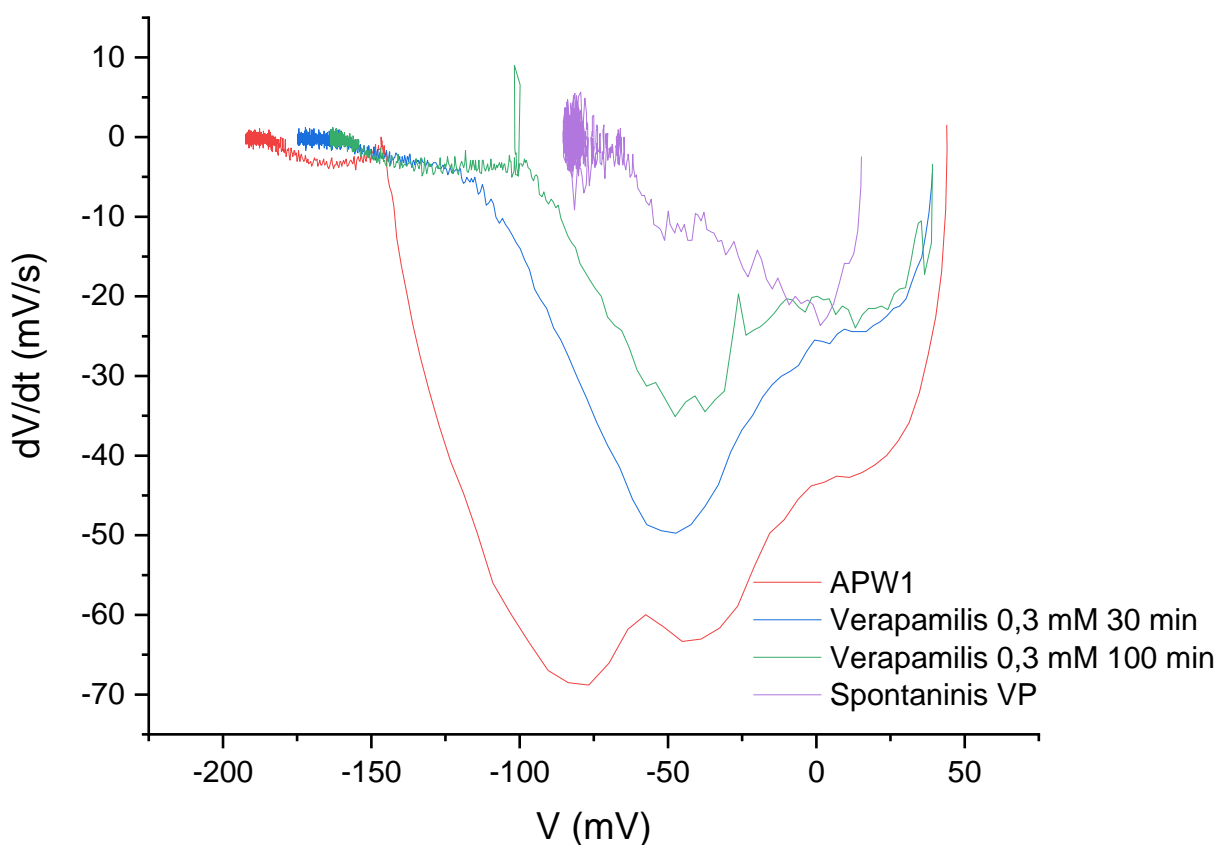
ir priklausomybė nuo metų laiko. Atsižvelgiant į grafikus pateiktus 6 paveiksle yra matoma tendencija nedidelio citoplazmos judėjimo greičio sumažėjimo, naudojant 0,3 mM verapamilio koncentracijos tirpalus, nes greitis prieš paveikiant verapamiliumi yra  $39,99 \pm 14,25 \mu\text{m/s}$  /  $37,10 \pm 14,23 \mu\text{m/s}$  (abejomis kryptimis) ir eksperimento pabaigoje, paveikus ląsteles verapamilio tirpalu citoplazmos judėjimo greitis buvo  $29,32 \pm 17,00 \mu\text{m/s}$  /  $27,12 \pm 14,74 \mu\text{m/s}$  (atitinkamai abejomis kryptimis). Visų eksperimentų pabaigoje buvo fiksuotas citoplazmos judėjimo sustojimas, tikėtina sąlygotas  $\text{Ca}^{2+}$  jonų koncentracijos padidėjimo citoplazmoje ir susijungimo su kalmodulino lengvosiomis grandinėmis esančiomis ant miozino kaklo. Stebėtas citoplazmos judėjimo sustodavo greičiau ir neatsistatydavo paveikus didesne verapamilio koncentracija. Verapamilio tirpalais (0,3 mM) (n=9) paveiktose ląstelėse citoplazmos judėjimas sustodavo 1 – 2 h intervale, nuo poveikio pradžios, kai 0,1 mM (n=10) koncentracijos tirpalais paveiktose ląstelėse citoplazmos judėjimas sustodavo 3 – 4 valandų intervale nuo poveikio verapamiliumi.

### Veikimo potencialo repoliarizacijos greičio pokytis paveikus žvaigždėtojo maurašakio ląsteles skirtingomis L- tipo kalcio kanalų blokatoriais - verapamilio koncentracijomis



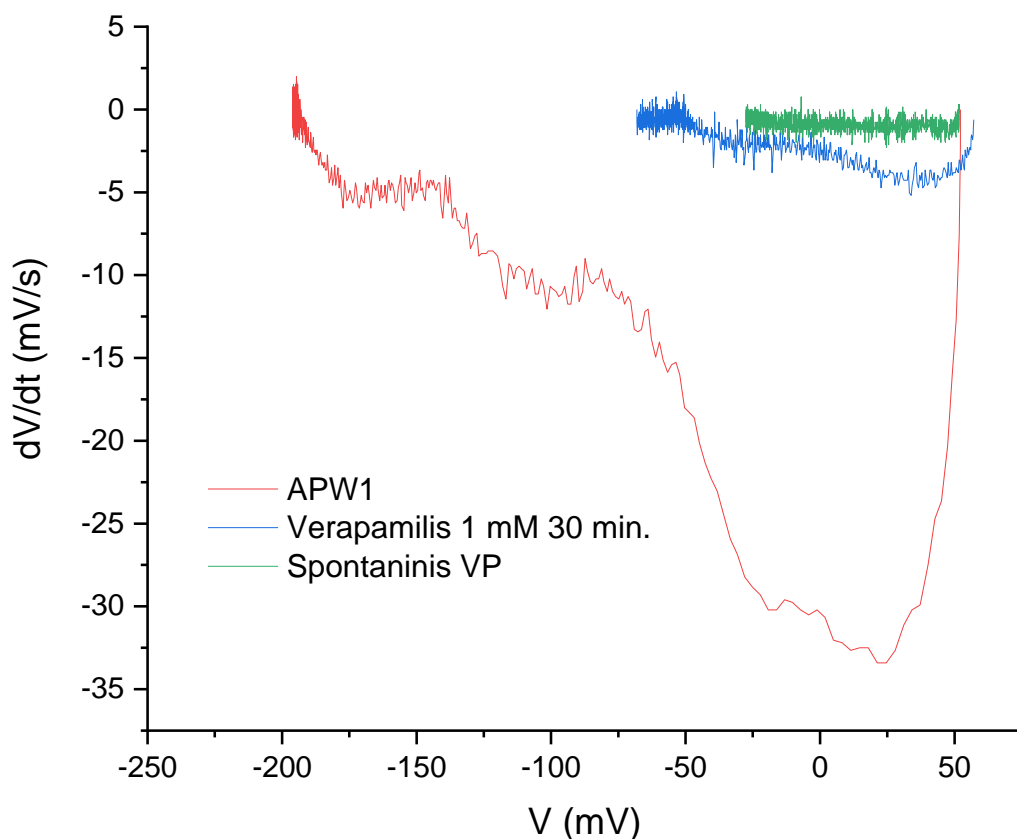
7 pav. Veikimo potencialo repoliarizacijos fazės pavyzdinis fazinis portretas paveikus *Nitellopsis obtusa* ląsteles 0,1 mM verapamilio koncentracijos tirpalu

Sudarius veikimo potencialo repoliarizacijos fazinį portretą ląstelių paveiktų 0,1 mM verapamilio koncentracijos tirpalu, galima pastebėti, jog fazinio portreto forma nesiskiria arba skiriasi nežymiai nuo kontrolinių sąlygų prieš paveikiant ląsteles verapamiliumi (APW1), tiek atlikus pakartotinį stimuliavimą (APW2) po poveikimo verapamiliumi, visos repoliarizacijos metu. Maksimalus veikimo potencialo greitis kontrolinėmis sąlygomis (APW1) vidutiniškai pasiekia  $-53,05 \pm 22,68$  mV/s. Dėl poveikio verapamiliumi repoliarizacijos greitis sumažėja vidutiniškai iki  $-44,50 \pm 17,67$  mV/s po 30 min nuo poveikio verapamiliumi pradžios ir šis skirtumas nėra statistiškai reikšmingas. Repoliarizacijos greitis po 100 min. nesiskyrė nuo repoliarizacijos greičio po 30 min, kas priklauso ir nuo ląstelės fiziologinių savybių



