

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Neurobiologijos ir biofizikos katedra

**Skausmą malšinančių vaistų poveikis
menturdumblio *Nitellopsis obtusa* ląstelei**

Magistro baigiamasis darbas

Autorius : nuolatinių neurobiologijos magistro studijų II kurso
studentė Goda Plučaitė

Vadovas: dr. Levonas Manusadžianas

Vilnius, 2021

Turinys

Santrumpos	4
1. Literatūros apžvalga	7
1.1. Menturdumbliai <i>Nitellopsis obtusa</i>	7
1.2. Rūšies aprašymas.....	8
1.2.1. Klasifikacija.....	8
1.2.2. Morfologija.....	8
1.2.3. Kilmė	8
1.2.4. Paplitimas ir išsaugojimas	9
1.3. Farmacinės medžiagos.....	11
1.4. Farmacinių medžiagų patekimas į aplinką.....	12
1.5. Antibiotikų poveikis vandens augalams	14
1.6. Paracetamolio poveikis vandens augalams	14
1.7. Paracetamolis.....	16
1.8. Diklofenakas	17
1.9. Ibuprofenas.....	19
1.10. Tarpląstelinis membranų potencialas	21
1.11. Augalų veikimo potencialai	22
1.12. Elektrinių signalų sklidimas augaluose.....	23
1.13. Elektros signalų matavimo technikos augaluose.....	25
1.13.1. Tarpląstelinis įrašymas.....	25
2. Darbo metodika.....	27
2.1 Tyrimo objektas.....	27
2.2. Medžiagos ir tirpalai.....	27
2.3. Letalumo tyrimai	27
2.4. Elektrofiziologiniai matavimai.....	28
2.4.1. Elektrofiziologinio tyrimo eiga	29
3. Rezultatai	31
3.1. Diklofenako, ibuprofeno ir paracetamolio toksikologinių duomenų metaanalizė.....	31
3.2. Diklofenako, ibuprofeno ir paracetamolio poveikis menturdumblių <i>N. obtusa</i> ląstelių mirtingumui	40
3.3. Diklofenako ir paracetamolio poveikis <i>N. obtusa</i> ląstelių membranos potencialui	42

4. Rezultatu aptarimas.....	47
Išvados	51
SANTRAUKA	52
SUMMARY	54
Literatūra.....	56

Santrumpos

AP - veikimo potencialas

V_m - realūs membranos potencialai

GST - glutationo S-transferazės

UDP-gliukurono rūgštis - uridino 5'-difosfo-gliukurono rūgštis

LEP - vietinis elektrinis potencialas

VP - variacijos potencialas

EKG - elektrokardiograma

EEG - elektroencefalograma

DCF - diklofenakas

IB - ibuprofenas

SSD - rūšių jautrumo pasiskirstymas

PPCP - farmacijos ir asmeninės priežiūros produktai

NAPQI - N-acetil-p-benzochinoneiminas

NVNU - nesteroidinis prieš uždegiminius vaistas

PSO - Pasaulio sveikatos organizacijos

ES – Europos sąjunga

SPR - Paviršiaus plazminio rezonanso

SP – sistemos potencialas

APW – dirbtinis tvenkinio vanduo

RP – ramybės potencialas

LD – liekamoji depoliarizacija

Įvadas

Šiuolaikinė medicina neįsivaizduojama be vaistų. Didėjantis pasaulio gyventojų skaičius, investicijos į sveikatos priežiūros sektorių, pažanga mokslinių tyrimų ir plėtros srityje, visuotinis prieinamumas pasaulinėje rinkoje ir senėjančios visuomenės išsivysčiusiose šalyse pastaraisiais dešimtmečiais gerokai padidino vaistų vartojimą. (Aus der Beek et al., 2016) Augant farmacinių medžiagų vartojimui daugėja įrodymų apie jų patekimą į aplinką: vaistų likučių randama paviršiniame bei požeminiame vandenyje, dirvožemyje, gyvūnų audiniuose. Didžioji dalis farmacinių medžiagų patenka į aplinką išleidžiant nuotekas iš miesto nuotekų valymo įrenginių bei netinkamai utilizuojant panaudotus vaistus (Suzdalev. 2020). Daugumos farmacinių medžiagų ekotoksikologinis poveikis vandens organizmams, o ypač augalams, nėra žinomas (Kergaravat et al., 2021).

Menturdumbliai yra visuotinai naudojami laboratorinėje praktikoje, kaip testorganizmai bei vandens telkinių būklės stebėsenoje – kaip bioindikatoriai. Menturdumblių ląstelės plačiai naudojamos įvairiuose augalų fiziologijos ir ekotoksikologiniuose tyrimuose: Tyrinėdami dideles menturdumblių ląsteles, galime suprasti sudėtingesnius aukštesniųjų augalų bei gyvūnų augimo, funkcionavimo, prisitaikymo ir išgyvenimo dėsningumus. Tarpubamblinės menturdumbio *Nitellopsis obtusa* ląstelės, dėl didelių ląstelės matmenų (gali išaugti maždaug iki 30 cm ilgio ir 1–2 mm skersmens) ir savybės lengvai generuoti veikimo potencialus bei didelio jautrumo aplinkai yra labai populiarūs augalinės ląstelės biologinių procesų ir aplinkos poveikio tyrimuose (Beilby & Casanova, 2014). Menturdumblių membranos elektrinio aktyvumo tyrimas yra vienas iš adekvačiausių metodų membranos funkcionavimui tirti *in vivo*. Tarpubamblinės menturdumblių ląsteles naudojamos viduląstelinių sistemų ir intaktinės ląstelės lygmens tyrimuose. Jos taip pat pasitelkiamos oksidacinio streso fermentų (Grigutyte et al. 2008; 2009), metabolinių procesų dinamikos (Oikawa et al., 2011), metalų ir jų nanojunginių kaupimo atskirose ląstelės dalyse (Manusadžianas et al., 2017) ir kituose tyrimuose.

Aiškinantis farmacinių medžiagų įtaką ir poveikio mechanizmus menturdumblių ląstelei svarbu registruoti reakcijas skirtinguose biologinio organizuotumo lygmenyse.

Darbo tikslas: nustatyti farmakologinių medžiagų poveikį menturdumblių ląstelių funkcionavimui.

Darbo uždaviniai:

1. Ibuprofeno, paracetamolio ir diklofenako poveikio vandens organizmams duomenų metaanalizė.
2. Ištirti diklofenako, paracetamolio ir ibuprofeno poveikį *Nitellopsis obtusa* ląstelių išgyvenamumui.
3. Ištirti diklofenako ir paracetamolio poveikį elektrofiziologiniam atsakui.
4. Palyginti menturdumblių ir kitų vandens organizmų jautrumus ibuprofeniui, paracetamoliui ir diklofenakui.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Menturdumbliai *Nitellopsis obtusa*

Nitellopsis obtusa (bendras pavadinimas: žvaigždėtasis maurašakis) priklauso žaliųjų gėlavandenių makrodumblių *Characeae* šeimai, kurie yra vietiniai augalai Europoje ir Azijoje. Jis yra vienintelis išlikęs *Nitellopsis* genties narys (Soulié-Märsche et al., 2002), todėl susirūpinta dėl jų išsaugojimo natūraliose augimvietėse (Stewart and Church, 1992).

Nepaisant išnykimo grėsmės *N. obtusa* gimtosiose vietose, šie dumbliai kelia vis didesnę susirūpinimą, kaip invazinė rūšis Šiaurės Amerikoje, kur ji buvo registruojama jau keturis dešimtmečius (Geis et al., 1981; Karol ir Sleith, 2017). Šis fenomenalus reiškinys – rūšis, kuri tampa reta arba nyksta savo gimtojoje aplinkoje, bet sugeba tapti invaziniu augalu ar gyvūnu naujose teritorijose (Callaway ir Ridenour, 2004; Escobar et al., 2016) verčia domėtis *N. obtusa* biogeografija ir ekologija tiek iš rūšių valdymo perspektyvos, tiek, kaip platesniu biologinių invazijų reiškinio pavyzdžiu. Be to, mes nežinome jokių kitų šios šeimos narių, kurie būtų laikomi invaziniais - kai kurių šių šeimos narių paplitimas gali būti laikomas sunkiai valdomais organizuotose auginimo sistemose, pavyzdžiui ryžių laukuose ar gėlo vandens kanaluose vakarinėje JAV dalyje (DiTomaso et al., 2013).

Deja, mokslinių darbų apie *N. obtusa* tyrimus buvo labai mažai. Pavyzdžiui, pagal atliktą paiešką 2018 m. parašytuose straipsniuose, buvo gauta 212 recenzuojamų straipsnių, kuriuose buvo raktiniai žodžiai „*Nitellopsis obtusa*“, kurie skirti šio menturdumblio kaip modelinės rūšies ląstelių biologijos tyrimuose; tik 12 straipsnių *N. obtusa* buvo aptarta kaip nevietinė invazinė rūšis Šiaurės Amerikoje (Geis et al., 1981; Schloesser et al., 1986; Griffiths et al., 1991). *N. obtusa* yra įtraukta į daugelį nacionalinių ir regioninių augalų apsaugos raudonųjų knygų sąrašus, bet yra labai mažai publikuotų tiriamųjų darbų apie *N. obtusa* išsaugojimą jos kaip vietinės rūšies augimvietėse (Boissezon ir Auderset Joye, 2012).

1.2. Rūšies aprašymas

1.2.1. Klasifikacija

Taksonominė *Nitellopsis obtusa* istorija buvo sudėtinga ir paini. Pirmą kartą rūšis buvo aprašyta kaip *Chara* genties (*C. obtusa* Desv. Loisel.) narė 1810 m., tačiau per ateinančius 110 metų ji buvo klasifikuojama kaip keturių skirtingų genčių narė: *Lychnothamnus*, *Nitella*, *Nitellopsis* ir *Tolypellopsis*. *Nitellopsis* išsidėstymas taip pat skyrėsi. Nors šis augalas buvo pripažintas *Characeae* genties nariu (su *Chara*, *Lamprothamnium* ir *Lychnothamnus*), jo klasifikacija, palyginti su šiomis trimis gentimis, buvo nenuosekli. Wood (1962 m.) pasiūlė padalinti „*Nitellopsinae*“, kad apimtų tik „*Nitellopsis*“, apjungdamas likusias tris geografines *Charineae* grupes. Atvirksčiai, molekulinis filogenetinis darbas palaikė *Nitellopsis* kaip labiau susijusį su *Lychnothamnus* nei su *Chara* ar *Lamprothamnium* (McCourt et al., 1996).

1.2.2. Morfologija

Nitellopsis obtusa yra rūšis, kurios aukštis siekia 30–120 cm. Atsižvelgiant į fenologiją ir augimo sąlygas, dumbliai yra nuo šviesiai žalios iki tamsiai žalios ir net rudos spalvos. Pagrindinė ašis yra liekna ir tvirta, 0,7–2 mm skersmens (1 pav.). Balti, žvaigždės formos svogūnėliai, kurie veikia kaip reprodukcinė struktūra ir žiemojimo organai (Bharathan, 1987), formuojasi iš rhizoidinių mazgų, o žali svogūnėliai atsiranda iš pagrindinių ašių ir atšakų mazgų. Šakutės yra sudarytos 5–8 atšakų, iki 9 cm ilgio, sudarytos iš 2–3 segmentų. Gametangija formuojama ant visų atšakų mazgų, atskirai arba poromis. Subrendusios antheridijos yra nuo oranžinės iki ryškiai raudonos spalvos, jų skersmuo yra 800–1500 μm. Oogonija (dar nepastebėta Šiaurės Amerikoje) yra beveik rutuliškos, nuo ryškiai raudonos iki šviesiai žalios spalvos ir turi labai mažą penkiakampę koronulą (1 pav.). Oosporos yra elipsės formos su patrumpintais pagrindais; kalcifikuotos oosporos (girokonitai) yra apverstos kriaušės formos arba pusiau cilindrinės formos (Groves, 1919).

1.2.3. Kilmė

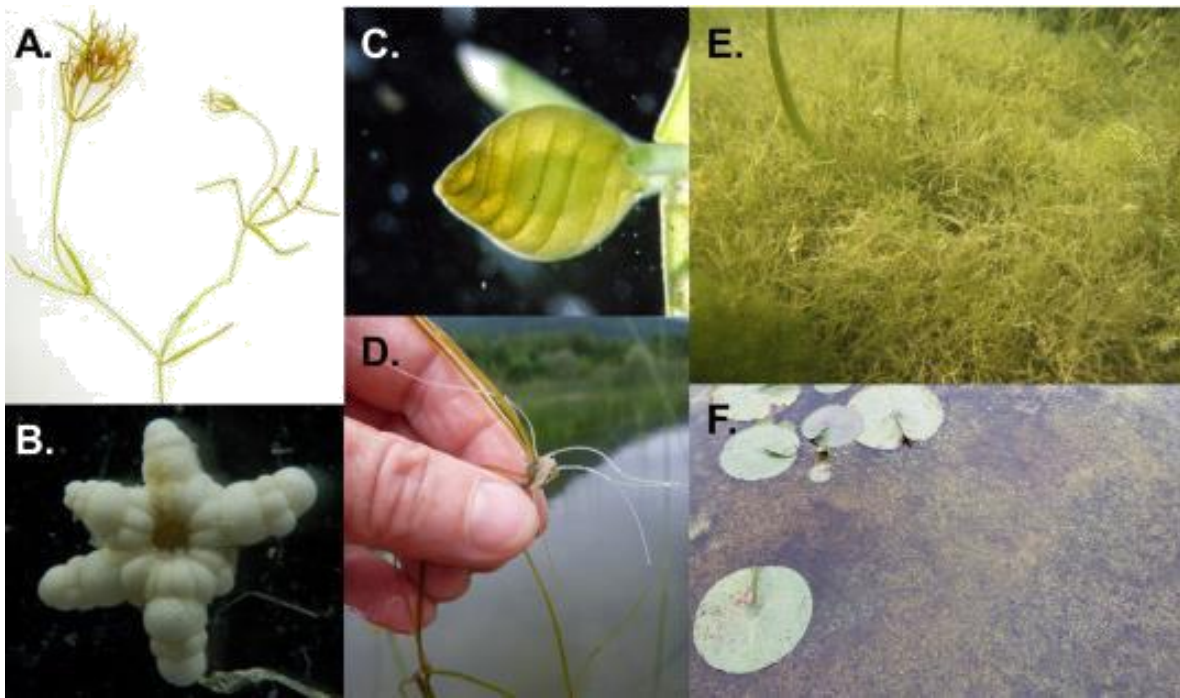
Nitellopsis obtusa yra vienintelis išlikęs narys evoliucijos linijos, kuris atsirado prieš maždaug 65 mln. metų (Kreidos-Terciario metu) (Soulié Märsche, 2002). Rekonstravus genties istorinę biogeografiją (Sanjuan ir Martin-Closas, 2015) paaiškėjo, kad ji iš pradžių buvo apribota Europoje (apytiksliai 10 mln. m.), o po to plėtėsi į rytus. Fosiliniai *N. obtusa* palaikai nuo ankstyvosios Cenozoic eros iki šios dienos parodo paskutinę giminės biogeografinės istorijos fazę

(išskyrus dirbtinį perkėlimą žmogaus pagalba) ir rodo, kad šis dumblis buvo pagrindinai paplitęs buvo Eurazijos šiaurėje, nuo Ispanijos iki Japonijos Koriljono. Sukristalėję *N. obtusa* telkiniai buvo aptikti ankstyvuosiuose Sacharos holoceno sluoksniuose (Soulié-Märsche et al., 2002), jie rodo paskutinį drėgną periodą Šiaurės Afrikoje, ir ši rūšis nerasta jaunesniuose nei 4500 metų prieš mūsų erą telkiniuose.

1.2.4. Paplitimas ir išsaugojimas

Žinomos *N. obtusa* populiacijos išsimėčiusios per Viduržemio ir Vidurio Europą, bei Aziją, bet jų nėra Afrikoje. Yra keletas įrodymų, kad dėl spartėjančio klimato atšilimo per pastaruosius tris dešimtmečius pasikeitė rūšių paplitimas. Krause (1985) pranešė, kad *N. obtusa* išplito Europoje. Prancūzijoje dumblio paplitimo diapazonas pasislinko iš vakarų į rytus, o nuo 2012 m. jis buvo aptiktas septyniose naujose vietose Prancūzijoje. Nuo 2006 m. taip pat buvo užfiksuota naujų vietų Lenkijos Wielkopolskos regione (Gąbka, 2009) ir naujai iškastuose tvenkiniuose Vokietijos potvynių vietose (Korsch et al., 2012). Šveicarijoje *N. obtusa* išsiplėtė į didelius, vidutiniškai eutrofinius žemumų ežerus (Dienst et al., 2012). Jis taip pat neseniai kolonizavo du ežerus Šveicarijos ir Prancūzijos Jūros kalnuose, atitinkamai 850 ir 1004 m aukštyje.

Makrofitinio dumblio *N. obtusa* statusas įvairiuose regionuose skiriasi: jis laikomas beveik gresiančiu išnykti Šveicarijoje, kritiškai nykstančiu Vokietijoje (Korsch et al., 2012), pažeidžiamu ar regioniškai išnykusiu Rytų Europoje, ir pažeidžiamu - Šiaurinėse šalyse (Gąbka, 2009).



1.1 pav. *N. obtusa* morfologines charakteristikas ir augimą atspindinčios nuotraukos: A. vyriškas organizmas, turintis raudoną asteridį, B. žvaigždės formos svogūnelis, C. oogonė, D. skaidrūs gijiniai rizoidai, E. povandeninis vaizdas (Niujorkas, JAV), F. mišrioji augmenija, kurioje vyrauja *N. obtusa*, pasiekianti paviršių mažame vandens gylyje (Minesota, JAV) (Larkin et al., 2018).

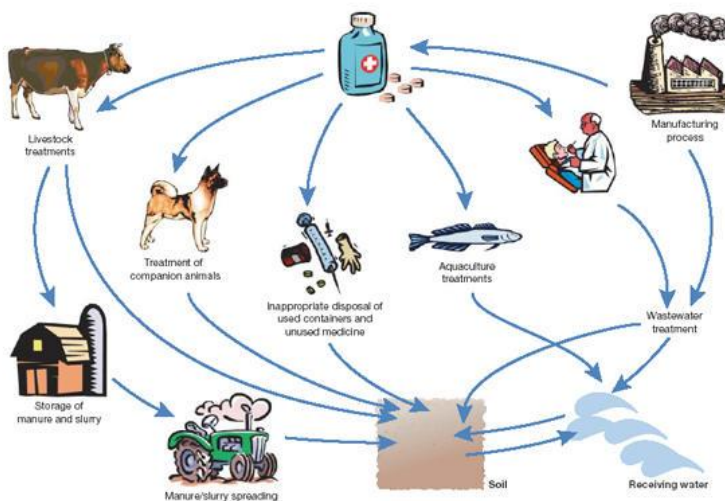
1.3. Farmacinės medžiagos

Vaistai vaidina svarbų vaidmenį gydant ir užkertant kelią žmonių ir gyvūnų ligoms. Tačiau dėl paties vaistų pobūdžio jie taip pat gali turėti nenumatytą poveikį gyvūnams ir aplinkos mikroorganizmams. Nors šalutinis poveikis žmonių ir gyvūnų sveikatai paprastai tiriamas atliekant nuodugnius saugumo ir toksikologijos tyrimus, galimas vaistų gamybos ir vartojimo poveikis aplinkai yra mažiau suprantamas ir tik neseniai tapo mokslinių tyrimų tema. Kai kurie įvairių junginių, ypač veterinarinės medicinos ir antibakterinių vaistų, poveikis jau žinomas, tačiau yra daugybė kitų medžiagų, galinčių paveikti aplinkos organizmus (Boxall et al., 2004). Tai dar labiau apsunkina, kad kai kurie vaistai gali sukelti bakterijoms ir gyvūnams poveikį būdami daug mažesnės koncentracijos, nei paprastai naudojamos atliekant saugumo ir veiksmingumo bandymus. Be to, skilimo produktai ir skirtingų biologiškai aktyvių junginių derinys gali turėti nenumatytą poveikį aplinkai. Nors saugu manyti, kad šios medžiagos iš esmės nekenkia žmonėms, tik neseniai pradėta tyrinėti, kaip jos veikia daugybę aplinkos organizmų ir koks poveikis aplinkai. Nereikia nuvertinti šios problemos masto. Pavyzdžiui, daugiau nei 10 milijonų moterų JAV vartoja geriamuosius kontraceptikus, kurie patenka į aplinką. Gaminamas ir vartojamas platus asortimentas žmonių vaistų, įskaitant antibiotikus, statinus ar citotoksikus, naudojamus gydant vėžį, kai kurių kiekis siekia tūkstančius tonų per metus. Sunku gauti informacijos apie vartojamų žmonių vaistų kiekį, tačiau naujausi Kanados duomenimis, daugiausiai vartojami vaistai yra acetaminofenas, acetilsalicilo rūgštis, ibuprofenas, diklofenakas, naproksenas ir karbamazepinas (Cleuvers et al., 2004). Didelis veterinarinių vaistų, tokių kaip akvakultūros ir žemės ūkio, antibakteriniai, priešgrybeliniai ir parazitų naikavimo vaistai. Jų kiekis taip pat gali prisidėti prie aplinkos streso, ypač todėl, kad jie dažnai patenka tiesiai į dirvožemį ir paviršinius vandenius, skirtingai nei žmonių vaistai, kurie paprastai patenka pirmiausia į vandens valymo įrenginius. Manoma, kad vien JAV akvakultūroje antibakterinių medžiagų naudojimas yra nuo 92 500 iki 196 400 kg per metus (DeLorenzo, 2008), o bendro antibakterinių medžiagų naudojimo JAV žemės ūkyje skaičiavimai siekia nuo 8,5 iki 11,2 milijono kg per metus (Dökmeci et al., 2014). 2017 - 2018m buvo vykdomas Europos Sąjungos remiamas projektas MORPHEUS, kurio dalyvės yra Lenkija, Lietuva, Suomija, Švedija, Vokietija. Jo metu vasaros ir žiemos sezonais tirta Baltijos pajūrio regiono vakarų Lietuvos nuotekų valyklų įeinantis ir išeinantis nuotekų srautas. Klaipėdos universiteto dr. Sergej Suzdalev duomenimis daugiausia vakarų Lietuvoje į upes iš nuotekų valyklų po

valymo patenka diklofenako liekanų. Vasaros metu Klaipėdos valykla į aplinką išleidžia 1548 ng/l. Žiemos metu Klaipėdos valykla į paviršinius vandenis išleidžia 2788 ng/l diklofenako medžiagos. Tai beveik dvigubai daugiau nei vasarą. Ibuprofenas ir paracetamolis beveik 100% yra pašalinamas iš nuotekų. Pagal pateiktus duomenis galima daryti išvadą, kad diklofenako, ibuprofeno ir paracetamolio kiekis žiema yra didesnis, dėl didesnio vaistų suvartojimo, nes žmonės mažiau sportuoja ir juda, ko pasekoje patiria raumenų skausmus, peršalimo ligas.

1.4. Farmacinių medžiagų patekimas į aplinką

Žmonių ir veterinarinės gydymo priemonės į aplinką patenka įvairiais būdais (1.2 pav). Gamybos proceso metu išsiskyrę likučiai gali patekti į paviršinius vandenis. Po vartojimo vaistai žmonėse absorbuojami, metabolizuojami ir pašalinami į kanalizacijos sistemą. Paprastai jie praeina valymo įrenginius, kol patenka į vandenį ar žemę. Antibakteriniai vaistai žuvisms ar krevetėms gydyti akvakultūroje tiesiogiai patenka į paviršinius vandenis. Veterinariniai vaistai, naudojami ganyklų gyvūnams gydyti, išsiskiria į dirvožemį ar paviršinius vandenis. Intensyviai gydant gyvulius, šie vaistai gali patekti į aplinką netiesiogiai su trąšomis ir mėšlu. Kiti nedideli patekimo būdai apima teršalų išmetimą į orą ir šalinant nepanaudotus vaistus bei talpyklas.



1.2 pav. Vaistų patekimo į aplinką keliai (Boxal, 2004).

Nors farmacijos produktai į aplinką buvo išleidžiami dešimtmečius, mokslininkai tik neseniai pradėjo matuoti jų kiekį aplinkoje. Naudojant skirtingų šalių informaciją ir įvairius vartojimo būdus, keliuose tyrimuose buvo nustatyti vaistai, kurie greičiausiai pateka į aplinką. Pavyzdžiui, Jungtinės Karalystės duomenys apie metinį veterinarinių vaistų vartojimą

buvo derinami su informacija apie vartojimo būdus, metabolizmą ir ekotoksiškumą, siekiant nustatyti vaistus, kuriuos reikia stebėti pagal nacionalinę monitoringo programą (Boxall, 2004). Backhaus (2004) atliko panašų tyrimą žmonėms skirtiems vaistams, naudodama informaciją apie metinį vartojimą ir terapinę dozę bei numatomojus modelius. Nors šie tyrimai paprastai grindžiami konkrečios šalies informacija, jie nurodo medžiagas, kurias reikėtų tirti tarptautiniu lygiu. Naujos analizės metodikos, tokios kaip skysčių chromatografija kartu su kintama masių spektrometrija, leido geriau suprasti, kaip vaistai elgiasi aplinkoje, ir nustatyti koncentracijas nuotekų valymo įrenginiuose, dirvožemyje, paviršiniuose vandenyse ir požeminiuose vandenyse.

Patekę į aplinką, vaistai keliauja ir pasiskirsto į orą, vandenį, dirvą ar nuosėdas. Įvairūs veiksniai, tokie kaip fizikinės ir cheminės savybės turi įtakos jų pasiskirstymui. Vaisto pernešimas tarp skirtingų aplinkos terpių pirmiausia priklauso nuo medžiagos sorbcijos dirvožemyje, nuosėdų ir vandens sistemose bei valymo įrenginių, kurie farmacijos srityje labai skiriasi. Nurodyti kelių veterinarinių vaistų sorbcijos koeficientai dirvožemyje svyruoja nuo mažiau nei 1 litro kilogramui iki daugiau kaip 6 000 litrų kilogramui (Boxall et al., 2004). Be to, skirtingai nei kitos organinės medžiagos, tokios kaip pesticidai ir pramoninės cheminės medžiagos, daugelio farmacinių preparatų sorbcijos elgesio negalima paprasčiausiai nustatyti iš medžiagos hidrofobiškumo ar organinės anglies kiekio kietoje medžiagoje (Cleuvers, 2003).

Farmacines medžiagas gali suardyti biologiniai organizmai valymo sistemose, vandens telkiniuose ir dirvožemyje, taip pat jos yra abiotinių reakcijų. Paprastai šie procesai sumažina vaistų stiprumą; tačiau kai kurie skilimo produktai turi panašų toksiškumą kaip jų pirminiai junginiai. Be to, skilimas labai priklauso nuo chemijos, biologijos ir klimato sąlygų. Pavyzdžiui, antiparazitinio ivermektino pusinės eliminacijos laikas žiemos sąlygomis yra šešis kartus ilgesnis nei vasarą, o mišinys labiau suyra smėlingose dirvose nei priesmėlio dirvožemiuose (Bound et al., 2006). Natūralūs estrogenai 17β -estradiolis ir estronas suyra aktyvuoto dumblo sistemų aerobinėse ir anoksinėse talpyklose, o 17α -etinilestradiolis suyra tik aerobinėmis sąlygomis.

Naujausi tyrimai parodė, kad dirvožemyje, paviršiniuose vandenyse ir požeminiuose vandenyse yra mažai įvairių farmacijos produktų, įskaitant hormonus, steroidus, antibiotikus ir parazitocidus (Kolpin et al., 2002). Vaistų koncentracijos paprastai yra mažos, paviršiniuose vandenyse mažesnės nei $1 \mu\text{g l}^{-1}$, tačiau nerimą kelia tai, kad daugybė gydomųjų medžiagų rasta

įvairiausiose hidrologinėse, klimato ir žemės naudojimo vietose, ir daugelis medžiagų aptinkama ištikus metus.