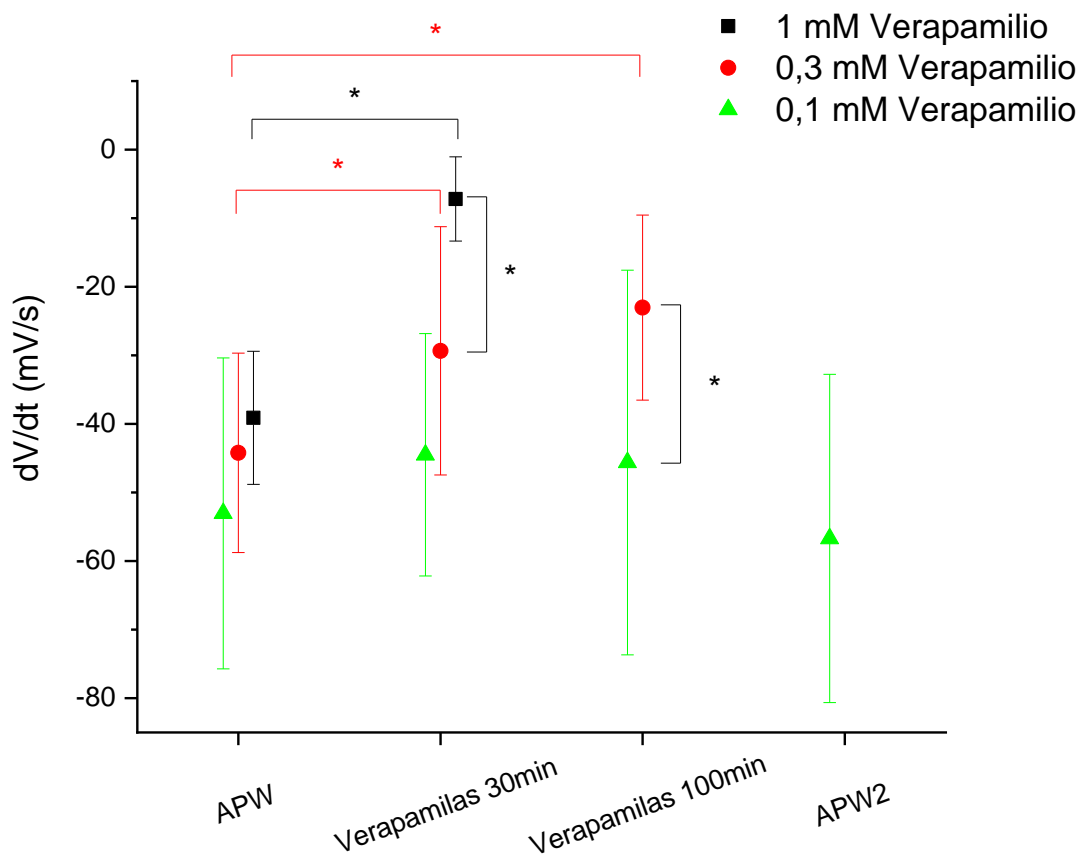
8 pav. Veikimo potencialo repoliarizacijos fazės fazinis portretas paveikus *Nitellopsis obtusa* ląsteles 0,3 mM koncentracijos verapamilio tirpalu

Veikimo potencialų repoliarizacijos faziniuose portretuose ląstelių, kurios buvo paveiktos 0,3 mM verapamilio tirpalu yra stebimas didelis greičio mažėjimas tarp kontrolinių sąlygų (APW1) – vidutiniškai maksimalus greitis yra  $-44,22 \pm 14,55$  mV/s, ir poveikio verapamilium po 30 min – kai vidutiniškai greitis yra  $-29,34 \pm 18,11$  mV/s, kas yra statistiškai reikšmingas pokytis. Nėra matomo ženklaus repoliarizacijos greičio pokyčio tarp poveikio verapamilium po 30 min ir 100 min nuo eksperimento pradžios. Pateiktame grafike nėra pateikiamas pakartotinis stimuliavimas ląstelių po poveikio verapamilium kontroliniame APW tirpale, dėl dažnos ląstelių žūtis arba dėl savaiminių/spontaninių veikimo potencialų generavimo, kurių repoliarizacijos greitis yra žymiai mažesnis lyginant su repoliarizacijos greičiu kontrolinėmis (APW1) sąlygomis eksperimento pradžioje. Taip pat stebimas veikimo potencialo repoliarizacijos fazinio portreto formos pokytis lyginant kontrolinių veikimo potencialų repoliarizacijos fazinius portretus su faziniais portretais kai ląstelės yra paveikiamos 0,3 mM verapamilio tirpalu.



9 pav. Veikimo potencialo repoliarizacijos fazės fazinis portretas paveikus *Nitellopsis obtusa* ląsteles 1 mM verapamilio koncentracijos tirpalu

Analizuojant veikimo potencialo repoliarizacijos fazinius portretus ląstelėse paveiktose 1 mM verapamilio tirpalu matomas didelis repoliarizacijos greičio pokytis visos repoliarizacijos metu. Lyginant maksimalius repoliarizacijos greičius kontrolinėmis sąlygomis (vidutinis maksimalus repoliarizacijose greitis  $-39,11 \pm 9,70$  mV/s), su repoliarizacijos greičiais po 30 min paveikus verapamiliumi, kai vidutinis maksimalus repoliarizacijos greitis yra  $-7,19 \pm 6,15$  mV/s, stebimas 5,5 karto sulėtėjimas. Lyginant repoliarizacijos fazinius portretus kontrolinėmis (APW1) sąlygomis ir paveikus verapamiliumi 30 min, fazinių portretų formos nėra tapačios. Taip pat nėra pateikiama pakartotinių duomenų su ląstelėmis po 100 min. nuo poveikio verapamiliumi pradžios, nes atlikus pirmą ląstelės stimuliavimą po 30 min. greitu metu, ląstelės pačios sugeneruodavo savaiminius/spontaninius potencialus ir galiausiai žūdavo. Tai parodė jog didėjanti verapamilio koncentracija veikia ląsteles toksiškai sutrikdydamas jonų pernašos sistemas ir sukeldamas greitą ląstelių žūtį.



10 pav. Veikimo potencialų repoliarizacijos fazės fazinių portretų maksimalūs greičiai skirtingu veikimo potencialo sužadinimo metu, paveikus skirtingomis verapamilio koncentracijomis (0,1 mM, 0,3 mM, 1 mM).

Atlikus veikimo potencialų repoliarizacijos greičio pokyčio nuo verapamilio repoliarizacijos fazinių portretų statistinę analizę, nustatytas repoliarizacijos greičio mažėjimas



priklausomai nuo verapamilio koncentracijos.. Gautuose rezultatuose su 0,1 mM (n=6) verapamilio tirpalu, tarp kontrolinių sąlygų  $-53,05 \pm 22,68$  mV/s ir poveikio verapamilium po 30 min  $-44,50 \pm 17,67$  mV/s maksimalių repoliarizacijos greičio verčių, atlikus statistinę analizę nėra gaunamas statistiškai reikšmingas greičių skirtumas. Atitinkamas rezultatas yra gaunamas ir lyginant verapamilio poveikį skirtingais laiko intervalais po 30 min  $-44,50 \pm 17,67$  mV/s ir 100 min.  $-45,62 \pm 28,05$  mV/s repoliarizacijos greičio maksimalioms vertėms. Verapamilio tirpalą po 100 min.  $-45,62 \pm 28,05$  mV/s pakeitus į APW tirpalą  $-56,71 \pm 23,94$  mV/s nėra gaunamas statistiškai patikimas skirtumas 0,3 mM (n=11) koncentracijos tirpalu paveiktose ląstelėse tarp kontrolinių sąlygų  $-44,22 \pm 14,55$  mV/s ir poveikio verapamilium po 30 min  $-29,34 \pm 18,11$  mV/s repoliarizacijos maksimalių verčių atlikus statistinę analizę gaunamas reikšmingas skirtumas. Galima daryti prielaidą, kad verapamilis užblokuodamas plazminėje membranoje ar vakuolėje esančias  $Ca^{2+}$  jonų pernašos sistemas, neleidžia jonams pasišalinti iš citoplazmos į viduląstelines  $Ca^{2+}$  saugyklas dėl to repoliarizacijos fazė lėtėja, taip pat tikėtinas ir  $K^{+}$  jonų pernašos sistemų blokavimas (Schneider ir kt., 2005). Reikšmingas statistinis skirtumas nebuvo gautas tarp skirtingų laiko intervalų paveikus verapamilium po 30 min  $-29,34 \pm 18,11$  mV/s ir 100 min.  $-23,04 \pm 13,49$  mV/s repoliarizacijos greičio maksimalių verčių. Atlikus statistinę analizę ir palyginus repoliarizacijos greičių pokyčius paveikus ląsteles skirtingomis verapamilio koncentracijomis (0,1 mM ir 0,3 mM) po 100 min. yra gaunamas statistiškai reikšmingas skirtumas, kas parodo, jog didėjant verapamilio koncentracijai repoliarizacijos greitis lėtėja. Ląstelėse paveiktose 1 mM (n=7) verapamilio tirpalu ir atlikus gautų duomenų statistinę analizę (lyginant kontrolinius duomenis  $-39,11 \pm 9,70$  mV/s su verapamilio poveikiu po 30 min  $-7,19 \pm 6,15$  mV/s (repoliarizacijos greičio maksimalias vertes) gaunamas statistiškai reikšmingas skirtumas. Didėjant verapamilio koncentracijai didėja užblokuotų jonų pernašos sistemų skaičius ir jonai negali grįžti į viduląstelines saugyklas po patirto sužadinimo, kaip pavyzdys galėtų būti  $Ca^{2+}$ - ATPazės, kurios tyrimų metu su verapamilium (0,5 mM) buvo užblokuotos 75 procentus (Lotersztajn ir kt., 1982). Atlikus lyginamąją analizę gautų rezultatų su 0,3 mM ir 1 mM verapamilio koncentracijų tirpalais po 30 min, gaunamas statistiškai reikšmingas skirtumas įrodantis, jog didėjanti verapamilio koncentracija lemia didėjantį poveikį repoliarizacijos greičiui. Spontaninių veikimo potencialų greitis siekia apie -1 mV/s. Duomenys su 1 mM verapamilio koncentracijos tirpalu po 100 min nepateikiami, dėl greitos ląstelių žūties, nulemtos aukštos verapamilio koncentracijos (visos ląstelės žūdavo).