1.5. Antibiotikų poveikis vandens augalams

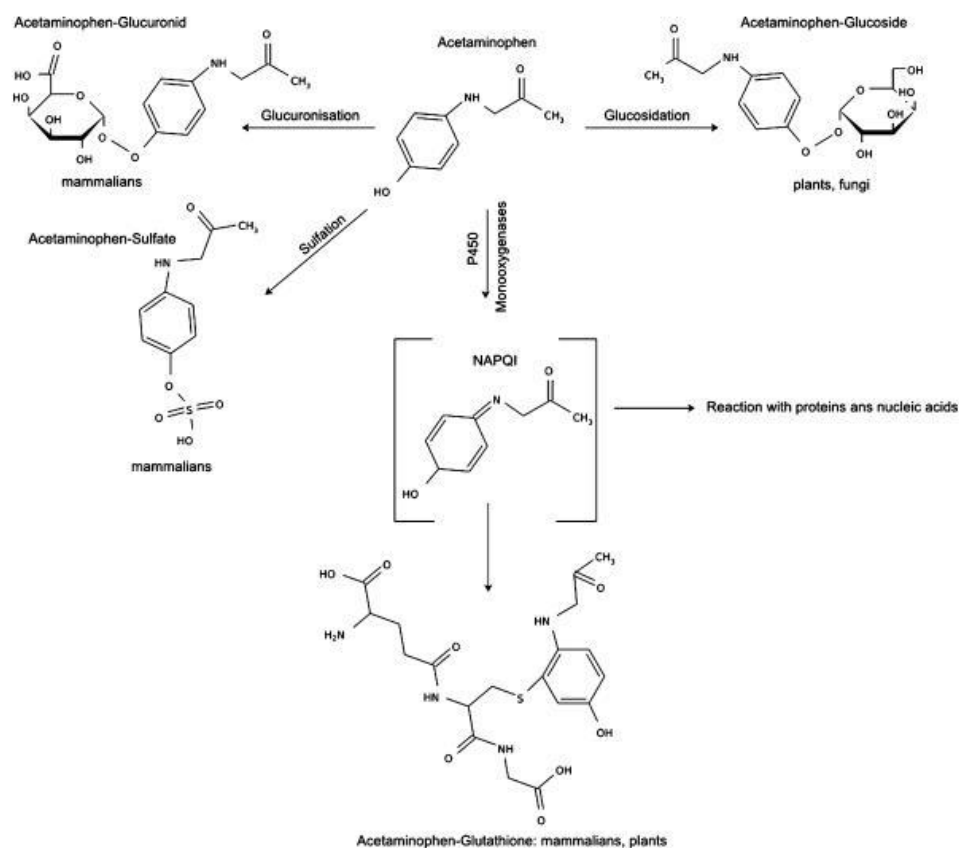
Antibiotikų vartojimas žmonių ir veterinariniuose vaistuose didėja dėl jų biologinės veiklos. Didelė dalis nemetabolizuotų antibiotikų patenka į aplinką, ypač antibiotikai, naudojami ūkiuose (Kolpin, 2002). Paviršiniame vandenyje ir geriamajame vandenyje pastebėtos skirtingų klasių antibiotikai (Benotti et al., 2009). Dėl galimo antibiotikų patekimo į vandens ekosistemą kyla rimtų susirūpinimą keliančių problemų, dėl jų plataus pasiskirstymo ir bioaktyviųjų savybių. Informacija apie ekotoksiškumą sukeliančius antibiotikus yra labai vertinga atliekant aplinkos rizikos vertinimą. Dumbliai vaidina svarbų vaidmenį visame vandens ekosistemos pirminiame sektoriuje. Todėl svarbu iširti galimą neigiamą antibiotikų poveikį dumbliams, kad būtų galima įvertinti jų riziką vandens aplinkai. Gėlavandenių žaliuojančių dumblių rūšis *Pseudokirchneriella subcapitata* yra naudojama siekiant įvertinti antibiotikų toksiškumą (Gonzalez-Pleiter et al., 2013). Ištyrus septynių fluorokvinolonų grupės antibiotikų, susijusių su vandens organizmais, toksiškumą, nustatyta, kad jautriausias organizmas buvo mesvabakterės (*Microcystis aeruginosa*), po jų eina plūdena (*Lemna minor*) ir žalieji dumbliai (*P. subcapitata*). Nebuvo pastebėta jokio vėžiagyvių (*Daphnia magna*) (Posthuma et al., 2002) esant koncentracijai, lygiai ar šalia 10 mg / l. Biologiniai tyrimai, atlikti su bakterijomis (*Vibrio fischeri*), dumbliais (*P. subcapitata*), verpetėmis (*Brachionus calyciflorus*), vėžiagyviais (*Thamnocephalus platyurus*) ir žuvimis zebrine danija (*Danio rerio*), rodo, kad dumbliai yra jautresnės rūšys, kurių toksiškumas (EC₅₀) yra nuo 0,002. mg / l iki 1,44 mg/l (Isidori et al., 2005). Nustatyta, kad triklozanui, junginiui, naudojamam mikrobų augimui slopinti, yra jautresni dumbliai nei aktyvuoto dumblo mikroorganizmai, bestuburiai ir žuvis (Orvos et al., 2002).

1.6. Paracetamolio poveikis vandens augalams

Medikamentai vandens terpėje pastaraisiais metais tapo vis svarbesne problema. Didėjanti visų paskirtų medikamentų dalis patenka į nuotekas ir valoma nuotekų valymo įrenginiuose. Dabartinė literatūra įrodo, kad dideliame kiekyje aktyviųjų junginių arba pirmųjų metabolitų galima aptikti visame pasaulyje, kai jų koncentracija yra nuo ng / l iki µg / l, net ir

geriausiose valymo sistemose (Kolpin et al., 2002; Schröder et al., 2007). Suprojektuoti kaip biologiškai aktyvūs junginiai, net ir mažiausia vaistų koncentracija gali turėti įtakos žmonių sveikatai arba vandens telkiniams, atsižvelgiant į lėtinio poveikio galimybę (Salomon, 2005). Vienas iš nuotekų vandens šalinimo liekanų yra užtvankų ir lagūnų, su įvairiomis augalų rūšimis arba vandens makrofitais, įrengimas (Schröder et al., 2007). Nors fitoterapija žinoma ir siūloma daugiau nei dešimtmetį, ji mažai naudojama ir iki šiol turima tik nedaug duomenų apie farmacinių medžiagų ekotoksikologinį poveikį, ypač apie jų poveikį augalams. Acetaminofenas (paracetamolis) yra plačiai paplitęs analgetikas, priešuždegiminis ir karščiavimą mažinantis vaistas žmonių medicinoje ir vienas iš galimų probleminių junginių vandens telkiniuose (Schulte Oehlmann et al., 2007). Remiantis Henschel ir kt. (1997) atliktais ekotoksikologiniais tyrimais su dumbliais, dafnijomis, žuvų embrionais ir bakterijomis paracetamolis klasifikuojamas kaip kenksmingas vandens organizmams pagal galiojančius Vokietijos įstatymus (Gefahrenstoffverordnung). Atsižvelgiant į jo cheminę struktūrą, tai yra benzeno žiedas, pakeistas hidroksilo grupe ir amido grupe. Savo dviejose aktyvinančiose grupėse benzeno žiedas labai reaguoja į elektrofilinį aromatinį pakaitalą. Žinduoliuose paracetamolis yra detoksikuojamas kepenyse, kur dėl mažų dozių sulfatacijos (sieros susidarymo) ir gliukononizacijos susidaro neaktyvūs, netoksiški sulfato ir gliukuronidų junginiai. Toksinis poveikis pasireiškia nurijus didelę vaisto koncentraciją. Tokiomis sąlygomis gali susidaryti N-acetil-p-benzochinoneiminas (NAPQI), reaktyvus metabolitas, sąveikaujantis su baltymais ir nukleorūgštimis (Bertolini et al., 2006). Šią reakciją katalizuoja glutathiono S-transferazės (GST), kurios pagreitina glutathiono konjugaciją ir tokiu būdu paprastai padeda apsaugoti ląstelę. Be dirbtinių substratų konjugacijos, GST dalyvauja antrinių metabolitų konjugacijoje ir metabolitų, kurie susidaro oksidacinio streso sąlygomis, detoksikacijoje (Edwards ir Dixon 2004). Gliukuronilo konjugatai yra viena ryškiausių žinduolių II fazės metabolitų grupių. Platus chemikalų asortimentas gali būti gliukurono rūgšties priėmėjai (akceptoriai), jei jie turi tinkamą funkcinę grupę. Uridino 5'-difosfo-gliukurono rūgštis (UDP- gliukurono rūgštis) veikia kaip reakcijos kosubstratas ir susidaro citozolyje. Be to, augaluose mažų molekulių glikozilimas glikoziltransferazėmis yra pagrindinis augalų ląstelių metabolinės homoeostazės mechanizmas. Galimos akceptorinės molekulės gali būti augalų hormonai (Hou et al., 2004), endogeniniai sintezuoti antriniai metabolitai (Richman et al., 2005), taip pat ksenobiotikai (Messner et al., 2003). Glikoziltransferazės, turėdamos daugybę funkcijų ir galimų substratų įvairovę, vaidina pagrindinį

vaidmenį slopindamos biologinių ar abiotinių vaistų poveikį augalui (Bowles et al.,2005). Šiuo tyrimu buvo siekiama palyginti acetaminofeno detoksikacijos mechanizmus žinduoliuose ir augaluose, ištyrus jo likimą ir metabolizmą valgomojo krienų *Armoracia rusticana L.* šaknų lstelėse kultūroje, ir pateikti rekomendacijas, kaip pašalinti vaistą iš nuotekų. *A. rusticana* šaknys yra lengvai apdorojamos, leidžia tiksliai dozuoti ir užtikrinti vienodą medžiagų pasiskirstymą visame audinyje. Panaudoti šią kultūrą patogiu nes medžiagų pernašos ir paskirstymo reiškiniai visame augale bus daug sudėtingesni ir reikalauja ypatingų diskusijų. Be to, atrodo, kad lapų metabolizmas labai skiriasi nuo šaknų metabolizmo.



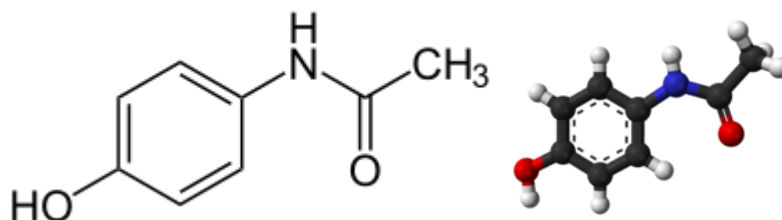
1.3 pav. Galimi acetaminofeno metabolizmo keliai

(https://www.helmholtzmuennen.de/fileadmin/AMP/PDF/amp_schroeder_2009_.pdf).

1.7. Paracetamolis

Paracetamolis šiuo metu yra vienas plačiausiai vartojamų be recepto visame pasaulyje prieinamų vaistų nuo priešūždegiminių ligų. Chemiškai paracetamolis susideda iš benzeno žiedo

šerdies, pakeistos viena hidroksilo grupe, ir amido grupės azoto atomo (1,4) *para* padėtyje (Bertolini et al., 2006).



1.4 pav. Paracetamolio formulės atvaizdavimas (<https://en.wikipedia.org/wiki/Paracetamol>).

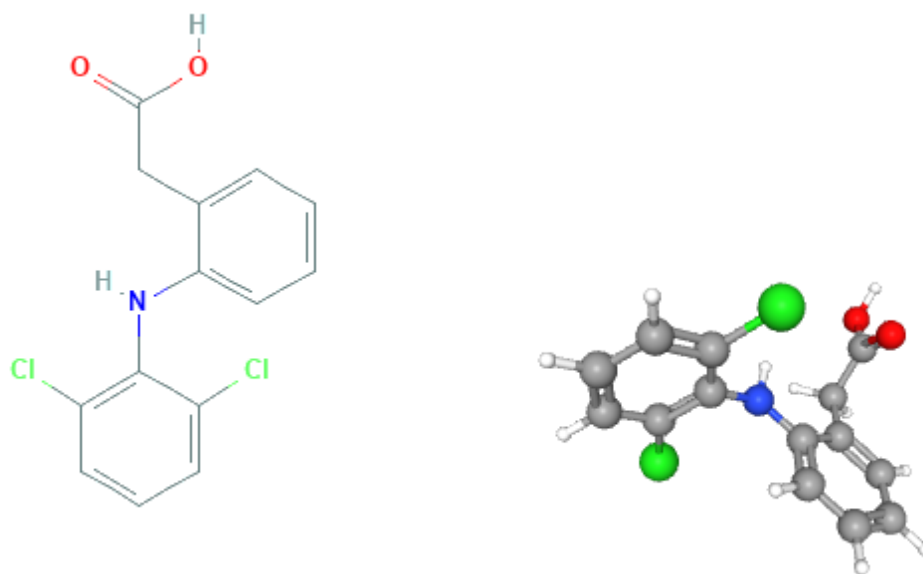
Paracetamolio cheminis pavadinimas yra *N*- (4-hidroksifenil) acetamidas. Jo molekulinė masė yra 151,16 g/mol. Pagal fizines savybes jis yra bekvapė kristalinė kieta medžiaga. Kartaus skoni. Jo lydimosi temperatūra 336-342°C. Jo tirpumas vandenyje esant 25 ° C yra 14000 mg/l. Gerai tirpsta alkoholyje; tirpus metanolyje, etanolyje, etileno dichloride, acetone, etilacetate. Šiek tiek tirpsta eteriye. Praktiškai netirpsta naftos eteriye, pentane, benzene.

Didžiojoje Britanijoje paracetamolis priskiriamas dažniausiai skiriamų vaistų trejetukui. JAV, kur paracetamolis yra vienas iš 200 dažniausiai vartojamų vaistų, jo suvartojimas 2001–2005 m. pasiekė apie 29 milijardus dozių. Paplitęs paracetamolio ir jo skilimo produkto (4-aminofenolio) atsiradimas aplinkoje taip pat iš dalies susijęs su jų naudojimu gaminant azodažiklius ir fotografines medžiagas (Huang et al., 2006). Chong ir kt. (2017 m) įvertino vartotojų vartojamus acetaminofeno įpročius ir pagal rezultatus dauguma vartotojų vartoja galvos skausmui, karščiavimui ir įprastam skausmui gydyti. Nepaisant to, kad paracetamolis laikomas paprastai saugiu, jis yra vienas iš labiausiai paplitusių vaistų, sukeliančių apsinuodijimą ir kepenų pažeidimus. Išgėrus paracetamolio dauguma kepenyse konjuguojamais fermentais šlapimo 5'-difosfoglukuronosiltransferazės ir sulfotransferazių (SULTI A1 ir SULTI A3) fermentai virsta netoksiškais junginiais, o po to išsiskiria per inkstus ir tulžį. Didžiausias kiekis rastas gamtoje buvo Europoje rasta 230 µg/l.

1.8. Diklofenakas

Diklofenakas yra dažniausiai naudojamas nesteroidinis priešuždegiminis vaistas (NVNU), vartojamas lėtinėms artrito formoms ir lengvam ar vidutiniam ūminiam skausmui gydyti. Diklofenako vartojimas pilnomis dozėmis dažnai siejamas su lengvu aminotransferazių

kiekio padidėjimu serume ir retais atvejais gali sukelti sunkią kliniškai akivaizdžią, ūminę ar lėtinę kepenų ligą.



1.5 pav. Diklofenako cheminės struktūros vaizdavimas (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofenac>).

Diklofenako cheminis pavadinimas yra 2- [2- (2,6-dichloranilino) fenil] acto rūgštis. Jo molekulinė masė yra 296,1 g/mol. Pagal fizines savybes jis yra kietos būsenos. Jo lydimosi temperatūra 283-285°C. Jo tirpumas vandenyje esant 25 °C yra 2,37 mg/l.

Diklofenakas yra skirtas gydyti skausmą ir uždegimą iš įvairių šaltinių, įskaitant uždegimines ligas, tokias kaip osteoartritas, reumatoidinis artritas ir akilozinis spondilitas, taip pat su traumomis susijusį uždegimą dėl operacijos ir fizinių traumų. Jis dažnai vartojamas kartu su misoprostoliu kaip skrandžio apsaugos agentas pacientams, kuriems yra didelė opų atsiradimo rizika.

Diklofenakas (DCF) yra viena iš medžiagų, kurios iki šiol dažniausiai aptinkamos vandens telkiniuose (Quinn, 2011), nes jos plačiai naudojamos ir neefektyviai šalinamos nuotekų valymo įrenginiuose (Ferrari et al., 2003). DCF koncentracijos jūrų, pakrančių ir žiočių vandenyse svyravo nuo kelių ng / l iki maždaug 1500 ng / l, o didžiausios DCF koncentracijos (virš 3000 ng / l) buvo nurodytos vietoje nuotekose, kuriose dominuoja Raudonosios jūros vandens. DCF taip pat yra gėluose vandenyse: kanaluose, ežeruose, upeliuose, upėse ir požeminiame vandenyje nuo 2,5 ng/l iki 57,16 µg/l (Cleuvers et al., 2004).

Vandens aplinkoje aptikta DCF koncentracija yra palyginti maža, tačiau vis daugiau įrodymų apie galimą neigiamą vaistų poveikį netiksliniams organizmams, veikiantiems mažomis vaistų dozėmis (Ferrari et al., 2003). Nepaisant to, kad DCF koncentracijos nustatytos *in situ*(aplinkos) tyrimai yra maži, laboratoriniuose tyrimuose naudojama koncentracija paprastai yra didesnė ir atspindi efektyvias cheminio junginio koncentracijas. Norint gauti išsamų grėsmės vaizdą ir suprasti cheminės medžiagos toksiško veikimo mechanizmą, būtina nustatyti pastebimą toksišką cheminio junginio poveikį tiriamiems organizmams. Kadangi DCF paprastai naudojamas žmonėms ir gyvūnams gydyti, jo poveikis žinduolių ląstelėms yra gerai žinomas - DCF slopina vieną ar abi ciklooksigenazės izoformas (COX-1 ir COX-2).

Žinios apie ciklooksigenazes augalų ląstelėse yra ribotos, tačiau jų buvimas mikrodumbliuose patvirtintas. Be to, keli tyrimai parodė slopinamąjį DCF poveikį augalų ir dumblių augimui (Cleavers, 2003, Cleavers, 2004, DeLorenzo ir Fleming, 2008). Remiantis ankstesniais tyrimais, DCF fitotoksiškumas skiriasi nuo augalų rūšių ir toksinio junginio: pranešta apie augalų augimo ir vystymosi sutrikimus *Zea mays*, antioksidacinių fermentų lygio ir aktyvumo pokyčius - *Typha latifolia* ir *Medicago sativa*, paparčio *Azolla filiculoides* ir kerpės *Xanthoria parietina* sugadinta fotosintezės sistema, fotosintezės efektyvumas ir chlorofilo kiekis sumažėjo *Lemna minor* ir *Phaseolus vulgaris*. Fotosintezė sutrikdymas, taip pat buvo pranešta apie DCF apdorotą žalieji dumbliai *valkčiadumblis reinhardtii*, tinkamas bandomasis organizmas įvertinti farmacijos poveikį gėlo vandens ekosistemoms (DeLorenzo ir Fleming, 2008). Didžiausias kiekis rastas gamtoje buvo Europoje rasta 19 µg/l.

1.9. Ibuprofenas

Ibuprofenas yra propiono rūgšties darinys ir nesteroidinis priešuždegiminis vaistas, turintis priešuždegiminį, skausmą malšinantį ir karščiavimą mažinantį poveikį. Ibuprofenas slopina I ir II ciklooksigenazės aktyvumą.

Ibuprofeno cheminis pavadinimas yra 2- [4- (2-metilpropil) fenil] propano rūgštis. Jo molekulinė masė yra 206,28 g / mol. Pagal fizines savybes jis yra bespalvė, kristališkai stabili kieta medžiaga turinti kvapą. Ydimosi temperatūra 75–77,5 ° C, o virimo 157° C. Tirpumas vandenyje 21 mg / l (esant 25 ° C). Lengvai ištirpinamas daugelyje organinių tirpiklių. Gerai tirpsta alkoholyje. Ibuprofenas yra trečias pagal populiarumą, daugiausiai skiriamas ir

parduodamas nereceptinis vaistas pasaulyje (Marchlewicz et al., 2015). Tai vienas iš vaistų, išvardytų Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) 2010 m. Pagrindinių vaistų sąraše. Ibuprofeno toksiškumas ir koncentracija nuotekų valymo įrenginiuose ir vandens telkiniuose didėja kiekvieną dieną dėl padidėjusio vartojimo lygio. Tai gali sukelti pavojingą poveikį aplinkai dėl savo bioaktyvaus pobūdžio. Tai atsiranda visur vandens telkiniuose, nes jo negalima veiksmingai pašalinti taikant įprastus vandens valymo metodus. Pastaraisiais metais jo suvartojimas padidėjo, kaip pranešama daugelyje Europos Sąjungos (ES) šalių (Parolini et al., 2011). Gydomosios ibuprofeno dozės yra nuo 600 iki 1200 mg per parą. Geriamoji ibuprofeno dozė visiškai susijungia (~ 99%) su plazmos albuminu ir beveik 15% jos išsiskiria nepakitusios molekulės pavidalu (konjuguota su gliukuronidu ir tiolu) ir jo metabolitais, tokiais kaip karboksiibuprofenas, hidroksiibuprofenas ir karboksihidratropo rūgštis . Konjugatai toliau hidrolizuojami aplinkoje (Marchlewicz et al., 2015). Nors nuotekų valymo įrenginiuose ir nuotekose yra metabolitų, tokių kaip 4-izobutirenzbenzaldehydas, 1- (4-izobutilfenil) -1-etanolis, 2- [4- (1-hidroksiizobutil) fenil] propiono rūgštis, 4-etilfenolis, 4- etilbenzaldehydas ir 1- etil-4- (1-hidroksi) izobutilbenzenas. Šiuo metu įvairiuose pasaulio kraštuose atlikti tyrimai naudojant metodus, tokius kaip biosensoriai, įskaitant fermentinius biosensorius, mikrobu biosensorius ir imuninius jutiklius ir kt. Paviršiaus plazminio rezonanso (SPR) pagrindų metodai tampa perspektyviu metodu analizuoti įvairių koncentracijų atsirandančius teršalus įvairiuose vandens telkiniuose dėl geresnio jų efektyvumo stebėjimo realiuoju laiku ir ekonominės naudos. Šie metodai atkreipia aplinkosaugininkų dėmesį į farmacijos ir asmeninės priežiūros produktus (PPCP), kurie yra EOC subkategorija. PPCP yra bioaktyvaus pobūdžio ir jų buvimas padarė didžiulę žalą vandens kokybei ir neigiamą poveikį gyvybei. Trečias pasaulyje vartojamas vaistas ibuprofenas yra nesteroidiniai vaistai nuo uždegimo, aptikti daugelyje vandens telkinių (Huang, 2018). Huang ir kt. (2018) studijavo 26 PPCP vaistų ekotoksikologiją Ispanijos vandens sistemose ir įvertino jų riziką aplinkai. Jie pranešė, kad ciprofloksacinas, acetaminofenas, klofibratas, ibuprofenas, klaritromicinas, triklozanas, parabenai, omeprazolas ir 1,4-benzochinonas kelia tam tikrą riziką vandens aplinkai. Šioje apžvalgoje bandoma įvairiais metodais naudoti dabartinius metodus šalinant ibuprofeną. Analitinių metodų naudojimas taip pat aptartas pašalinant ibuprofeną, esantį aplinkos šaltiniuose. Didžiausias kiekis rastas gamtoje buvo Europoje rasta 303 µg/l.

1.10. Tarpląstelinis membranų potencialas

Daugelį metų išorinių elektrodų uždėjimas ant augalų ir gyvūnų organų paviršiaus buvo vienintelis galimas potencialo matavimo būdas. Vienintelis būdas nustatyti vidinį ląstelių potencialą buvo išmatuoti „žaidos potencialą“ (wound potentials). Užuoat pasikliaujant tokiais netiesioginiais metodais, membranų teorija (Sandermann 1994) paskatino tiesiogiai įvertinti ląstelių membranų potencialo vertę. Tai padaryti palengvino mikroelektrodų įvedimas (KCl užpildytos stiklinės mikropipetės, kurių antgalio skersmuo yra pakankamai mažas, kad būtų galima įstatyti į gyvas ląsteles;), kad būtų užfiksuoti tarpląsteliniai, t.y., realūs membranos potencialai (V_m). Šis metodas pirmą kartą buvo pritaikytas milžiniškoms ląstelėms iš tokių galvakojų, kaip *Loligo* ir *Sepia* (Sandermann 1994), ir charofitinių dumblių, tokių kaip *Chara* ir *Nitella*, aksonų. Ankstyvieji bandymai įterpti mikroelektrodus į charofitines ląsteles padarė ilgalaikę žalą ir davė labai žemos V_m reikšmės parodymus, apie -30 mV (Hedrich, 2012). Patobulėjus technologijai, stiklinių adatų atsiradimas, inkubacijos procedūros ir mikromanipulatoriai paskatino greitą rezultatą (t. y. per 1–4 minutes) pradinėje stadijoje, depoliarizuotų *Nitella* ląstelių V_m sugrąžinti į vertes, tarp -100 ir -170 mV (Umrath, 1930; Osterhout, 1936). Neskaitant pirmųjų V_m verčių augalų ląstelėse matavimų patekčių, Umrath ir Osterhout darbai rodo ir pirmuosius tarpląstelinius augalų AP aprašymus. Kai 1940 m. ši nauja technika buvo papildyta tiksliais elektroniniais stiprintuvais ir įtampos gnybtų grandinėmis, ji leido matuoti jonų sroves, o ne įtampas, ir kartu stebėti joninių kanalų aktyvumą. Protingas šių metodų pritaikymas leido gauti naują, labai išsamų supratimą apie jonų rūšis ir mechanizmus, susijusius su V_m pokyčiais, ypač AP (Yan et al., 2009). Dabar buvo galima pastebėti, kad depoliarizacija AP metu peržengė nulį ir buvo nukreipta į teigiamų įtampų diapazoną, tai rodo, kad AP generavimo metu be K^+ turi dalyvauti ir kiti jonai. Įtampos fiksavimas (voltage clamp) buvo įvestas siekiant išsiaiškinti įvairias jonų sroves, dalyvaujančias sklindant AP, nervų ląstelėse (Hedrich, 2012), taip pat *Chara* ląstelėse (Lunevsky et al., 1983). Nors gyvūnų nervų ląstelių depoliarizacijos smailę lemia padidėjęs Na^+ jonų antplūdis, buvo nustatyta, kad augalų AP yra Ca^{2+} ir (arba) Cl^- jonų nutekėjimas (Yan et al., 2009). Šiai dienai charofitiniai dumbliai yra svarbūs modeliai ir atspirties taškai aukštesnių augalų ląstelių tyrimams.

1.11. Augalų veikimo potencialai

Pirmasis žinomas augalo AP aprašymas ant musėkauto (*Dionea muscipula* Ellis) lapų 1873 m. padarytas medicinos fiziologo sero Sandermann Anglijoje. Eksperimentą organizavo C. Darvinas, kuris apibūdino *Dionea* kaip „gyvūniškiausią augalą“, kuris parodė analogiją su gyvūno nervo refleksu. Sandermann išmatavo įtampos skirtumą tarp *Dionea* lapo pusės adaksialinio ir abaksialinio paviršiaus, kai tuo tarpu stimuliuoja kitą pusę mechaniškai paliesdamas plaukus (Sandermann, 1994). Nuo to laiko gaudyklių uždarymas *Dionea* buvo laikomas pavyzdžiu, parodančiu panašų AP vaidmenį augaluose ir gyvūnų nervų bei raumenų preparatuose. Mokslininkas pateikdamas pirmąją konsoliduotą augalų elektrofiziologijos monografiją, padarė išvadą, kad AP nebuvo įrodytas tiesioginis ryšys su uždarymo judėjimu ir, kad AP atsirado prieš ir po žiotelių uždarymo, atrodo. Tačiau pažymėjo, kad ramybės būsenoje *Dionea*, viršutinė lapo pusė yra teigiamo krūvio, palyginti su apatine, tačiau šis ryšys yra apverčiamas stimuliuojant.

Būtent dėl šios priežasties Ricca (1916) ir Snow (1924) pasiūlė alternatyvų mechanizmą, pagal kurį sužadinimo medžiaga išleidžianti į ksilemą (xylem) ir sklisdama transpiracijos būdu tampa pagrindine skleidžiamo sužadinimo priežastimi. Įtikinamiausias cheminės medžiagos eksperimentas buvo perpjauti mimozos kamieną ir vėl sujungti du gabalus su vandeniu užpildytu vamzdeliu. Lapų, sujungtų su apatine stiebo dalimi, viršutinėje šakoje dažnai sukėlė sužadinimo reakciją. Tačiau dažnai pamirštama, kad kiti tyrėjai negalėjo patvirtinti šių rezultatų. Stebėdamas ir lapelių judėjimą, ir elektrinius signalus, Bose'as (1928) pagaliau pasiūlė, kad vandens apytakos indai veiktų analogiškai nervams, leisdami skleisti sužadinimą, kuris judėjo iš ląstelės į ląstelę.

Nepaisydamas Haberlandto ir Bose'o rezultatų, Houwinckas (1935) pasiūlė, kad pažaizdų (wound) sužadinimas Mimosoje gali būti išplėstas cheminiu pažaizdų signalu (vadinamu Ricca koeficientu) ksilemoje, kuris vėliau galėtų būti paverstas AP tarpininkaujant naujo tipo elektriniam signalui, kurį jis pavadino variacijos potencialu. Negalima nepastebėti, kad cheminės medžiagos pavertimas elektriniu signalu yra procesas, turintis ryškių paralelių su gyvūnų sinapsiniais reiškiniais. Houwincko idėja apeidavo esamus ginčus įtraukdama cheminius ir elektrinius signalus į sužadinimo signalo perdavimo mechanizmą mimosoje. Nepaisant Houwincko diplomatinio pasiūlymo, iki šiol išlieka ginčas tarp cheminio ir elektrinio sklidimo.

Nuajausiais tyrimais yra pripažinta, kad sužeidimas sukelia didelį ir sklindantį slėgio padidėjimą pažeistos vietoje. Šie pažeistos sukelti ksilemo slėgio padidėjimai gali ne tik laikinai pakeisti ksilemo srauto kryptį, bet ir lėtam bangos potencialui sukelti didelę depoliarizaciją. Atitinkamai nustatyta, kad Haberlandto (1914) pasiūlytas elektrodinaminių signalų sklidimas vyksta rečiau nei ksilemoje, kur jis yra pagrindinis sklidimo mechanizmas. sklindančio signalo, vadinamo lėtų bangų potencialu, (Stahlberg et al., 2006).

Daugybė naujausių tyrimų su mimozą ir kitomis augalų rūšimis patvirtino Haberlandto pasiūlymą, kad sužadavimo kelias yra floema. Tyrimuose nustatyta, kad į AP panašūs signalai plinta vienoda sparta ir amplitudė per visas kraujagyslių pluošto ląsteles. Bose (1928) žengė vieną didžiulį žingsnį į priekį, kai pradėjo tyrimus su atskirais kraujagyslių pluoštais (pvz., Paparčio *Adiantum*). Palyginęs amplitudę, jis nustatė, kad izoliuotų kraujagyslių pluoštų atsakas į šilumą yra daug stipresnis nei į nepažeistą kamieną. Bosas rado įdomių rezultatų seriją; tarp jų padidinta šilumos sukeltų smaigalių amplitudė kartojant stimuliaciją (tetanizavimą) ir pluošto inkubavimą 0,5% natrio karbonato ir kitų druskų tirpale. Ši drąsų progresą dar reikia pakartoti ir patvirtinti kitose laboratorijose. Kadangi užfiksuotas izoliuotų kraujagyslių sruogų elgesys buvo panašus į izoliuotų varlių nervų elgesį, Bose jautėsi pagrįsta galintis juos vadinti augalų nervais.