## REZULTATŲ APTARIMAS

Atlikti eksperimentai parodė verapamilio toksiškumą žvaigždėtojo maurašakio ląstelėms. Didėjanti koncentracija lėmė spartėjančią ląstelių žūtį sukeltą ne tik sutrikdytų nuo kalcio jonų pernašos sistemų priklausomų procesų ir tikėtina kalio jonų pernašos sistemų sutrikdymo (Tfelt-Hansen ir kt., 2009) bet ir poveikio kitiems svarbiems gyvybiniais procesams. Panašūs ląstelių gyvybingumo tyrimai atlikti naudojant skirtingas verapamilio koncentracijas, buvo atlikti su įvairaus tipo vėžinėmis ląstelėmis, kurių gyvybingumas ir proliferacija mažėjo priklausomai nuo didėjančios verapamilio koncentracijos, (Kania ir kt., 2017) tačiau lyginant su pateiktu tyrimu atliktame tyrime stebimas spartus ląstelių gyvybingumo mažėjimas kelių valandų intervale, kai eksperimentiškai vėžinių ląstelių gyvybingumas reikšmingai sumažėjo po 12-48h priklausomai nuo vėžinio naviko susidarymo vietos. Ląstelių gyvybingumas yra stebėtas eksperimentiškai su žievinių neuronų kultūromis, kurios buvo veikiamos skirtingomis verapamilio koncentracijomis ir ląstelių gyvybingumas sumažėjo asinchroniškai 72h bėgyje stebint neuronų mitochondrijų aktyvumą, gyvybingumas mažėjo didinant verapamilio koncentracijas iki 1 mM (Zhu ir kt., 1997). Tyrimuose stebint eritrocitų gyvybingumo pokyčius nuo skirtingų verapamilio koncentracijų yra stebimi ląstelių morfologiniai pokyčiai eritrocitus paveikus 0,5 mM verapamilio tirpalo, o greiti lizės procesai stebimi ląsteles paveikus 5 mM verapamilio tirpalu (Suwalsky ir kt., 2010). Tame pačiame tyrime yra aptariamas ir žmogaus neuroblastomų SH-SY5Y išgyvenamumas paveikus skirtingomis verapamilio koncentracijomis, kuriame yra parodoma, jog šio tipo ląstelėms toksiškas 0,5 mM verapamilio poveikis pasireiškia jau po 1h nuo poveikio pradžios, kai 0,1 mM toksiškas efektas yra stebimas praėjus 48h nuo eksperimento pradžios (Suwalsky ir kt., 2010). Atliktame eksperimente su *Chara corallina* ląstelėmis (viena iš menturdumblių rūšių) paveikus verapamilio 0,05 mM koncentracijos tirpalu po 30 minučių sukėlė greitą ląstelių žūtį (Reid ir kt., 1992). Yra stebimas ir priešingas verapamilio veikimas stabdantis nekrozių susidarymą ir plitimą miokarde (nekrozės sukeltos eksperimentiškai) (Nayler ir kt., 1980). Verapamilis skatino ir žmogaus lęšio epitelinių ląstelių išgyvenamumą, kurios buvo veikiamos vandenilio peroksido tirpalais, apsaugodamas ląstelių branduolius nuo morfologinių pokyčių ir kaspazių susidarymo (Wang ir kt., 2014). Atliktuose tyrimuose su eukaliptų (*Eucalyptus perriniana*) ir dažinio dygminio (*Carthamus tinctorius*), kuriuose buvo stebimas kalcio veikimas reakcijoje į hidrodinaminį stresą ir naudojamas, kalcio jonų kanalų blokatorius verapamilis parodė atidėtą sumažėjimą NAD(P)H, kuris svarbus ląstelinio kvėpavimo metu gauti energijai, nuo energijos priklausomoms reakcijoms vykdyti. (Takeda ir kt., 1998)

Citoplazmos judėjimo analizė parodė pirminį verapamilio toksinį efektą, sustabdant miozino judėjimą aktino filamentais, kas sietina su verapamilio poveikiu, aktino filamentų

pažeidimui, iliustruojamu citoplazmos judėjimo sustojimu. Aktino filamentų suardymą gali pagrįsti eksperimentiniai tyrimai su žmogaus odoje esančiais fibroblastais, kuriuose buvo parodyta, kad paveikus 0,5 mM verapamilio tirpalu aktino filamentai buvo dalinai suardyti (Boggio ir kt., 2011), tačiau verapamilis nepaveikė kitų citoskeleto elementų, kaip mikrovamzdelių. Citoplazmos sustojimas yra sietinas ir su kalcio jonų koncentracijos padidėjimu ląstelės citoplazmoje, dėl veikimo potencialų generavimo. Tyrimuose su *Chara corallina* ląstelėmis verapamilis nepaveikė kalcio jonų pernašos sistemų, kas lėmė padidėjusią koncentraciją viduląstelinio kalcio jonų. (Reid ir kt., 1992). Eksperimentiškai yra įrodyta, jog kalcio jonai yra būtini veikimo potencialo generavimui. Kalcio jonų nebuvimas arba nepakankama kalcio jonų koncentracija ląstelės išorėje po elektrinės ląstelių stimuliacijos nesukėlė citoplazmos judėjimo sustojimo, (Ayling ir kt., 1994) kuri būtų galima traktuoti, kaip vizualinį veikimo potencialų generavimo įrodymą augalinėse ląstelėse, nematuojuant elektrofiziologinių parametrų. Tyrimuose su *Chara corallina* ląstelėmis, buvo parodyta, kad 0,1 mM koncentracijos verapamilio tirpalas nesustabdė citoplazmos judėjimo, ir taip pat buvo keliamas klausimas ar kalmodulinas dalyvauja citoplazmos judėjime ar ne (Tsutsui ir kt., 1987). Šio magistrinio darbo metu atliktuose eksperimentuose buvo parodyta, kad 0,1 mM ir 0,3 Mm verapamilio sukelia citoplazmos judėjimo sustojimą. Panašūs duomenys yra gauti tyrimuose pomidorų (*Lycopersicon esculenturn*) ir rapsų (*Brassica napus*) šakniaplaukiuose, kurie buvo veikti 1 mM verapamilio koncentracijos tirpalu. Ši koncentracija sukėlė citoplazmos judėjimo sulėtėjimą ir sustojimą po 3-4 min. ir vėlesnį atsistatymą (judėjimas atsistatydavo dėl trumpalaikio šakniaplaukių veikimo verapamiliumi, kai ant šakniaplaukių yra užlašinamas 1 lašas verapamilio tirpalo), tačiau jeigu veikimas yra nuolatinis citoplazmos judėjimas buvo sustabdomas negrįžtamai jau dėl 0,1 mM verapamilio koncentracijos (Clarkson ir kt., 1988).

Dauguma eksperimentų šiame darbe buvo atliekami nenaudojant 1 mM verapamilio koncentracijos dėl staigaus toksiško efekto ląstelėms, nors tyrimuose su žmogaus odos fibroblastais toksiška koncentracija yra jau 0,1 mM, sukianti ląstelių žūtį (Boggio ir kt., 2011). Ši koncentracija nesukelia akivaizdžių pokyčių žvaigždėtojo maurašakio ląstelėse bei greitos ląstelių žūties. Ląstelės žūva po 4-5h.

Analizuojant verapamilio poveikį veikimo potencialo repoliarizacijai gauti rezultatai rodo repoliarizacijos greičio mažėjimą. Tyrimuose, kuriuose buvo analizuotas verapamilio poveikis gyvūninio tipo ląstelėms pateikiami priešingi rezultatai širdies miocituose, nors ir stebimas veikimo potencialų trukmės ilgėjimas, tačiau jis nėra siejamas su pokyčiais repoliarizacijos metu (Vicente ir kt., 2015). Yra ir priešingų tyrimų rezultatų anksčiau minėtiems tyrimams, kuriuose teigiama, jog verapamilis neilgina veikimo potencialo trukmės žmogaus širdies miocituose (Orvos ir kt., 2019)

širdies Purkinje skaidulose (Amerini ir kt., 1985) atitinkami rezultatai yra ir tyrimuose su jūrų kiaulyčių miocitais (Chen ir kt., 1979). Yra pateikiama ir prieštaringų rezultatų, kuriuose 1 mM verapamilio tirpalas ilgino repoliarizacijos fazę mažindamas jos greitį, kai 5 mM verapamilio koncentracijos tirpale buvę izoliuoti miocitai parodė veikimo potencialo trukmės mažėjimą, dėl greitesnės repoliarizacijos (Zhang ir kt., 1997). Repoliarizacijos greičio didėjimas yra nustatytas ir taikant mažas verapamilio koncentracijas ( $3 \cdot 10^{-6}$  M) jūrų kiaulyčių izoliuotose miokardo ląstelėse (Noguchi ir kt., 1997). Tyrimuose kuriuose buvo analizuojamos stimulo sukeltos membranos potencialo osciliacijos žiotelių varstomosiose ląstelėse yra nustatyta, jog verapamilis mažina membranos potencialo osciliacijų amplitudes ir keičia osciliacijų formą iš asimetriškos į simetrišką kai verapamilio koncentracija yra 0,01 – 0,1 mM (McAinsh ir kt., 1995). Remiantis pateikiamais duomenimis apie verapamilio poveikį veikimo potencialams ir stebint jų nevienareikšmiškumą, galima spręsti, jog trūksta eksperimentinių tyrimų su skirtingomis verapamilio koncentracijomis veikiant gyvūnines ir augalines ląsteles, norint gauti apibendrintus rezultatus.