1.12. Elektrinių signalų sklidimas augaluose

Visi augalai generuoja tolimus elektrinius signalus, ir šie signalai naudojami ryšiams palaikyti ir atsakams integruoti skirtinguose audiniuose ir organuose. Labiausiai ištirti elektriniai signalai žemesniuose augaluose, pvz., *Characeae*, ir aukštesniuose „jautriuose“ augaluose, tokiuose kaip *Mimosa pudica* ar *Dionaea muscipula*. Tačiau „paprastuose“ augaluose taip pat aprašyti įvairūs elektriniai reiškiniai..

Išorinio dirgiklio sukelti elektriniai signalai skiriasi savo erdviu ir laiko modeliu, aktyvacijos mechanizmu ir sukeltomis reakcijomis. Pirma, vietinis elektrinis potencialas (LEP) yra ribinis atsakas, kurį sukelia aplinkos veiksniai (pvz., šviesa, šaltis, vandens būklės pokyčiai, fitohormonai, patogenų infekcija). LEP neperduodamas į kitas augalo dalis, tačiau turi įtakos vietinei fiziologinei ląstelės būklei (Yan et al., 2009). Antra, veiksmo potencialas (AP) yra greitas „viskas arba nieko“ signalas, lokaliai generuojamas ląstelėje po apdorojimo įvairiais dirgikliais (šviesa / tamsa, elektrinė stimuliacija, šaltis, mechaninis dirgiklis), su sąlyga, kad stimulus pasiekia tam tikrą ribą. AP sklidimo mechanizmas apima membranos depoliarizaciją ir

vėlesnę repoliarizaciją, priklausančią nuo pasyvių Ca^{2+} , Cl^- ir K^+ jonų srautų. Nuo potencialo priklausomo Ca^{2+} aktyvinimas kanalas yra tikriausiai pirmasis AP kartos etapas. AP plinta į tolimus organus neprarandant amplitudės ir sukelia sisteminį atsaką, susijusį su laikiniais dujų mainų pokyčiais, anglies pasisavinimo procesu, kvėpavimo dažniu ir specifinių genų ekspresija. Perduodamo signalo informacija gali būti užkoduota vieno AP forma, nustatoma pagal santykinį joninio laidumo indėlį; AP amplitudė (10–80 mV diapazone); (Hedrich, 2012). Trečia, variacijos potencialas (VP), dar vadinamas elektropotencialine banga, yra lėtas signalas, kurį sukelia vietiniai žalingi stimulai (sužeidimas, kaitinimas, deginimas). VP signalai taip pat susideda iš trumpalaikių membranos potencialo pokyčių, tačiau jie yra netaisyklingos formos ir ilgesnės trukmės (repoliarizacijos vėluoja). VP amplitudė priklauso nuo dirgiklio tipo ir intensyvumo. Pasyvus Ca^{2+} antplūdžio ir Cl^- kanalo aktyvavimo, taip pat buvo manoma, turi būti įtraukti į VP kartos. Tikėtina, kad įjungus kalcio kanalus, kurie priklauso nuo ligando (cheminis mechanizmas) arba jautrūs mechanikai (hidraulinis mechanizmas), Ca^{2+} antplūdis, kuris savo ruožtu sukelia ir H^+ ATPazės inaktyvaciją, ir anijonų kanalo aktyvaciją. Todėl VP sklidimo parametrus gali kontroliuoti hidraulinės bangos ar cheminiai veiksniai. Sistemiškai perduodamas kitiems augalo organams, VP daro įtaką elektronų per II fotosistemą kiekybiniam derliui, grynajam CO_2 pasisavinimo greičiui, kvėpavimui, jazminų rūgšties koncentracijai, etileno emisijai, genų ekspresijai ir baltymų sintezei. Atrodo, kad VP kartu turi daugiau informacijos nei AP (Vodeneev et al., 2016). Ketvirta, sistemos potencialas (SP) yra savaimė plintantis sisteminis signalas, kurį perduoda apoplastiniai jonai ir plazmos membrana H^+ -ATPazė. Pradinis šių nuo įtampos priklausančio signalo poliškumas yra hiperpolarizacija. Priešingai nei veikimo ar variacijos potencialuose, prasidėjus įtampos pokyčiams visi jonai (Ca^{2+} , K^+ , H^+ ir Cl^-) dalyvauja SP sklidime. SP nepaklūsta „viskas arba niekas“ taisyklei, bet priklauso nuo pirminio dirgiklio intensyvumo ir pobūdžio (Zimmermann et al., 2009).

Priklausomai nuo dirgiklio tipo ir augalų rūšių, elektriniai signalai skirtingais greičiais perduodami į tolimus audinius ir organus. Apskaičiuota, kad žaliųjų dumblių ir aukštesnių augalų AP greitis svyruoja nuo 4–8 iki 70 mm s^{-1} , o sumedėjusiuose augaluose - net iki 400 mm s^{-1} (Fromm ir Lautner, 2007).

Elektrinis signalo perdavimas gyvojoje sistemoje vaidina pagrindinį funkcinį vaidmenį, nes jis sukelia sisteminės reakcijos nepaveiktame audinyje, kad apsaugotų ar apgintų visą augalą

nuo antro to paties ar glaudžiai susijusio streso. Tai, kad panašūs elektriniai signalai pasirodo kaip atsakas į daugelį skirtingų dirgiklių, rodo, kad šių bangų erdvinėje ir laikinoje dinamikoje yra užkoduoti stimului būdingi signalai. Tačiau jie gali veikti kaip pradiniai, pirminiai signalai, paruošiantys augalą selektyviau reaguoti į paskesnius, konkrečiai dirgikliui būdingus signalus (Kim et al., 2007).

1.13. Elektros signalų matavimo technikos augaluose

Apskritai elektriniams potencialams augaluose matuoti naudojami du skirtingi metodai, tarpląstelinis ir viduląstelinis įrašymas. Tarpląstelinio potencialo matavimai aukštesnių augalų paviršiuje anksčiau buvo plačiai atliekami, ir jų pranašumas yra tas, kad ilgą laiką (kelias dienas) galima nustatyti elektrinių potencialų skirtumus. Priešingai, viduląsteliniai matavimai su prasiskverbiančiais stiklo mikroelektrodais yra veiksmingi tik trumpą laiką, pavyzdžiui, 1–2 val., nes dalis elektrodo viduje esančio elektrolito paprastai pasklinda matuojamoje ląstelėje ir keičia savo pradinę bioelektrinę būklę. Tačiau tarpląstelinio įrašymo pranašumas yra tikslesnis, nes membranos potencialą ir elektrinius signalus galima išskaičiuoti iš konkrečių ląstelių.

1.13.1. Tarpląstelinis įrašymas

Tarpląsteliniai matavimai yra gerai žinomi iš gyvūnų elektrofiziologijos ir yra pagrįsti bendro bioelektrinio aktyvumo didelėse ląstelių grupėse matavimais. Pavyzdžiui, medicinos praktikoje plačiai naudojamos elektrokardiogramos (EKG) ir elektroencefalogramos (EEG). Aukštesniuose augaluose galima atlikti dviejų tipų tarpląstelinių potencialų matavimus, paviršiaus įrašus ir matavimus naudojant įdėtus metalinius elektrodus. Pastarasis metodas sukelia žaizdos reakcijas įterpiant elektrodą, todėl elektrodai turi būti sudaryti iš plonų metalinių laidų (pvz., Ag / AgCl-vielos, kurių skersmuo 0,4–1,0 mm). Įkišus į ūglį ar lapų gyslas, elektrodai liečiasi su audiniu, įkūnijančiu didesnes ląstelių grupes. Pavyzdžiui sojų augaluose, kurie perduoda elektrocheminius signalus, kuriuos sukelia mėlyna šviesa. Kita vertus, paviršiaus matavimai atrodo geriau, nes jie yra neinvaziniai ir fiziškai stabilūs; jie taip pat gali būti atliekami kartu su kitais fiziologiniais metodais, tokiais kaip dujų mainų registravimas. Tokie elektrodai paprastai susideda iš Ag / AgCl vielos, sudrėkintos 0,1% (m / V) KCl ir suvyniotos į medvilnę, kad būtų užtikrintas tinkamas sąlytis su augalo paviršiumi, arba iš Ag / AgCl granulių elektrodų, kuriuos galima prijungti prie augalo paviršiaus laidžiu vandeniniu geliu, kurio tipas paprastai naudojamas EKG. Identiškas elektrodas gali būti dedamas ant augalo distalinės srities

arba dirvožemyje, kad būtų kaip atskaitos elektrodas. Kai visi kanalai rodo stabilizuotą potencialą, augalą galima stimuliuoti elektra viršūnėje (pvz., 3 V 2 s) arba kitais dirgikliais (liepsnojantis, šaltas šokas), pritaikytu lapui. Paprastai elektrinius atsakus į viršūninį dirgiklį gali parodyti visi elektrodai, nuo augalo viršaus iki apačios, nurodant, kad elektrinis signalas perduodamas visame augale. Pavyzdžiui, panaši eksperimentinė sudėtis saulėgražose buvo naudojama analizuojant AP ir VP charakteristikas (Stankovic et al., 1998).

2. Darbo metodika

2.1 Tyrimo objektas

Ekspirimentų metu buvo naudojamas menturdumblis žvaigždėtasis maurašakis (*Nitellopsis obtusa*)

Tyrimuose naudoti dumbliai buvo renkami Obelijos ežere, Lazdijų rajone rugsėjo ir gruodžio mėnesiais. Iš ežero dumbliai buvo ištraukiami metaliniu kabliu (augavietės 2 – 4 m gylyje). Sudėti į plastikinius konteinerius ir užpilti ežero vandeniu gabenami į laboratoriją. Laboratorijoje buvo pašalinamos rizoidinės ir negyvos ląstelės. Sukarpyti menturdumbliai buvo laikomi plastikiniuose konteineriuose, pripildytuose kambario temperatūros vandentiekio vandens ir dirbtinio tvenkinio vandens APW (1:1) mišinyje. Terpė buvo keičiama kas mėnesį. Menturdumbliai buvo laikomi vėsioje patalpoje.

2.2. Medžiagos ir tirpalai

Ekspirimentuose buvo naudojama šios sudėties mitybinė (kontrolinė) terpė APW (artificial pond water – dirbtinis tvenkinio vanduo): $1 \cdot 10^{-3}$ M CaCl_2 , $1 \cdot 10^{-3}$ M NaCl, $1 \cdot 10^{-3}$ M KCl, $1 \cdot 10^{-3}$ M HEPES, pH7,5. Tirpalo pH (pH vertė koreguojama 0,1 M HCl ar 1,0M NaOH tirpalais). Ši terpė buvo naudojama reikiamos koncentracijos tiriamųjų tirpalų ruošimui skiedimo būdu.

Tyrimams buvo naudojamas „AS Grindeks“ (Latvija) gamintojo „Ibuprom“ tabletės su 400 mg ibuprofeno veikliosios medžiagos, „Solutas Pharma GmbH“ (Vokietija; Sandoz, Slovenija) gamintojo „Diclac“ tabletės su 100 mg diklofenako veikliosios medžiagos. Paracetamolio tirpalui buvo naudojama „AS Grindex“ gamintojo „Paracetamol-grindex“ 500 mg paracetamolio veikliosios medžiagos tabletės.

Mirtingumo tyrimams buvo naudojami ibuprofeno 1 mg/l, 10 mg/l, 100 mg/l, 1000 mg/l koncentracijos tirpalai. Letalumo ir elektrofiziologiniams tyrimams koncentruoti diklofenako (1000 ir 1250 mg/l) ir paracetamolio (2000 mg/l) tirpalai paruošti vaisto tabletes ištirpinant kontrolinėje APW terpėje. Diklofenako ir paracetamolio tirpumui pagerinti pridėta 1% (v/v) etanolio.

2.3. Letalumo tyrimai

Menturdumplių letalumo tyrimo tikslas - nustatyti toksikanto koncentracijas, kurioms esant žūsta 50% ląstelių ir kaip mirtingumas kinta priklausomai nuo poveikio trukmės. Šios

ląstelės gali būti stebimos iki mėnesio laiko ir ilgiau, jei ląstelių mirtingumas kontrolėje neviršija 10%.

Testas atliekamas sudedant tarpubamblines 5-15 cm ilgio ląsteles į Petri lėkšteles po 10 vienetų kiekvienoje. Kiekvienai medžiagos koncentracijai imta po 20-30 ląstelių, t.y. 2-3 nepriklausomi pakartojimai. Prieš eksperimentą (ne mažiau kaip dvi dienos), ląstelės perkeliama į Petri lėkšteles, užpilamos grynu APWT ir paliekamos adaptuotis. Po adaptacijos patikrinama ar visos ląstelės gyvos (jei yra negyvų jos pakeičiamos) ir į Petri lėkšteles pilama po 50ml tiriamų tirpalų. Ne rečiau kaip kas keturias dienas buvo patikrinama kiek ląstelių žuvo. Apie ląstelės žuvimą sprendžiama iš turgoro praradimo: pakėlus mentele ląstelę, ji subliūkšta. Po keturių ir šešiolikos dienų buvo keičiami tirpalai. Gavus duomenis ir apskaičiavus mirusių ląstelių skaičių procentais brėžiama koncentracijos–atsako kreivė. LC50 – toksikanto koncentracija, sukianti 50% ląstelių žūtį, jos reikšmės gautos taikant logistinę aproksimaciją [$y = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/xo)^p)$, kur $A1=0\%$; $A2=100\%$].

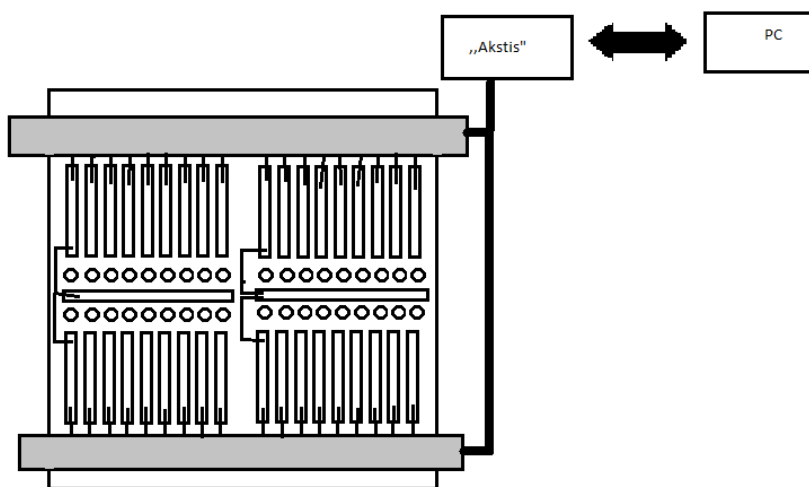


2.1 pav. Petri lėkštelės su *N. obtusa* ląstelėmis paruoštos mirtingumo testui atlikti.