Apibendrinant visų trijų tyrimų duomenis, galima teigti, jog norint taikyti augalines sistemas, kaip atitinkamus modelius, būtina atlikti didesnės imties tyrimus analizuojant ir ląstelių biochemines savybes, norint suprasti verapamilio blokavimo mechanizmą augalinėse sistemose ir taip sutrikdant nuo kalcio priklausomus procesus. Taip pat būtina atsižvelgti į verapamilio toksinį efektą augalinėms ląstelėms nustatant slenkstines koncentracijų ribas.

## IŠVADOS

1 – Verapamilio toksiškas poveikis tiesiogiai priklauso nuo verapamilio koncentracijos, koncentracijai didėjant sukeliama greitesnė ląstelių žūtis.

2 – Ląstelėse paveiktose verapamiliumi citoplazmos judėjimo greitis nekinta, tačiau galiausiai stebimas staigus ir negrįžtamas citoplazmos judėjimo sustojimas, kuris yra pirminis ląstelės žūties indikatorius.

3 – Verapamilis blokuodamas žvaigždėtojo maurašakio (*Nitellopsis obtusa*) membranose esančias jonų pernašos sistemas sąlygoja nuo blokatoriaus koncentracijos priklausomą repoliarizacijos greičio mažėjimą, didėjant verapamilio koncentracijai repoliarizacijos greitis mažėja

## SANTRAUKA

Neurobiologijos nuolatinių studijų baigiamojo darbo tema – Klasikinio L-tipo kalcio kanalų blokatoriaus verapamilio poveikis žvaigždėtojo maurašakio (*Nitellopsis obtusa*) ląstelėms. Darbą parengė – Julius Kavaliauskas. Darbo vadovė – doc. dr. Vilma Kisnierienė. Konsultantas – doktr. Vilmantas Pupkis

Augalinės sistemos iki šiol yra ganėtinai mažai ištirtos ir daugeliu aspektų palieka nemažą dalį nežinomųjų. Remiantis evoliucijos teorija augalinės ir gyvūninės sistemos turi bendrą protėvį, kas leidžia daryti prielaidas apie molekulinį ir elektrofiziologinių savybių panašumus. Tai leidžia atlikti tyrimus su gyvūninėse sistemose naudojamomis medžiagomis, žinant jų veikimo principus taikyti augalinėse sistemose ir stebėti atsirandančius pokyčius. Šiame tyrime buvo pasirinktas jau daugiau nei 50 metų naudojamas klasikinis L-tipo kalcio kanalų blokatorius verapamilis. Darbe buvo tirti verapamilio sukeliami pokyčiai žvaigždėtojo maurašakio (*Nitellopsis obtusa*) ląstelėse sietini su kalcio jonais ir jų pernašos sistemų veikimu vertinant ląstelės gyvybingumą, citoplazmos judėjimą ir membranos potencialo repoliarizacijos pokyčius. Gauti tyrimo rezultatai daugeliu atvejų koreliuoja su pateikiamais literatūros šaltiniuose. Verapamilis toksiškai paveikė ląsteles sukeldamas jų žūtį po 3-5 h nuo poveikio pradžios, tačiau tai nesukėlė pokyčių citoplazmos judėjime, bet tai sąlygoja citoplazmos judėjimo sustojimą 2 h laikotarpyje, kas galėtų būti ląstelės žūties indikatoriumi. Verapamilis sulėtino repoliarizaciją veikimo potencialo metu, kas patvirtino idėją, jog verapamilis augalinėse sistemose gali veikti kaip nespecifinis jonų kanalų blokatorius, blokuojantis ne tik kalcio, bet ir kalio jonų pernašos sistemas.

## **SUMMARY**

The topic of the master thesis of neurobiology study program - Effect of classical L-type calcium channel blocker verapamil on starry stonewort (*Nitellopsis obtusa*) cells. The work was prepared by Julius Kavaliauskas. Supervisor – assist. prof. V. Kisnierienė PhD. Consultant – PhD student Vilmantas Pupkis

Plant systems are still relatively unexplored and in many respects a significant part remains unknown. According to the theory of evolution, plant and animal systems have a common ancestor, which makes it possible to assume their molecular and electrophysiological similarities. This justifies studies to be performed with chemical substances commonly used in animals, and the application of knowledge of their working principles in plant systems. Verapamil, a classic L-type calcium channel blocker, known for more than 50 years has been selected for this study. The effects of verapamil on starry stonewort (*Nitellopsis obtusa*) cells related to calcium ions and the function of their transport systems: cell viability, cytoplasmic streaming and changes in membrane potential repolarization were investigated. Research results in most cases correlate with the literature sources provided. Toxic effect of verapamil to cells caused their death 3-5 h after application, but this did not result in changes in cytoplasmic streaming, but did result in stopping of cytoplasmic streaming in 2 h, which could be indicators of cell death. Verapamil slowed repolarization of action potential, which confirmed the hypothesis that verapamil may act as a non-specific ion channel blocker in plant systems, blocking not only calcium but also potassium ion transport systems.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Ayling, S. M., Brownlee, C., & Clarkson, D. T. (1994). *The Cytoplasmic Streaming Response of Tomato Root Hairs to Auxin; Observations of Cytosolic Calcium Levels. Journal of Plant Physiology*, 143(2), 184–188.
- Al Khazaaly, S., and Beilby, M. J. (2007). *Modeling ion transporters at the time of hypertonic regulation Lamprothamnium succinctum (Characeae, Charophyceae). Charophytes 1*, 28–47
- Aleksandrov, A.A., Aleksandrova, L.A., Berestovsky, G.G., (1990). Block of Ca<sup>2+</sup>-channel from alga cells reconstituted in planar lipid bilayers by verapamil. *Studia Biophysica*, 138, 127-130
- Alexandra, J., Lassalles, J. P., & Kado, R. T. (1990). Opening of Ca<sup>2+</sup> channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *Nature*, 343(6258), 567-570.
- Alexandre, J., & Lassalles, J. P. (1992). Intracellular Ca<sup>2+</sup> release by Ins P<sub>3</sub> in plants and effect of buffers on Ca<sup>2+</sup> diffusion. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 338(1283), 53-61.
- Allen, R. D., & Allen, N. S. (1978). Cytoplasmic streaming in amoeboid movement. *Annual review of biophysics and bioengineering*, 7(1), 469-495.
- Amerini, S., Giotti, A., & Mugelli, A. (1985). Effect of verapamil and diltiazem on calcium-dependent electrical activity in cardiac Purkinje fibres. *British journal of pharmacology*, 85(1), 89-96.
- Amodeo G, Escobar A, Zeiger E. 1994. A cationic channel in the guard cell tonoplast of *Allium cepa*. *Plant Physiology* 105, 999–1006
- Andjus. R.P.,(1998). Harvesting the biophysical field of the „green axon“, *Physiol.Pharmacol.Acta.*, 34, 1-9
- Andrejauskas, E., Hertel, R., & Marme, D. (1985). Specific binding of the calcium antagonist [3H] verapamil to membrane fractions from plants. *Journal of Biological Chemistry*, 260(9), 5411-5414.



- Auderset Joye, D., and A. Schwarzer. (2012). *Liste rouge Characées. Espèces menacées en Suisse, état 2010* [Red List of Characeae. Threatened Species in Switzerland, State 2010]. Berne: Office fédéral de l'Environnement
- Awata, J. Y., Kashiya, T., Ito, K., and Yamamoto, K. (2003). Some motile properties of fast characean myosin. *J. Mol. Biol.* 326, 659–663.
- Bean, B.P. The action potential in mammalian central neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007,8, 451–465
- Becchetti A, De Fusco M, Crociani O, (2002) The functional properties of the human *ether-a-go-go*-like (HELK2) K<sup>+</sup> channel. *Eur J Neurosci.* ;16:415-428.
- Beilby, M. J. (2007). Action potential in charophytes. *International review of cytology*, 257, 43-82.
- Beilby, M. J., & Casanova, M. T. (2014). *The physiology of characean cells* (Vol. 1). Berlin: Springer.
- Bharathan, S. 1987. Bulbils of some charophytes. *Proceedings: Plant Sciences* 97: 257–263
- Bibikova, T. N., Blancaflor, E. B., & Gilroy, S. (1999). Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 17(6), 657-665.
- Bisson, M. A., and Kirst, G. (1980). *Lamprothamnium*, a euryhaline charophyte I. Osmotic relations and membrane potential at steady state. *J. Exp. Bot.* 31, 1223–1235.
- Boggio, R. F., Freitas, V. M., Cassiola, F. M., Urabayashi, M., & Machado-Santelli, G. M. (2011). Effect of a calcium-channel blocker (verapamil) on the morphology, cytoskeleton and collagenase activity of human skin fibroblasts. *Burns*, 37(4), 616-625.
- Boissezon, A., Auderset Joye, D., & Garcia, T. (2018). Temporal and spatial changes in population structure of the freshwater macroalga *Nitellopsis obtusa* (Desv.) J. Groves. *Botany Letters*, 165(1), 103-114.
- Boot KJM, Libbenga KR, Hille SC, Offringa R, van Duijn B (2012) Polar auxin transport: an early invention. *J Exp Bot* 63:4213–4218
- Bulychev, A.A. and Kamzolkina, N.A., Effect of Action Potential on Photosynthesis and Spatially Distributed H<sup>+</sup> Fluxes in Cells and Chloroplasts of *Chara corallina*, *Russ. J. Plant Physiol.*, 2006, vol. 53, pp. 1–9
- Burdon-Sanderson J. (1873) Note on the electrical phenomena which accompany irritation of the leaf of *Dionaea muscipula*. *Proc R Soc Lond*; 21, 495–6

- Bush, D. S. (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annual review of plant biology*, 46(1), 95-122.
- Campbell, K. P., Leung, A. T., & Sharp, A. H. (1988). The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Trends in neurosciences*, 11(10), 425-430.
- Chen, C.M. and Gettes, L.S. (1979). Effects of verapamil on rapid Na channel-dependent action potentials of K<sup>+</sup>-depolarized ventricular fibers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 209(3), 415-21
- Cheney, R.E., CShea, M.K., Heuser, J.E., Coelho, M.V., Wolenski, J.S., Espreafico, E.M., Forscher, P., Larson, RE., and Mooseker, M.S. (1993) Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* 75,13-23
- Clarkson, D. T., Brownlee, C., Aylings, S. M., (1988). Cytoplasmic calcium measurements in intact higher plant cells: results from fluorescence ratio imaging of fura-2. *Journal of Cell Science*, 91(1), 71-80.
- Cole, L., Orlovich, D. A., & Ashford, A. E. (1998). Structure, function, and motility of vacuoles in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 24(1-2), 86-100.
- Conrad, P. A., & Hepler, P. K. (1988). The effect of 1, 4-dihydropyridines on the initiation and development of gametophore buds in the moss *Funaria*. *Plant Physiology*, 86(3), 684-687.
- Corti, B. (1774). *Osservazioni microscopiche sulla Tremella: e sulla circolazione del fluido in una pianta acquajuola*. Apresso G. Rocchi.
- Cuin TA, Betts SA, Chalmandrier R, Shabala S (2008) A root's ability to retain K<sup>+</sup> correlates with salt tolerance in wheat. *J Exp Bot* 59:2697–2706
- Cuin, T. A., Dreyer, I., & Michard, E. (2018). The role of potassium channels in *Arabidopsis thaliana* long distance electrical signalling: AKT2 modulates tissue excitability while GORK shapes action potentials. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 926.
- Demidchik V., Shabala, S., (2018). Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: the role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated 'ROS-Ca<sup>2+</sup> Hub'. *Funct Plant Biol.* 45, 9-27.
- Derlet RW, Horowitz BZ. (1995). Cardiotoxic drugs. *Emerg. Med. Clin. NorthAm.* 13: 771–791

- Dobrovinskaya OR, Muniz J, Pottosin II. 1999a. Asymmetric block of the plant vacuolar Ca<sup>2+</sup>-permeable channel by organic cations. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 28, 552–563.
- Dreyer, I., & Uozumi, N. (2011). Potassium channels in plant cells. *The FEBS Journal*, 278(22), 4293-4303.
- Favre, P., Degli Agosti, R., 2007. Voltage-dependent action potentials in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 131, 263-272.
- Fensom D.S. (1963) The bioelectric potentials of plants and their functional significance. V. Some daily and seasonal changes in the electrical potential and resistance of living trees. *Canadian Journal of Botany* 41, 831–851.
- Foissner I, Wasteneys GO. (2000) Microtubule disassembly enhances reversible cytochalasin-dependent disruption of actin bundles in characean internodes. *Protoplasma* 214, 33–44.
- Freeze BS, McNulty MM, Hanck DA. (2006) State-dependent verapamil block of the cloned human Ca<sub>v</sub>3.1 T-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Mol Pharmacol.* ;70:718-726.
- Fritsch FE (1948) *The structure and reproduction of the algae*, vol 1. Cambridge University Press, Cambridge
- Fromm, J., & Lautner, S. (2007). Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, cell & environment*, 30(3), 249-257.
- Fromm, J., Bauer, T., (1994) Action potentials in maize sieve tubes change phloem 1341 translocation. *J. Exp.Bot.* 45, 463-469.
- Fromm, J., Eschrich W.,(1988) Transport processes in stimulated and non-stimulated leaves of *Mimosa pudica*. III: Displacement of ions during seismonastic leaf movements, 2, 65-72
- Fromm, J., Eschrich, W., (1993). Electric Signals Released from Roots of Willow (*Salix 1343 viminalis* L.) Change Transpiration and Photosynthesis. *J. Plant Physiol.* 141, 673–680.
- .
- Fromm, J., Fei, H., (1998). Electrical signaling and gas exchange in maize plants of drying 1346 soil. *Plant Sci.* 132, 203-213.

- Gelli, A., & Blumwald, E. (1993). Calcium retrieval from vacuolar pools (Characterization of a vacuolar calcium channel). *Plant physiology*, 102(4), 1139-1146.
- Gelli, A., Higgins, V. J., & Blumwald, E. (1997). Activation of plant plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiology*, 113(1), 269-279.
- Goldstein, R. E., Tuval, I., & van de Meent, J. W. (2008). Microfluidics of cytoplasmic streaming and its implications for intracellular transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), 3663-3667.
- Grabov, A., & Blatt, M. R. (1998). Membrane voltage initiates Ca<sup>2+</sup> waves and potentiates Ca<sup>2+</sup> increases with abscisic acid in stomatal guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4778-4783.
- Graziana, A., Fosset, M., Ranjeva, R., Hetherington, A. M., & Lazdunski, M. (1988). Calcium channel inhibitors that bind to plant cell membranes block calcium entry into protoplasts. *Biochemistry*, 27(2), 764-768.
- Hayama T, Nagai R, (1979) Ultrastructure of the endoplasmic factor responsible for cytoplasmic streaming in Chara internodal cells. *J Cell Sci* 36:121–136
- Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, eds. *Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th edn. New York, NY: McGraw-Hill; 1996.
- Hedrich R, Barbier-Brygoo H, Felle H, et al. (1988). General mechanisms for solute transport across the tonoplast of plant vacuoles: a patch-clamp survey of ion channels and proton pumps. *Botanica Acta* 101, 7–13
- Hedrich R. & Becker D. (1994) Green circuits - the potential of plant specific ion channels. *Plant Molecular Biology* 26, 1637– 1650.
- Higashi-Fujime S. (1980). Active movement in vitro of bundles of microfilaments isolated from Nitella cell. *J Cell Biol* 87:569– 578
- Higashi-Fujime, S., Ishikawa, R., Iwasawa, H., Kagami, O., Kurimoto, E., Kohama, K., & Hozumi, T. (1995). The fastest-actin-based motor protein from the green algae, Chara, and its distinct mode of interaction with actin. *FEBS letters*, 375(1-2), 151-154.
- Hill, S. E. (1941). The relation between protoplasmic streaming and the action potential in Nitella and Chara. *Biol Bull*, 81(2), 296.

- Hille B. (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA, USA.
- Hilleary, R., Gilroy, S., (2018). Systemic signaling in response to wounding and pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 43, 57-62.
- Hlaváčková, V., Krchnák, P., Naus, J., Novák, O., Spundová, M., Strnad, M., (2006). Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning. *Planta.* 225, 235-244.
- Hlavinka, J., Nožková-Hlaváčková, V., Floková, K., Novák, O., Nauš, J., (2012) Jasmonic acid accumulation and systemic photosynthetic and electrical changes in locally burned wild type tomato, ABA-deficient mutants and mutants pre-treated by ABA. *Plant Physiol. Biochem.* 54, 89-96.
- Hockerman, G.H., Peterson, B.Z., Johnson, B.D., and Catterall, W.A. (1997). Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37, 361-396.
- Hoffmann R, Bisson MA (1986) *Chara buckellii*, a euryhaline charophyte from an unusual saline environment. I. Osmotic relations at steady state. *Can J Bot* 64:1599–1605
- Hofmann, F., Lacinová, L., and Klugbauer, N. (1999). Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 139, 33-87.
- Homann U. & Thiel G. (1994) Cl<sup>-</sup> and K<sup>+</sup> channel currents during the action potential in *Chara*: simultaneous recording of membrane voltage and patch currents. *Journal of Membrane Biology* 141, 297–309.
- Hope AB, Findlay GP (1964) The action potential in *Chara*. *Plant Cell Physiol* 5:377–379
- Huang, J. W., Grunes, D. L., & KoCHIAN, L. V. (1994). Voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> influx into right-side-out plasma membrane vesicles isolated from wheat roots: characterization of a putative Ca<sup>2+</sup> channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8), 3473-3477.
- Huber, A.E., Bauerle, T.L., (2016). Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge. *J. Exp. Bot.* 67, 2063-2079.
- Yamamoto K, Kikuyama M, Sutoh-Yamamoto N, Kami-tsubo E, Katayama E. 1995. Myosin from alga *Chara*: Unique structure revealed by electron microscopy. *J Mol Biol* 254:109–112