2.4. Elektrofiziologiniai matavimai

Elektrofiziologinis tyrimas buvo atliekamas kambario temperatūroje, esant nuolatiniam išsklaidytam apšvietimui. Testavimo kamera pagaminta iš organinio stiklo. Jos viršutinė dalis buvo suskirstyta į keturias vienodas segmentines dalis. Kiekviena segmentinė dalis dar suskirstyta į aštuonias geldeles. Dar kiekviena geldelė turi savo izoliacinį tarpą užpildytą vazelinu. Du vienas prieš kitą esantys segmentai turi bendrą griovelį užpildytą KCl. Kiekvienoje geldelės viršutinėje dalyje yra elektrodas. Elektrinis ryšys tarp geldelės ir bendro centrinio

griovelio palaikomas Π -formos tiltelio (stiklinio vamzdelio, užpildyto 3% agaro ir 3 M KCl tirpalo) pagalba. Vienas tiltelio galas talpinamas KCl užpildytame griovelyje, o kitas į referentinę geldelę. Menturdumblių elektriniai signalai stiprinami ir perduodami per išorinę sąsają „Aktis“ į kompiuterį. Kompiuterio ekrane parodomas kreivės. Kompiuterio programos „Viewer“ dėka galima stebėti ląstelių elektrofiziologinių reakcijų pokyčius realiu laiku arba įrašytus duomenis peržiūrėti ir analizuoti po atlikto bandymo. Galima stebėti ne tik visų ląstelių pokyčius bet ir kiekvieną grupę ir ląstelę atkirai.



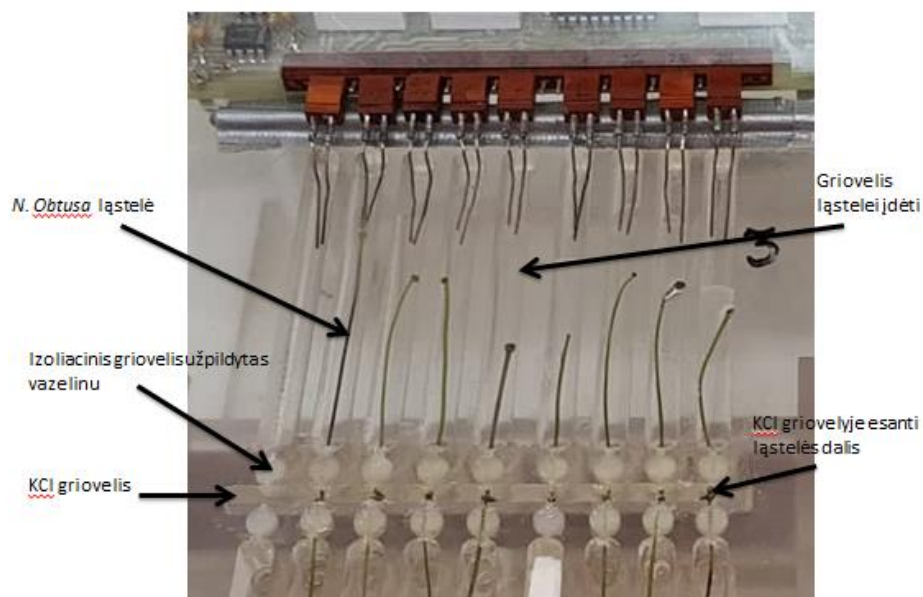
2.2 pav. Bendras elektrofiziologinės kameros vaizdas.

Prieš paveikiant ląsteles paruoštu tirpalu, jos matavimo kameroje 1,5 val. yra adaptuojamos APW kontroliniame tirpale, kol nusistovi ląstelių ramybės potencialo vidutinė reikšmė. Ląsteles užpylus tiriamuoju tirpalu jos būna 1,5 val., po to vėl užpilamas kontrolinis tirpalas ir stebima kaip ir į kokią artimą pirminei būseną grįžta ląstelės. Keičiant tirpalus geldelės praplaunamos kontroliniu tirpalu, kad pasišalintų prieš tai buvusios medžiagos likučiai.

2.4.1. Elektrofiziologinio tyrimo eiga

Pirmiausia darbui yra paruošiama kamera. Visiškai yra pašalinamas anksčiau buvęs vazelinas izoliaciniuose grioveliuose, kad nebūtų likusių ankstesnio tyrimo medžiagų ar ląstelių likučių. Kai grioveliai švarus imamas naujas vazelinas ir izoliacinis grioveliai juo užpildomi. Dedamos ląstelės į kamerą. Nusausintas ląstelės galas dedamas taip, kad bambliukas ir dalis ląstelės būtų KCl griovelyje. Nusausinimas reikalingas, kad gerai izoliuotų ląstelę ir KCl bei užpiltas tirpalas ant ląstelių nususijungtų. Pirmas griovelis kaip referentinis paliekamas tuščias be ląstelės ir užpildomas tik tiriamąja medžiaga. . Ant ląstelių užpilamas APW tirpalas. Taip

užpildomi visi keturi segmentai su ląstelėmis. Tada sudedami II formos stikliniai tilteliai. Vienas galas yra imerkiamas į KCl griovelį, o kitas į pirmąjį griovelį. Ir centrinis griovelis užpildomas 100 mM KCl ir APW tirpalu. Kamera prijungiama prie kompiuterio ir paliekama 1,5 – 2 valandas adaptuotis. Kai potencialų vidurkiai nusistovi užpilama ant ląstelių pasirinkta medžiagos koncentracija. Ląstelės paliekamos 90 minučių. Po 90 minučių grįžtama prie ląstelių ir jos yra atplaunamos su APW tirpalu du kartus kas 45 minutes. Baigus tyrimą programa išjungžiama, kamera atjungžiama nuo kompiuterio, išleidžiami tirpalai, išimamos ląstelės ir vazelinai. Kamera paliekama kitam tyrimui.



2.3 pav. Elektrofiziologinės kamera.

3. Rezultatai

3.1. Diklofenako, ibuprofeno ir paracetamolio toksikologinių duomenų metaanalizė

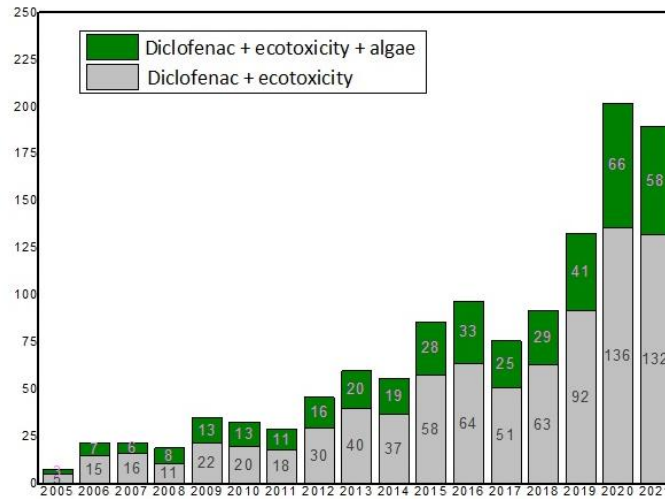
Per pastaruosius 15 metų farmacinėms medžiagoms kaip galimoms bioaktyvioms cheminėms taršioms medžiagoms aplinkojeskiriamas vis didesnis dėmesys. Jų gausa vandens telkiniuose nėra reguliuojama arba šiuo metu vyksta jų reglamentavimo procesas.

Vieną pirmųjų tyrimų, įrodančių farmacinių junginių buvimą paviršiniuose vandenyse, paskelbė Kolpin ir kt. (2002), kurie 1999 ir 2000 m. vandens mėginiuose iš 139 JAV upių tinklo 30 valstijų aptiko iki 95 farmacijos produktų, hormonų ir kitų organinių teršalų, įskaitant priešūždegiminį vaistą buprofeną (IB). Nuo to laiko buvo paskelbta vis daugiau pranešimų apie padidėjusį farmacinių medžiagų likučių kiekį esant koncentracijoms ng-μg /L (Kolpin et al., 2002) Nors jų yra gana mažomis koncentracijomis, farmaciniai junginiai yra bioaktyvios molekulės, specialiai sukurtos tam tikrai funkcijai vykdyti, kurią jos ir toliau atlieka išleistos į nutekamuosius vandenį, todėl ir labai nedideli jų kiekiai gali paveikti gyvuosius organizmus. Nesteroidiniai vaistai nuo uždegimo (NVNU) yra įvairi ir chemiškai heterogeninė grupė, daugiausia sudaryta iš priešūždegiminių, nuskausminamųjų ir karščiavimą mažinančių vaistų, atitinkamai sumažinanti uždegimo, skausmo ir karščiavimo simptomus (Bally et al., Lanas et al.). Jie veikia slopindami ciklooksigenazės fermentų (COX-1 ir (arba) COX-2) aktyvumą. Ląstelėse šie fermentai dalyvauja pagrindinių biologinių tarpininkų, būtent prostaglandinų, veikiančių uždegimo procesuose, ir tromboksanų, kurie susiję su kraujo krešėjimu, sintezėje. Specifinis šalutinis poveikis žmonėms priklauso nuo konkretaus NVNU vaisto, tačiau iš esmės apima padidėjusią virškinimo trakto opų kraujavimo, širdies priepuolio ir inkstų ligų riziką.

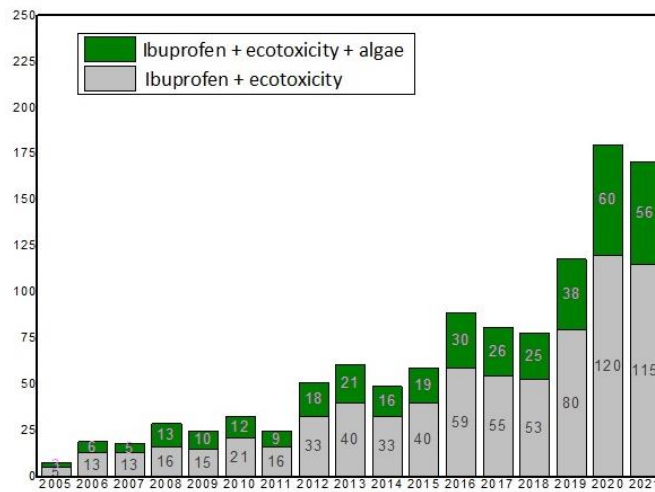
Metaanalizei buvo panaudoti duomenys iš cheminių medžiagų toksinio poveikio vandens organizmams bazių ir duomenys, esantys minėtų farmacinių medžiagų saugos duomenų lapuose bei mokslinėse publikacijose.

Pagal surinktus duomenis 2021 metų birželio pirmos dienos iš mokslinių publikacijų bibliografinės duomenų bazės „SCIENCE DIRECT“ pagal pasirinktus raktinius žodžius „Diclofenac + ecotoxicity“, „Ibuprofen + ecotoxicity“, „Paracetamol + ecotoxicity“ penkiolikos metų laikotarpyje matomas tendencingas straipsnių didėjimas. Patikslinus paiešką ir prie raktinių žodžių pridėjus „algae“ maždaug pusė visų gautų straipsnių yra susiję su dumbliais. Iš pateiktų grafikų (3.1, 3.2, 3.3 pav.) galima pastebėti, kad didžiausias dėmesys yra skiriamas diklofenakui.

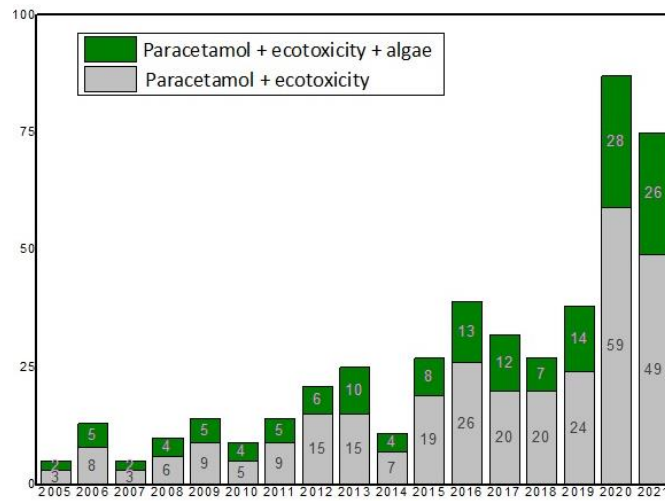
Straipsnių su juo randama daugiausiai. Galima pastebėti, kad nors šių metų praėjo dar tik pusmetis, bet jau yra straipsnių tiek, kiek buvo parašyta per praėjusius metus.



3.1 pav. Su diklofenaku susijusių straipsnių grafikas.



3.2 pav. Su ibuprofenu susijusių straipsnių grafikas.



3.3 pav. Su paracetamoliu susijusių straipsnių grafikas.

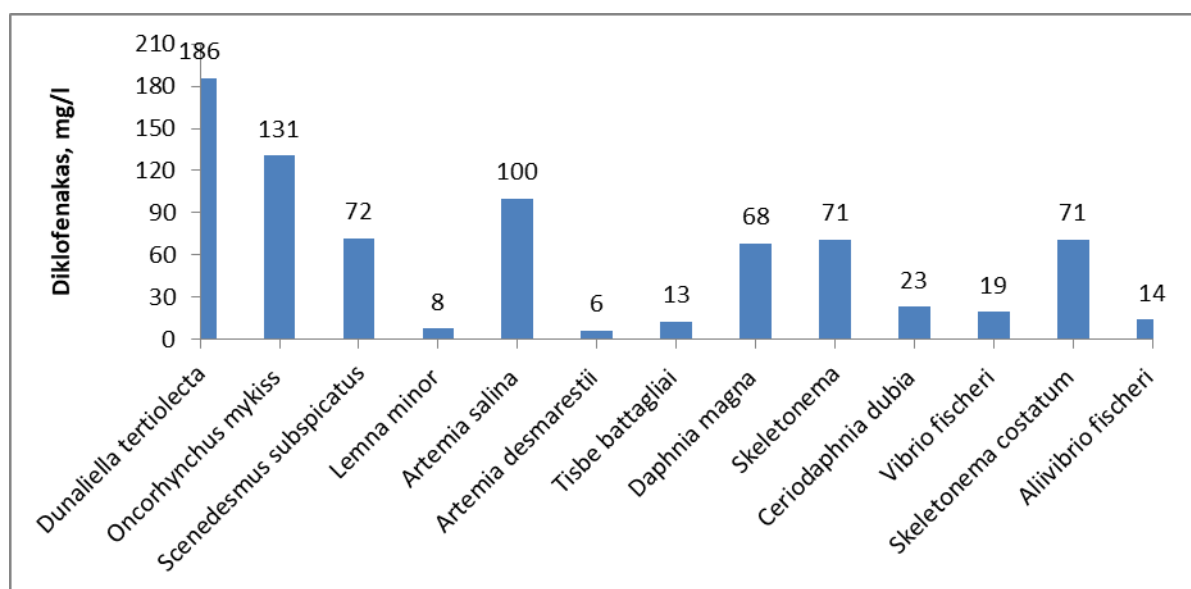
1 lenetelė. Paracetamolio, diklofenako ir ibuprofeno toksiškumo duomenys įvairiems vandens organizmams.