- Yokota E, Muto S, Shimmen T (1999) Inhibitory regulation of higher-plant myosin by Ca<sup>2+</sup> ions. *Plant Physiol* 119(1):231–240
- John, D. M. 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles: An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*. Cambridge University Press, Cambridge
- Kamiya, N. (1956). Velocity distribution of the protoplasmic streaming in *Nitella* cells. *Bot. Mag. Tokyo*, 69, 544-554.
- Kania, E., Pająk, B., O'Prey, J., Sierra Gonzalez, P., Litwiniuk, A., Urbańska, K., ... & Orzechowski, A. (2017). Verapamil treatment induces cytoprotective autophagy by modulating cellular metabolism. *The FEBS journal*, 284(9), 1370-1387.
- Katicheva, L., Sukhov, V., Akinchits, E., Vodeneev, V., 2014. Ionic nature of burn induced variation potential in wheat leaves. *Plant Cell Physiol*. 55, 1511-1519
- Kato, S., Kawai, H., Takimoto, M., Suga, H., Yohda, K., Horiya, K., ... & Sakayama, H. (2014). Occurrence of the endangered species *Nitellopsis obtusa* (Charales, Charophyceae) in western Japan and the genetic differences within and among Japanese populations. *Phycological research*, 62(3), 222-227.
- Kersey, Y. M., Hepler, P. K., Palevitz, B. A., & Wessells, N. K. (1976). Polarity of actin filaments in Characean algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(1), 165-167.
- Kiegle, E., Gilliam, M., Haseloff, J., & Tester, M. (2000). Hyperpolarisation-activated calcium currents found only in cells from the elongation zone of *Arabidopsis thaliana* roots. *The Plant Journal*, 21(2), 225-229.
- Kimura Y, Toyoshima N, Hirakawa N, Okamoto K, Ishijima A. 2003. A kinetic mechanism for the fast movement of *Chara* myosin. *J Mol Biol* 328:939–950
- Kishimoto U. (1968) Response of *Chara* internodes to mechanical stimulation. Annual Report of Biological Works, Faculty of Science, Osaka University 16, 61–66.
- Kisnieriene, V., Lapeikaite, I., Sevriukova, O., Ruksenas, O., (2016). The effects of Ni<sup>2+</sup> on electrical signaling of *Nitellopsis obtusa* cells. *J Plant Res*. 129, 551-558.
- Kitamura K, Tokunaga M, Iwane AH, Yanagida T. 1999. A single myosin head moves along an actin filament with regular steps of 5.3 nanometres. *Nature* 397:129–134

- Klüsener, B., Boheim, G., Liss, H., Engelberth, J., & Weiler, E. W. (1995). Gadolinium-sensitive, voltage-dependent calcium release channels in the endoplasmic reticulum of a higher plant mechanoreceptor organ. *The EMBO Journal*, 14(12), 2708-2714.
- Knight M.R., Campbell A.K., Smith S.M. & Trewavas A.J. (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352, 524–526
- Kohama, K., & Shimmen, T. (1985). Inhibitory  $Ca^{2+}$ -control of movement of beads coated with physarum myosin along actin-cables in Chara internodal cells. *Protoplasma*, 129(1), 88-91.
- Korsch, H., U. Raabe, and K. van de Weyer. (2008). “Verbreitungskarten der Characeen Deutschlands” [Distribution Maps of Characeae of Germany.] *Rostocker Meeresbiologische Beiträge*: 57–108.
- Krol, E., Dziubinska, H., Stolarz, M., & Trebacz, K. (2006). Effects of ion channel inhibitors on cold- and electrically-induced action potentials in *Dionaea muscipula*. *Biologia Plantarum*, 50(3), 411-416.
- Kropf, D. L., Quatrano, R. S. (1987). Localization of membrane-associated calcium during development of furoid algae using chlorotetracycline. *Planta*, 171(2), 158-170.
- Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H., & Thibaud, J. B. (2000). A shaker-like  $K^+$  channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 12(6), 837-851.
- Lapeikaitė, I. (2020). *Amino rūgščių ir NMDA įtaka menturdumblių Nitellopsis obtusa ląstelių elektrinių signalų parametrams* (Doctoral dissertation, Vilniaus universitetas).
- Larkin, D. J., Monfils, A. K., Boissezon, A., Sleith, R. S., Skawinski, P. M., Welling, C. H., ... & Karol, K. G. (2018). Biology, ecology, and management of starry stonewort (*Nitellopsis obtusa*; Characeae): A Red-listed Eurasian green alga invasive in North America. *Aquatic Botany*, 148, 15-24.
- Lautner, S., Grams, T.E.E., Matyssek, R. Fromm, J., 2005. Characteristics of Electrical Signals in Poplar and Responses in Photosynthesis. *Plant Physiol.* 138, 2200–2209

- Lehtonen, J. (1984). The significance of Ca<sup>2+</sup> in the morphogenesis of *Micrasterias* studied with EGTA, verapamil, LaCl<sub>3</sub> and calcium ionophore A 23187. *Plant science letters*, 33(1), 53-60.
- León, J., Rojo, E., Sánchez-Serrano, J.J., 2001. Wound signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 52, 1-9.
- Li, J. F., and Nebenfuhr, A. (2007). Organelle targeting of myosin XI is mediated by two globular tail subdomains with separate cargo binding sites. *J. Biol. Chem.* 282, 20593–20602.
- Lotersztajn, S., Mavier, P., Clergue, J., Dhumeaux, D., & Pecker, F. (1982). Human liver plasma membrane Ca-ATPase: Identification and sensitivity to calcium antagonists. *Hepatology*, 2(6), 843-848
- 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. *Journal of Membrane Biology* 72, 43–58.
- Lüttge U., Kluge M. & Bauer G. (2005) *Botanik*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany
- Mancuso S. (1999) Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Plant Physiology* 26, 55–61
- Marc, J. (1997). Microtubule-organizing centres in plants. *Trends in plant science*, 2(6), 223-230.
- Marschner, H. (2011). Marschner's mineral nutrition of higher plants. Academic press.
- Masson-Delmotte, V., M. Schulz, A. Abe-Ouchi, J. Beer, A. Ganopolski, J. F. González Rouco, E. Jansen, et al. 2013. “Information from Paleoclimate Archives.” In *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, edited by T. F. Stocker, D. Qin, G. -K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, and P. M. Midgley, 383–464. Cambridge: Cambridge United Kingdom University Press
- Mazars, C., Thion, L., Thuleau, P., Graziana, A., Knight, M. R., Moreau, M., & Ranjeva, R. (1997). Organization of cytoskeleton controls the changes in cytosolic calcium of cold-shocked *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasts. *Cell calcium*, 22(5), 413-420.
- McAinsh, M. R., Webb, A. A., Taylor, J. E., & Hetherington, A. M. (1995). Stimulus-induced oscillations in guard cell cytosolic free calcium. *The Plant Cell*, 7(8), 1207-1219.



- Mehta, A. D., Rock, R. S., Rief, M., Spudich, J. A., Mooseker, M. S., and Cheney, R. E. (1999). Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* 400, 590–593.
- Millard RW, Lathrop DA, Grupp G, Ashraf M, Grupp IL, (1982) Differential cardiovascular effects of calcium channel blocking agents: potential mechanisms. *American Journal of Cardiology* 49: 499-506
- Miller R.J., (1992). Voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels, *Journal of Biological Chemistry*, 267, 1403-1409
- Miller, A. J., & Sanders, D. (1987). Depletion of cytosolic free calcium induced by photosynthesis. *Nature*, 326(6111), 397-400.
- Miller, A. J., Vogg, G., & Sanders, D. (1990). Cytosolic calcium homeostasis in fungi: roles of plasma membrane transport and intracellular sequestration of calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(23), 9348-9352.
- Minguet-Parramona, C.; Wang, Y.; Hills, A.; Vialet-Chabrand, S.; Griffiths, H.; Rogers, S.; Lawson, T.; Lew, V.L.; Blatt, M.R. An optimal frequency in Ca<sup>2+</sup> oscillations for stomatal closure is an emergent property of ion transport in guard cells. *Plant Physiol.* 2016, 170, 33–42
- Morel N, Buryi V, Feron O, Gomez JP, Christen MO, Godfraind T (1998). The action of calcium channel blockers in recombinant L-type calcium channel alpha-1-subunits. *Br J Pharmacol.* 125:1005-1012..
- Morimatsu M, Nakamura A, Sumiyoshi H, Sakaba N, Taniguchi H, Kohama K, Higashi-Fujime S. 2000. The molecular structure of the fastest myosin from green algae, *Chara*. *Biochem Biophys Res Commun* 270:147–152.
- Nayler WG, Ferrari R, Williams A. (1980) Protective effect of pretreatment with verapamil, nifedipine and propranolol on mitochondrial function in the ischemic and perfused myocardium. *American Journal of Cardiology* 46: 242-248
- Nastuk W.L. & Hodgkin A.L. (1950) The electrical activity of single muscle fibers. *Journal of Cellular and comparative Physiology* 35, 39–73.
- Noguchi, K., Masumiya, H., Takahashi, K., Kaneko, K., Higuchi, S., Tanaka, H., & Shigenobu, K. (1997). *Comparative effects of gallopamil and verapamil on the mechanical and*

*electrophysiological parameters of isolated guinea-pig myocardium. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 75(12), 1316–1321.*

- Nothnagel EA, Webb WW. (1982) Hydrodynamic models of viscous coupling between motile myosin and endoplasm in characean algae. *J. Cell Biol.* 94, 444–454.
- Novikova, E.M., Vodeneev, V.A., Sukhov, V.S., 2017. Mathematical model of action potential in higher plants with account for the involvement of vacuole in the electrical signal generation. *Biochem Moscow Suppl Ser A.* 11, 151-167.
- Okihara K., Ohkawa T., Tsutsui I. & Kasai M. (1991) A Ca<sup>2+</sup> and voltage-dependent Cl<sup>-</sup> sensitive anion channel in the Chara plasma membrane: a patch-clamp study. *Plant Cell Physiol* 32, 593–601.
- Opritov, V.A., Pyatygin, S.S., Retivin, V.G., (1991). Bioelectrogenesis in higher plants, Moscow [in Russian].
- Orvos, P., Kohajda, Z., Szlovák, J., Gazdag, P., Árpádfy-Lovas, T., Tóth, D., ... & Virág, L. (2019). Evaluation of Possible Proarrhythmic Potency: Comparison of the Effect of Dofetilide, Cisapride, Sotalol, Terfenadine, and Verapamil on hERG and Native I<sub>Kr</sub> Currents and on Cardiac Action Potential. *Toxicological Sciences*, 168(2), 365-380.
- Paganetto A, Carpaneto A, Gambale F. 2001. Ion transport and metal sensitivity of vacuolar channels from the roots of the aquatic plant *Eichhornia crassipes*. *Plant, Cell and Environment* 24, 1329–1336.
- Pickard B. (1973) Action potentials in higher plants. *Botanical Review* 39, 172–201
- Pickard, B. G., & Ding, J. P. (1993). The mechanosensory calcium-selective ion channel: key component of a plasmalemmal control centre?. *Functional Plant Biology*, 20(5), 439-459.
- Piñeros, M., Tester, M. (1997). Calcium channels in higher plant cells: selectivity, regulation and pharmacology. *Journal of experimental botany*, 551-577.
- Piñeros, M., & Tester, M. (1995). Characterization of a voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>-selective channel from wheat roots. *Planta*, 195(4), 478-488.

- Pineros, M., & Tester, M. (1997). Characterization of the high-affinity verapamil binding site in a plant plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-selective channel. *The Journal of membrane biology*, 157(2), 139-145.
- Plieth C., Sattelmacher B., Hansen U.-P. & Thiel G. (1999) The action potential in Chara:Ca<sup>2+</sup> release from internal stores visualized by Mn<sup>2+</sup> induced quenching of fura-dextran. *Plant Journal* 13, 167–175
- Pottosin, I. I., & Schönknecht, G. (2007). Vacuolar calcium channels. *Journal of experimental botany*, 58(7), 1559-1569.
- Prisant LM. (2001). Verapamil revisited: a transition in novel drug delivery systems and outcomes. *Heart Dis.* 3:55–62
- Pullman, G.D., and Crawford, G. 2010. A decade of starry stonewort in Michigan. *Lakeline Magazine* [Summer 2010]. pp. 36–42
- Pupkis, V., Buisas, R., Lapeikaite, I., & Kisnieriene, V. (2021). Using Plant Cells of *Nitellopsis obtusa* for Biophysical Education. *The Biophysicist*, 2(1), 18-29.
- Randall A, Tsien RW. (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebral granule neurons. *J Neurosci.*;15:2995-3012.
- Reid, R. J., & Smith, F. A. (1992). Regulation of calcium influx in Chara: effects of K<sup>+</sup>, pH, metabolic inhibition, and calcium channel blockers. *Plant physiology*, 100(2), 637-643.
- Reiss, H. D., Herth, W., (1985). Nifedipine-sensitive calcium channels are involved in polar growth of lily pollen tubes. *Journal of Cell Science*, 76(1), 247-254.
- Rengel, Z., & Elliott, D. C. (1992). Aluminium inhibits net <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> uptake by *Amaranthus* protoplasts. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 188(3), 177-186.
- Retivin, V. G., Opritov, V. A., & Fedulina, S. B. (1997). Generation of action potential induces preadaptation of *Cucurbita pepo* L. stem tissues to freezing injury. *Russian Journal of Plant Physiology*, 44(4), 432-442.
- Rivolta, M. N., Urrutia, R., & Kachar, B. (1995). A soluble motor from the alga *Nitella* supports fast movement of actin filaments in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1232(1-2), 1-4.

- Romagnoli, S., Cai, G., & Cresti, M. (2003). In vitro assays demonstrate that pollen tube organelles use kinesin-related motor proteins to move along microtubules. *The Plant Cell*, 15(1), 251-269
- Salvador-Recatalà, V., Tjallingii W.F., Farmer, E.E.,(2014). Real-time, in vivo intracellular recordings of caterpillar-induced depolarization waves in sieve elements using aphid electrodes. *New Phytol.* 203, 674-684.
- Sanders, D., Brownlee, C., & Harper, J. F. (1999). Communicating with calcium. *The Plant Cell*, 11(4), 691-706.
- Sattarzadeh A, Franzen R, Schmelzer E (2008) The *Arabidopsis* class VIII myosin ATM2 is involved in endocytosis. *Cell Motil Cytoskeleton* 65(6):457–468
- Schneider J, Hauser R, Andreas J-O, Linz K, Jahnel U. (2005) Differential effects of human ether-a-go-go-related gene (HERG) blocking agents on QT duration variability in conscious dogs. *Eur J Pharmacol.* ;512:53-60
- Schulz-Lessdorf B, Hedrich R. (1995). Protons and calcium modulate SV-type channels in the vacuolar-lysosomal compartment. Channel interaction with calmodulin inhibitors. *Planta* 197, 655–671.
- Schumaker, K. S., & Gizinski, M. J. (1993). Cytokinin stimulates dihydropyridine-sensitive calcium uptake in moss protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(23), 10937-10941.
- Shabala S (2003) Regulation of potassium transport in leaves: from molecular to tissue level. *Ann Bot* 92:627–634
- Shah, J., Zeier, J., (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Front. Plant Sci.* 4, 30.
- Sheetz, M. P., & Spudich, J. A. (1983). Movement of myosin-coated fluorescent beads on actin cables in vitro. *Nature*, 303(5912), 31-35.
- Shibaoka, H. (1994). Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules: alterations in the cross-linking between microtubules and the plasma membrane. *Annual review of plant biology*, 45(1), 527-544.
- Shigaki T, Hirschi KD. (2006). Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H<sup>+</sup> exchangers in plants. *Plant Biology* 419–429.

- Shimmen, T. (2007). The sliding theory of cytoplasmic streaming: fifty years of progress. *Journal of plant research*, 120(1), 31-43.
- Shimmen, T., & Yokota, E. (2004). Cytoplasmic streaming in plants. *Current opinion in cell biology*, 16(1), 68-72.
- Shimmen, T., Mimura, T., Kikuyama, M., & Tazawa, M. (1994). Characean cells as a tool for studying electrophysiological characteristics of plant cells. *Cell Structure and Function*, 19(5), 263-278.
- Sibaoka T. (1969) Physiology of rapid movements in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 20, 165–184
- Sibaoka, T. (1956). Shock stoppage of the protoplasmic streaming in relation to the action potential in Chara. *Sci. Rep. Tohoku Univ. Ser. IV (Biol.)*, 22, 157-166.
- Sibaoka, T. (1991). Rapid plant movements triggered by action potentials. *The botanical magazine Shokubutsu-gaku-zasshi*, 104(1), 73-95.
- Singh, P., Sharma, S., & Prasad, V. (2011). Verapamil, a calcium channel blocker, induces systemic antiviral resistance in susceptible plants. *Journal of phytopathology*, 159(2), 127-129.
- Soulié-Märsche, I. (1979). “Etude comparée des Gyrogonites de Charophytes actuelles et fossiles et phylogénie des genres actuels” [Comparative Study of Gyrogonites of Living and Fossil Charophytes and phylogeny of Living Genus.] PhD diss., Université des Sciences et Techniques de Montpellier 2
- Spanswick R.M. & Costerton J.W.F. (1967) Plasmodesmata in *Nitella translucens*: structure and electrical resistance. *Journal of Cell Science* 2, 451–464
- Spanswick R.M. (1972) Electrical coupling between cells of higher plants: a direct demonstration of intercellular communication. *Planta* 102, 215–227
- Spedding, M., Paoletti, R. (1992). Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacological Reviews*, 44(3), 363-376.
- Stahlberg R, Cleland RE, Van Volkenburgh E. Slow wave potentials– a propagating electrical signal unique to higher plants. In: Baluska F, Mancuso S, Volkmann D, editors. *Communication in plants*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2006. p. 291–307.
- Staiger, C. J., Baluska, F., Volkmann, D., & Barlow, P. (Eds.). (2013). *Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions* (Vol. 89). Springer Science & Business Media.

- Stankovic B, Witters DL, Zawadzki T, et al. Action potentials and variation potentials in sunflower: an analysis of their relationship and distinguishing characteristics. *Physiol Plant* 1998;103:51–8.
- Storti, M., Costa, A., Golin, S., Zottini, M., Morosinotto, T., Alboresi, A., 2018. Systemic Calcium Wave Propagation in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol.* 59, 1377-1384.
- Striessnig J, Grabner M, Mitterdofer J, Hering S, Sinnegger MJ, Glossmann H. (1998) Structural basis of drug binding to L-Ca<sup>2+</sup> channels. *TiPS*;19:108–115.
- Striessnig, J. (1999). Pharmacology, structure and function of cardiac L-type calcium channels. *Cell Physiol Biochem* 9, 242-269.
- Sukhov, V., Akinchits, E., Katicheva, L., Vodeneev, V. (2013). Simulation of variation potential in higher plant cells. *J Membr Biol.* 246, 287-296.
- Sukhov, V., Sukhova, E., & Vodeneev, V. (2019). Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants. *Progress in biophysics and molecular biology*, 146, 63-84.
- Sukhov, V., Surova, L., Morozova, E., Sherstneva, O., Vodeneev, V., (2016). Changes in H<sup>+</sup>-ATP synthase activity, proton electrochemical gradient, and pH in pea chloroplast can be connected with variation potential. *Front Plant Sci.* 7, 1092
- Sukhova, E., Akinchits, E., Sukhov, V., (2017). Mathematical models of electrical activity in plants. *J Membr Biol.* 250, 407–423
- Sukhova, E., Mudrilov, M., Vodeneev, V., Sukhov, V., (2018). Influence of the variation potential on photosynthetic flows of light energy and electrons in pea. *Photosynth Res.* 136, 215-228.
- Suwalsky, M., Munoz, M., Mennickent, S., Sotomayor, C. P., Bolognin, S., & Zatta, P. (2010). Structural effects of verapamil on cell membranes and molecular models. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 55(1), 1-4.
- Sweeney, H. L., Rosenfeld, S. S., Brown, F., Faust, L., Smith, J., Xing, J., ... & Sellers, J. R. (1998). Kinetic tuning of myosin via a flexible loop adjacent to the nucleotide binding pocket. *Journal of Biological Chemistry*, 273(11), 6262-6270.