Vaistas	Organizmas	LC ₅₀ /E C ₅₀ (mg/l)	Laikas, h	Šaltinis
Diklofenakas	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	185.7	96	De Lorenzo ir kt. (2008)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Rainbow Trout)	130.6	96	https://pfe-pfizercom-prod.s3.amazonaws.com/products/material_safety_data/dyloject_diclofenac_Na_inj_8-jan-2018.pdf
	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	71.9	196	Cleuvers M (2004)
	<i>Lemna minor</i>	7.5	168	Cleuvers M (2003)
	<i>Artemia salina</i>	>100	48	Minguez L ir kt. (2016)
	<i>Artemia desmarestii</i>	6.3	24	Nieto E ir kt. (2013)
	<i>Tisbe battagliai</i>	15.8	48	Schmidt W ir kt. (2011)
		9.5	48	Trombini C ir kt. (2016)
	<i>Daphnia magna</i>	68	48	Cleuvers M (2004), Cleuvers M (2003), https://pfe-pfizercom-prod.s3.amazonaws.com/products/material_safety_data/dyloject_diclofenac_Na_inj_8-jan-2018.pdf
		80.1	48	Han GH ir kt. (2006)
		103.5	48	https://cdn.pfizer.com/pfizercom/products/material_safety_data/PZ00318.pdf
		22	48	Ferrari B ir kt. (2003)
	<i>Skeletonema Algae</i>	42	48	https://cdn.pfizer.com/pfizercom/products/material_safety_data/PZ00318.pdf
		100	72	https://cdn.pfizer.com/pfizercom/products/material_safety_data/PZ00318.pdf
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	23	48	Ferrari B ir kt. (2003)
	<i>Vibrio fischeri</i>	27.8	48	Schmidt W ir kt. (2011)
		11	0.5	Ferrari B ir kt. (2003)
	<i>Skeletonema costatum</i> (Marine Diatom)	42	48	https://pfe-pfizercom-prod.s3.amazonaws.com/products/material_safety_data/dyloject_diclofenac_Na_inj_8-jan-2018.pdf
		100	72	https://pfe-pfizercom-prod.s3.amazonaws.com/products/material_safety_data/dyloject_diclofenac_Na_inj_8-jan-2018.pdf

	<i>Aliivibrio fischeri</i>	11.79	0.5	Dökmeci AH ir kt. (2014)	
		16.31	0.5	Dökmeci AH ir kt. (2014)	
Ibuprofenas	<i>Scenedesmus subspicatum</i>	342.2	196	Cleuvers M (2004), Cleuvers M (2003)	
	<i>Lemna minor</i>	22	168	Cleuvers M (2004), Cleuvers M (2003)	
	<i>Tisbe battagliai</i>	49.7	24	Trombini C ir kt. (2016)	
	<i>Atyaephyra desmarestii</i>	13.3	24	Nieto E ir kt. (2013)	
	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	19.59	24	Kim JW ir kt. (2009)	
	<i>Daphnia. magna</i>		101.2	48	Cleuvers
			35.79	48	http://content.oppictures.com/Master_Images/Master_PDF_Files/pfi015489_sds.pdf
			108	48	http://content.oppictures.com/Master_Images/Master_PDF_Files/pfi015489_sds.pdf
			9.06	48	https://www.fishersci.com/store/msds?partNumber=AC258610100&productDescription=IBUPROFEN+10GR&vendorId=VN00032119&countryCode=US&language=en
			124.4	48	http://cfpub.epa.gov/ecotox
	<i>Pareas carinatus</i>	17.1	72	Pounds N ir kt. (2008)	
	<i>Oryzias latipes</i>	>100	24	Pounds N ir kt. (2008)	
	<i>Aliivibrio fischeri</i>	39	0.5	Dökmeci AH ir kt. (2014)	
	<i>Skeletonema costatum</i>		39.9	120	https://www.fishersci.com/store/msds?partNumber=AC258610100&productDescription=IBUPROFEN+10GR&vendorId=VN00032119&countryCode=US&language=en
			9.06		https://imgcdn.mckesson.com/CumulusWeb/Click_and_learn/SDS_9MAJOR_IBUPROFEN_TAB_600MG_500_BT.pdf
	<i>Desmodesmus subcapitata</i> (Green Alga)		315	72	http://content.oppictures.com/Master_Images/Master_PDF_Files/pfi015489_sds.pdf
			342.2	72	http://content.oppictures.com/Master_Images/Master_PDF_Files/pfi015489_sds.pdf
<i>Lepomis macrochirus</i>	173	96	http://content.oppictures.com/Master_Images/Master_PDF_Files/pfi015489_sds.pdf		
Aquatic organisms	20.5		https://imgcdn.mckesson.com/CumulusWeb/Click_and_learn/SDS_9MAJOR_IBUPROFEN_TAB_600MG_500_BT.pdf		
<i>Centrarchus</i>	173		https://imgcdn.mckesson.com/CumulusWeb/Click_a		

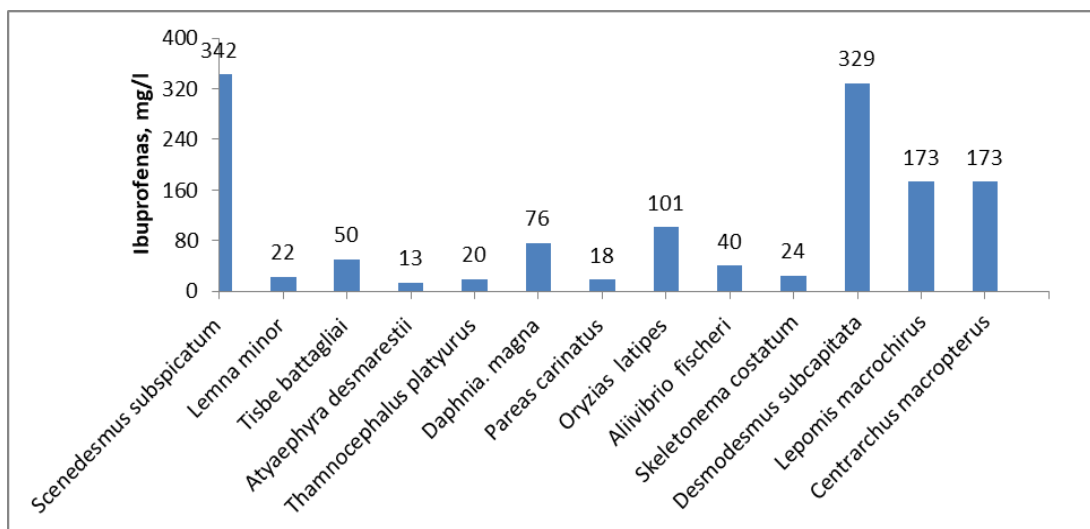
	<i>macropterus</i>			nd_learn/SDS_9MAJOR_IBUPROFEN_TAB_600MG_500_BT.pdf
	<i>Lepomis macrochirus</i>	173		https://imgcdn.mckesson.com/CumulusWeb/Click_and_learn/SDS_9MAJOR_IBUPROFEN_TAB_600MG_500_BT.pdf
	Fish	> 100	96	https://www.medisca.com/NDC_SPECS/MUS/0299/MSDS/0299.pdf
Paracetamol	<i>Vibrio fischeri</i>	567.5	0.25	Kim et al., 2007.
		650	0.5	Henschel et al., 1997
	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	112	48	Henschel et al., 1997
	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	134	72	Henschel et al., 1997, https://www.cos.net.au/msds/FIRST1030.pdf
	<i>Streptocephalus proboscideus</i>	9.2	24	Calleja et al., 1994
		29.6	24	Kuhn et al., 1989
	<i>Brachionus calyciflorus</i>	5306	24	Webb, 2001
	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	63.8	24	Nałęcz-Jawecki and Persoone, 2006
	<i>Artemia salina</i>	577	24	Webb, 2001.
	<i>Daphnia magna</i>	26.6	96	Kim et al., 2007.
		50	48	Henschel et al., 1997, https://www.cos.net.au/msds/FIRST1030.pdf
		9.2	48	Kuhn et al., 1989, https://fagron.com/sites/default/files/document/msds_coa/103-90-2_%28USA%29.pdf
		13	24	Webb, 2001.
		55.5	24	Calleja et al., 1994
		293	24	Webb, 2001.
	<i>Oryzias latipes</i>	>160	48	Kim et al., 2007.
		>160	96	Kim et al., 2007.
	<i>Brachydanio rerio</i>	378	48	Henschel et al., 1997.
	Fathead minnow (Juvenile <i>Pimephales promelas</i>)	814	96	https://www.cos.net.au/msds/FIRST1030.pdf
	Fish	95		https://www.caelo.de/getfile.html?type=sdb_en&country=en&num=4003
100			https://www.caelo.de/getfile.html?type=sdb_en&country=en&num=4003	
crustacean	9.2	48	https://www.pharmacopoeia.com/Catalogue/Preview?uri=%2Fcontent%2Ffile%2Fproducts%2Fhealthand	

			safety%2FCat 371 GB.pdf
Invertebrates	11.85		https://www.caelo.de/getfile.html?type=sdb_en&country=en&num=4003
	5.72		https://www.caelo.de/getfile.html?type=sdb_en&country=en&num=4003
Algae	112.666		https://www.caelo.de/getfile.html?type=sdb_en&country=en&num=4003
	22		https://www.caelo.de/getfile.html?type=sdb_en&country=en&num=4003
<i>Pimephales promelas</i>	814	96	U.S. Environmental Protection Agency, 2005.



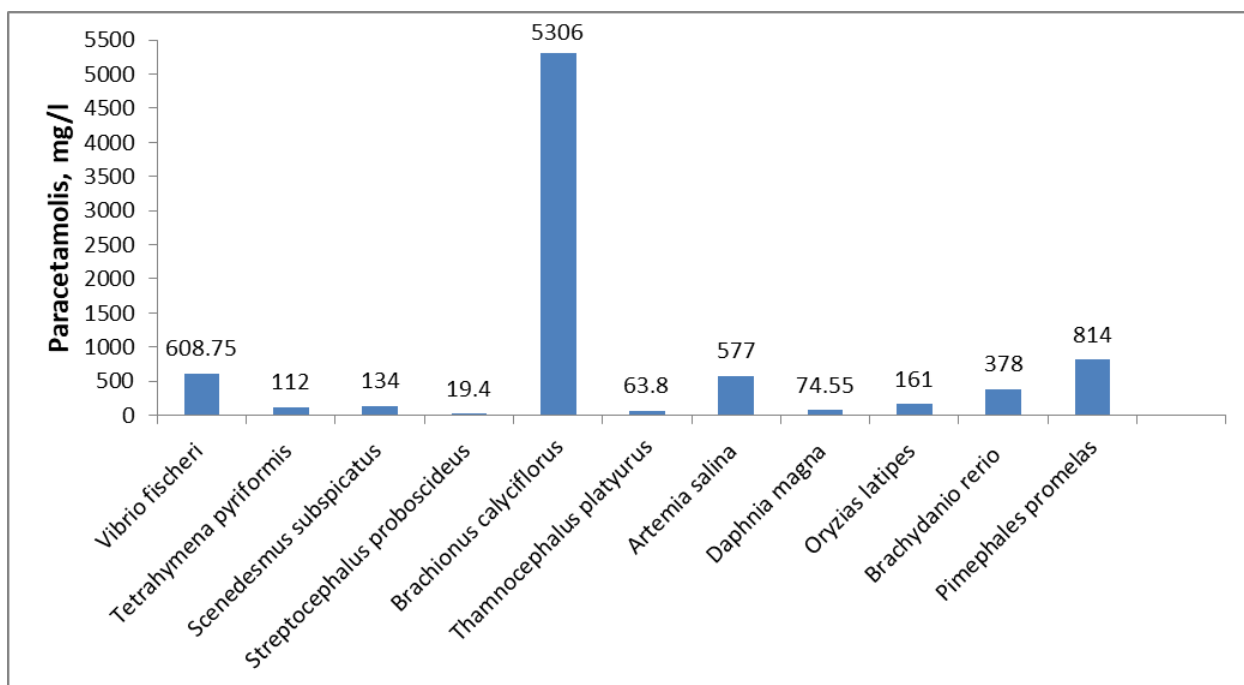
3.4 pav. Diklofenako vidurkinis toksiškumas vandens organizmams.

Pagal surintus duomenis diklofenakas labiausiai toksiškas yra vėžiagyviui *Artemia desmarestii*. Jo 50% mirtingumas yra prie 6.3 mg/l diklofenako koncentracijos. Mažiausiai diklofenakas toksiškas yra fitoplanktonui *Dunaliella tertiolecta*. Jo 50% sumažėjęs augimas yra prie 185.7 mg/l diklofenako koncentracijos. Pagal pateiktus duomenis galima pamatyti vandens organizmų išsidėstymą nuo daugiausiai iki mažiausiai jautraus diklofenakui: *Artemia desmarestii* > *Lemna minor* > *Tisbe battagliai* > *Aliivibrio fischeri* > *Vibrio fischeri* > *Ceriodaphnia dubia* > *Daphnia magna* > *Skeletonema* > *Skeletonema costatum* > *Scenedesmus subspicatus* > *Artemia salina* > *Oncorhynchus mykiss* > *Dunaliella tertiolecta*.



3.5 pav. Ibuprofeno vidurkinis toksiškumas vandens organizmams.

Pagal surintus duomenis ibuprofenas labiausiai toksiškas yra vėžiagyviui *Atyaephyra desmarestii*. Jo 50% mirtingumas yra prie 13.3 mg/l ibuprofeno koncentracijos. Mažiausiai ibuprofenas toksiškas yra žaliadumbliui *Scenedesmus subspicatum*. Jo 50% augimo susilpnėjimas yra prie 342.2 mg/l ibuprofeno koncentracijos. Pagal pateiktus duomenis galima pamatyti vandens organizmų išsidėstymą nuo daugiausiai iki mažiausiai jautraus ibuprofeni: *Atyaephyra desmarestii* > *Pareas carinatus* > *Thamocephalus platyurus* > *Lemna minor* > *Skeletonema costatum* > *Aliivibrio fischeri* > *Tisbe battagliai* > *Daphnia magna* > *Oryzias latipes* > *Lepomis macrochirus* > *Centrarchus macropterus* > *Lepomis macrochirus* > *Desmodesmus subcapitata* > *Scenedesmus subspicatum*.



3.6 pav. Paracetamolio vidurkinis toksiškumas vandens organizmams.

Pagal surinktus duomenis paracetamolis labiausiai toksiškas yra krevetėms *Streptocephalus proboscideus*. Jų 50% augimo susilpnėjimas yra prie 19.4 mg/l paracetamolio koncentracijos. Mažiausiai paracetamolis toksiškas yra žaliadumbliai *Scenedesmus subspicatus*. Jos 50% augimo susilpnėjimas yra prie 5306 mg/l paracetamolio koncentracijos. Pagal pateiktus duomenis galima pamatyti vandens organizmų išsidėstymą nuo daugiausiai iki mažiausiai jautraus paracetamoliui: *Streptocephalus proboscideus* > *Thamnocephalus platyurus* > *Daphnia magna* > *Tetrahymena pyriformis* > *Scenedesmus subspicatus* > *Oryzias latipes* > *Brachydanio rerio* > *Artemia salina* > *Vibrio fischeri* > *Pimephales promelas* > *Brachionus calyciflorus*.