- Sze H, Liang F, Hwang I, Curran AC, Harper JF. (2000). Diversity and regulation of plant Ca<sup>2+</sup>pumps: insights from expression in yeast. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51, 433–462.
- Takeda, T., Kitagawa, T., Takeuchi, Y., Seki, M., & Furusaki, S. (1998). Metabolic responses of plant cell culture to hydrodynamic stress. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 76(2), 267-275.
- Tasaki I. (1952) Properties of myelinated fibers in frog sciatic nerve and in spinal cord as examined with microelectrodes. *Japanese Journal of Physiology* 3, 73–94.
- Tazawa, M., & Shimmen, T. (2001). How characean cells have contributed to the progress of plant membrane biophysics. *Functional Plant Biology*, 28(7), 523-539.
- Tfelt-Hansen, P., & Tfelt-Hansen, J. (2009). Verapamil for cluster headache. Clinical pharmacology and possible mode of action. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 49(1), 117-125.
- Thion, L., Mazars, C., Nacry, P., Bouchez, D., Moreau, M., Ranjeva, R., & Thuleau, P. (1998). Plasma membrane depolarization-activated calcium channels, stimulated by microtubule-depolymerizing drugs in wild-type *Arabidopsis thaliana* protoplasts, display constitutively large activities and a longer half-life in ton 2 mutant cells affected in the organization of cortical microtubules. *The Plant Journal*, 13(5), 603-610.
- Thuleau, P., Graziana, A., Ranjeva, R., & Schroeder, J. I. (1993). Solubilized proteins from carrot (*Daucus carota* L.) membranes bind calcium channel blockers and form calcium-permeable ion channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(2), 765-769.
- Thuleau, P., Moreau, M., Schroeder, J. I., & Ranjeva, R. (1994). Recruitment of plasma membrane voltage-dependent calcium-permeable channels in carrot cells. *The EMBO journal*, 13(24), 5843-5847.
- Thuleau, P., Schroeder, J. I., & Ranjeva, R. (1998). Recent advances in the regulation of plant calcium channels: evidence for regulation by G-proteins, the cytoskeleton and second messengers. *Current opinion in plant biology*, 1(5), 424-427.
- 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. *The EMBO Journal*, 13(13), 2970-2975.

- Tintinalli JE. (2004). Text book of emergency medicine. 6th ed. *McGraw-Hill Co.*; 209–21
- Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A.J., Howe, G.A., Gilroy, S.. (2018). Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science*. 361, 1112-1115.
- Tominaga M, Kimura A, Yokota E, Haraguchi T, Shimmen T, Yamamoto K et al. (2013) Cytoplasmic streaming velocity as a plant size determinant. *Dev Cell* 27: 345–352.
- Tominaga, M., & Ito, K. (2015). The molecular mechanism and physiological role of cytoplasmic streaming. *Current opinion in plant biology*, 27, 104-110.
- Tominaga, M., & Nakano, A. (2012). Plant-specific myosin XI, a molecular perspective. *Frontiers in plant science*, 3, 211.
- Toornvliet R, Van Berckel BNM, Luurtsema G, (2006) Effect of age on functional P-glycoprotein in the blood-brain barrier measured by use of (R)[11C]verapamil and positron emission tomography. *Clin Pharmacol Ther.* ;79:540-548.
- Trebacz, K., Dziubinska, H., Krol, E., (2006). Electrical signals in long-distance communication in plants, In: Baluška, F., Mancuso, S., Volkmann, D. (Eds), *Communication in Plants. Neuronal Aspects of Plant Life*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 277- 1760 290.
- Trewavas, A. (1999). Le calcium, c'est la vie: calcium makes waves. *Plant Physiology*, 120(1), 1-6.
- Tsutsui, I., Ohkawa, T. A., Nagai, R., & Kishimoto, U. (1987). Role of calcium ion in the excitability and electrogenic pump activity of the *Chara corallina* membrane: I. Effects of La<sup>3+</sup>, verapamil, EGTA, W-7, and TFP on the action potential. *The Journal of Membrane Biology*, 96(1), 65-73.
- Uyeda, T. Q., Abramson, P. D., and Spudich, J. A. (1996). The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 4459–4464
- Uyeda, T. Q., Ruppel, K. M., and Spudich, J. A. (1994). Enzymatic activities correlate with chimaeric substitutions at the actin-binding face of myosin. *Nature* 368, 567–569



- Umrath K. (1930) Untersuchungen über Plasma und Plasmaströmungen an Characeen. IV. Potentialmessungen an *Nitella mucronata* mit besonderer Berücksichtigung der Erregungserscheinungen. *Protoplasma* 9, 576–597.
- Vale, R. D., Szent-Gyorgyi, A. G., Sheetz, M. P. (1984). Movement of scallop myosin on *Nitella* actin filaments: regulation by calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(21), 6775-6778.
- Van Bel A.J.E. & Ehlers K. (2004) Electrical signalling via plasmodesmata. In *Plasmodesmata* (ed. K.J. Oparka), pp. 263–278.
- Verchot-Lubicz, J., and Goldstein, R. E. (2010). Cytoplasmic streaming enables the distribution of molecules and vesicles in large plant cells. *Protoplasma* 240, 99–107
- Vicente, J., Johannesen, L., Mason, J. W., Crumb, W. J., Pueyo, E., Stockbridge, N., & Strauss, D. G. (2015). Comprehensive T wave morphology assessment in a randomized clinical study of dofetilide, quinidine, ranolazine, and verapamil. *Journal of the American Heart Association*, 4(4)
- Vodeneev, V., Akinchits, E., & Sukhov, V. (2015). Variation potential in higher plants: mechanisms of generation and propagation. *Plant Signaling & Behavior*, 10(9),
- Vodeneev, V., Mudrilov, M., Akinchits, E., Balalaeva, I., & Sukhov, V. (2018). Parameters of electrical signals and photosynthetic responses induced by them in pea seedlings depend on the nature of stimulus. *Functional Plant Biology*, 45(2), 160-170.
- Volkov, A. G. (2000). Green plants: electrochemical interfaces. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 483(1-2), 150-156.
- Vuralhan-Eckert, J., Lautner, S., Fromm, J., (2018) Effect of simultaneously induced environmental stimuli on electrical signalling and gas exchange in maize plants. *J. Plant Physiol.* 1819 223, 32-36.
- Wacker, I., Schnepf, E. (1990). Effects of nifedipine, verapamil, and diltiazem on tip growth in *Funaria hygrometrica*. *Planta*, 180(4), 492-501.
- Walker DJ, Leigh RA, Miller AJ (1996) Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10510–10514

- Wang, Z., Wang, D., Li, Y., & Zhang, X. (2014). Protective effects of verapamil against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in human lens epithelial cells. *Biomolecules & therapeutics*, 22(6), 553.
- White, P. J. (1998). Calcium channels in the plasma membrane of root cells. *Annals of Botany*, 81(2), 173-183.
- White, P. J. (2000). Calcium channels in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1-2), 171-189.
- White, P. J., Pineros, M., Tester, M., & Ridout, M. S. (2000). Cation permeability and selectivity of a root plasma membrane calcium channel. *The Journal of membrane biology*, 174(1), 71-83.
- Williamson RE: (1972) A light-microscope study of the action of cytochalasin B on the cells and isolated cytoplasm of the characeae. *J Cell Sci*, 10:811-819.
- Williamson, R. E. (1986). Organelle movements along actin filaments and microtubules. *Plant physiology*, 82(3), 631-634.
- Winter U, Kirst GO, Grabowski V, Heinemann U, Plettner I, Wiese S (1999) Salinity tolerance in *Nitellopsis obtusa*. *Aust J Bot* 47:337–346
- Wolniak, S. M., Bart, K. M. (1986). Nifedipine reversibly arrests mitosis in stamen hair cells of *Tradescantia*. *European journal of cell biology*, 39(2), 273-277.
- Woodhouse, F. G., & Goldstein, R. E. (2013). Cytoplasmic streaming in plant cells emerges naturally by microfilament self-organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(35), 14132-14137.
- Wright J.P. & Fisher D.B. (1981) Measurement of the sieve tube membrane potential. *Plant Physiology* 67, 845–848.
- Zhang, S., Sawanobori, T., Hirano, Y., and Hiraoka, M. (1997). Multiple Modulations of Action Potential Duration by Different Calcium Channel Blocking Agents in Guinea Pig Ventricular Myocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 30(4), 489-96.
- Zhong, Sun L, Penny D (2015) The Origin of Land Plants: A Phylogenomic Perspective. *Evol Bioinform* 137, 137–141

- Zhu, L., Gao, J., Wang, Y., Zhao, X. N., & Zhang, Z. X. (1997). *NEURON DEGENERATION INDUCED BY VERAPAMIL AND ATTENUATED BY EGb761*. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 8(4).
- Zimmermann, M.R., Maischak, H., Mithöfer, A., Boland, W., Felle, H.H., (2009). System potentials, a novel electrical long-distance apoplasmic signal in plants, induced by wounding. *Plant Physiol.* 149, 1593–1600.
- Zimmermann, M.R., Mithöfer, A., Will, T., Felle, H.H., Furch, A.C., (2016) Herbivore triggered electrophysiological reactions: candidates for systemic signals in higher plants and the challenge of their identification. *Plant Physiol.* 170, 2407-2419.
- Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J. M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R., & Scheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a plant Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(6), 2751-2755.