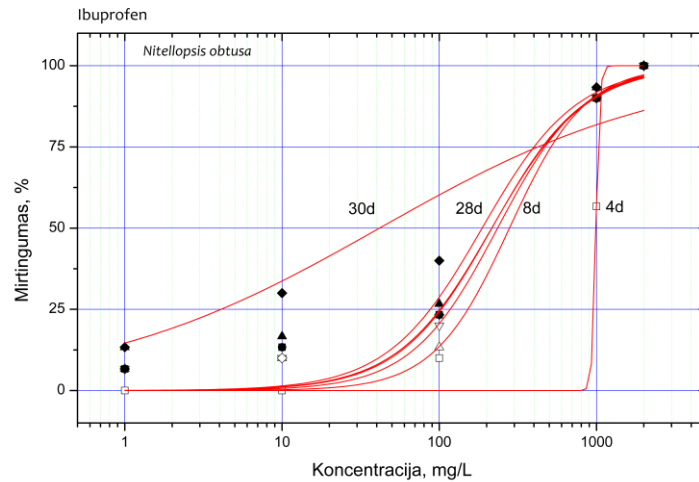
3.2. Diklofenako, ibuprofeno ir paracetamolio poveikis menturdumblių *N. obtusa* ląstelių mirtingumui

Prieš elektrofiziologinius buvo atliekami letalumo tyrimai. Mirtingumo tyrimams buvo naudojami ibuprofeno 1, 10, 100 ir 1000 mg/l, diklofenako 1, 10, 100, 500 ir 1000 mg/l ir paracetamolio 2, 20, 200, 1000 ir 2000 mg/l koncentracijų tirpalai. Šio tyrimo tikslas buvo nustatyti koncentracijas, kurioms esant žūsta 50% ląstelių ir kaip LC₅₀ reikšmė kinta priklausomai nuo poveikio trukmės. Šios ląstelės gali būti stebimos iki mėnesio laiko ir ilgiau, jei ląstelių mirtingumas kontrolėje neviršija 10%.

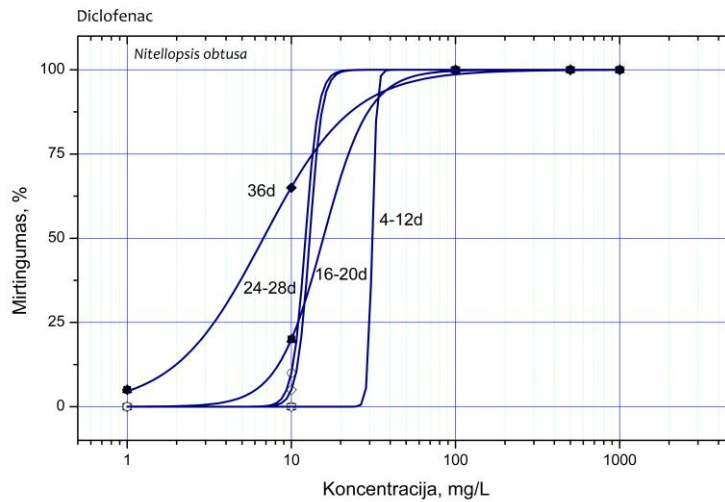
2 lentelė. *N. obtusa* ląstelių, paveiktų diklofenaku, paracetamoliu ir ibuprofenu, LC₅₀ reikšmės ± sp, apskaičiuotos esant skirtingai ekspozicijos trukmei.

Farmacinė medžiaga	LC ₅₀ , mg/l								
	4 d	8 d	12 d	16 d	20 d	24 d	28 d	30 d	36 d
Diklofenakas	31	31	31	12,9±0.1	12,2	15,6±9,0	15,6±9,0	–	6,8±0.2
Ibuprofenas	992	279±75	235±57	215±80	215±80	215±80	187±92	41±42	–
Paracetamolis	2000	888±34	438±37	63	63	63	38	–	32±13

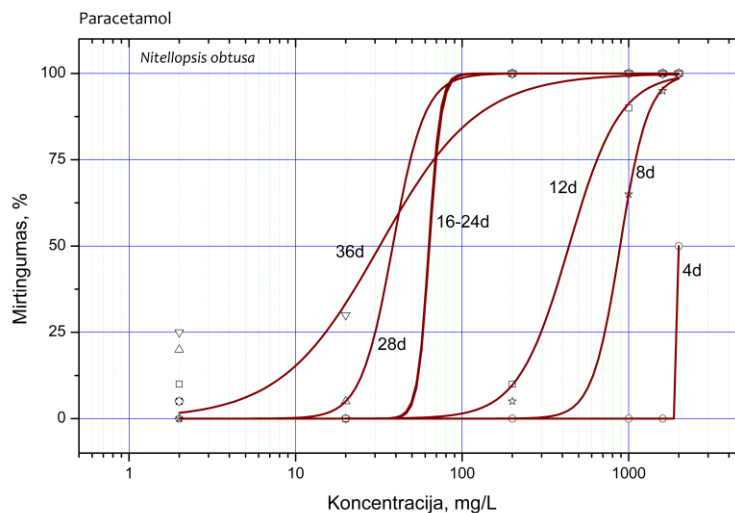
Iš 2 lentelės galima matyti, kad LC₅₀ reikšmės ilgėjant farmacinių medžiagų poveikio trukmei kito nevienodai. Letalioji koncentracija, sukėlusį pusės paveiktų ląstelių žūtį, labiausiai mažėjo paracetamoliui didėjant trukmei nuo 4 dienų iki maždaug mėnesio – nuo 2000 iki 32 mg/l, t.y. apie 70 kartų (3.9 pav.). Šis rodiklis ibuprofenai buvo apie 20, o diklofenakui – apie 5 (3.7 ir 3.8 pav.). Per pirmąsias 12 dienų toksiškumo seka *N. obtusa* ląstelėms buvo diklofenakas > ibuprofenas > paracetamolis, tuo tarpu po maždaug dviejų savaičių paracetamolis menturdumblių ląsteles pradeda veikti stipriau negu ibuprofenas. Diklofenakas ir po mėnesio ekspozicijos išliko toksiškiausias menturdumblių ląstelėms. Jis taip pat pasižymi ir greičiausiu poveikiu – 1000 mg/l koncentracijos tirpale visos ląstelės žuvo per pirmąsias 24 val. poveikio valandas. Tuo tarpu 100% ląstelių žūtis tokiose pačiose didelėse 1000 mg/l ibuprofeno ir paracetamolio koncentracijose užtruko, atitinkamai, 22 ir 16 dienų.



3.7 pav. *Nitellopsis obtusa* ląstelių mirtingumo priklausomybė nuo ibuprofeno koncentracijos esant skirtingai poveikio trukmei (4–30 d).



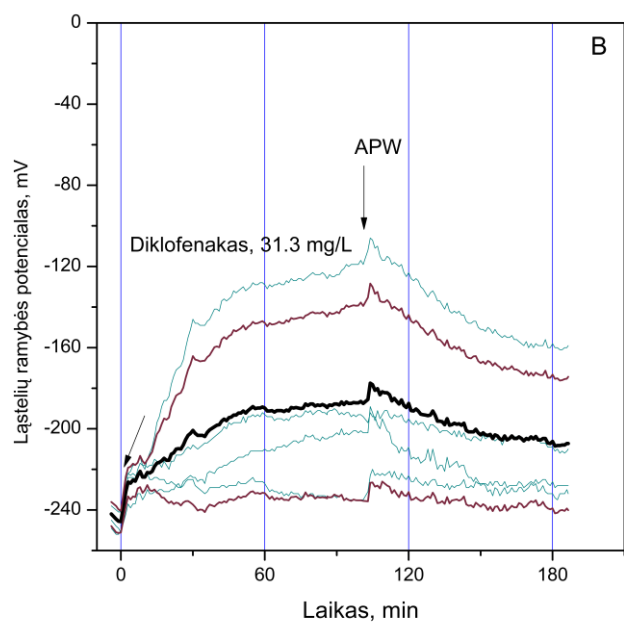
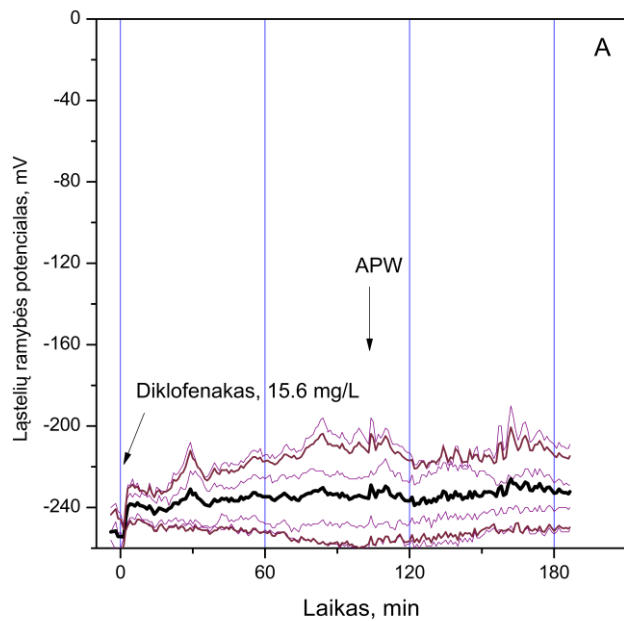
3.8 pav. *Nitellopsis obtusa* ląstelių mirtingumo priklausomybė nuo diklofenako koncentracijos esant skirtingai poveikio trukmei (4–36 d).



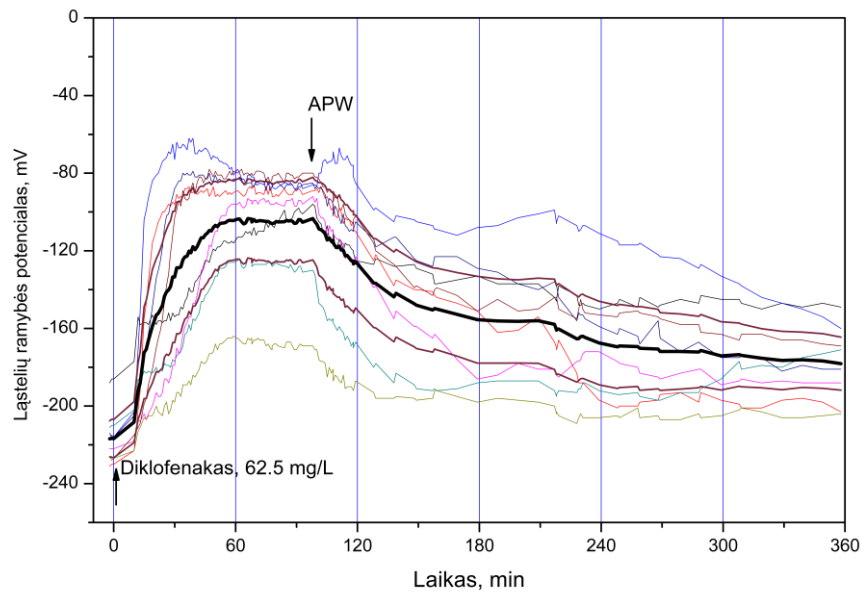
3.9 pav. *Nitellopsis obtusa* ląstelių mirtingumo priklausomybė nuo paracetamolio koncentracijos esant skirtingai poveikio trukmei (4–36 d).

3.3. Diklofenako ir paracetamolio poveikis *N. obtusa* ląstelių membranos potencialui

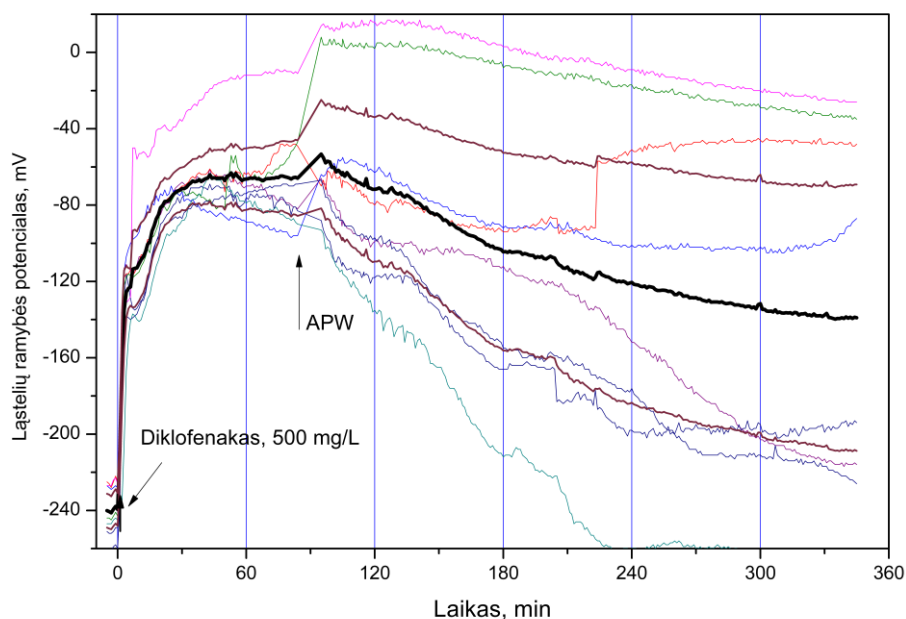
N. obtusa ląstelių ramybės potencialo (RP) kinetinių būdingi pavyzdžiai, paveikus jas skirtingų koncentracijų diklofenako tirpalais, pateikti 3.10–3.12 pav. Vidutinė ląstelių RP depoliarizacijos reikšmė, stebėta per 90 min poveikio laiką, didėjo didėjant diklofenako koncentracijai, nors kai kurios vienos koncentracijos poveikio tyrimui panaudotos ląstelės reagavo silpnai, pvz., veikiant 31,3 mg/l diklofenako (3.10 B pav.). Esant 500 mg/l koncentracijai visos ląstelės ženkliai depoliarizavosi (3.12 pav.).



3.10 pav. *Nitellopsis obtusa* ląstelių RP kinetika paveikus jas 15,6 mg/l (A) ir 31,3 mg/l (B) diklofenako tirpalu ir, po 90 min, kontroline terpe APW. Storesnės kreivės žymi vidurkį (n=4) ir 95% pasikliautinuosius intervalus.

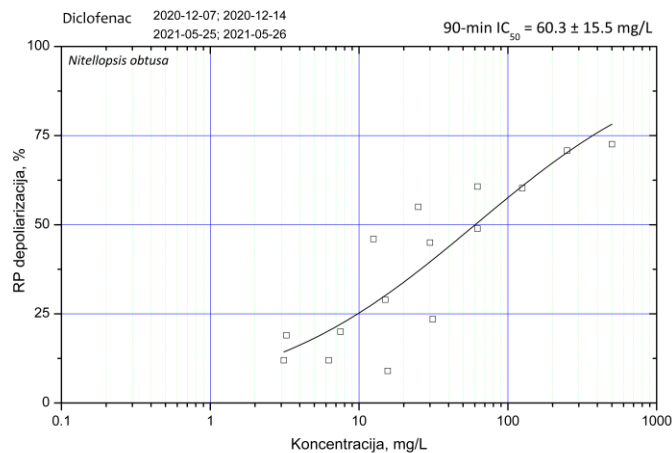


3.11 pav. *Nitellopsis obtusa* ląstelių RP kinetika paveikus jas 62,5 mg/l diklofenako tirpalu ir, po 90 min, kontroline terpe APW. Storesnės kreivės žymi vidurkį (n=8) ir 95% pasikliautinosius intervalus.

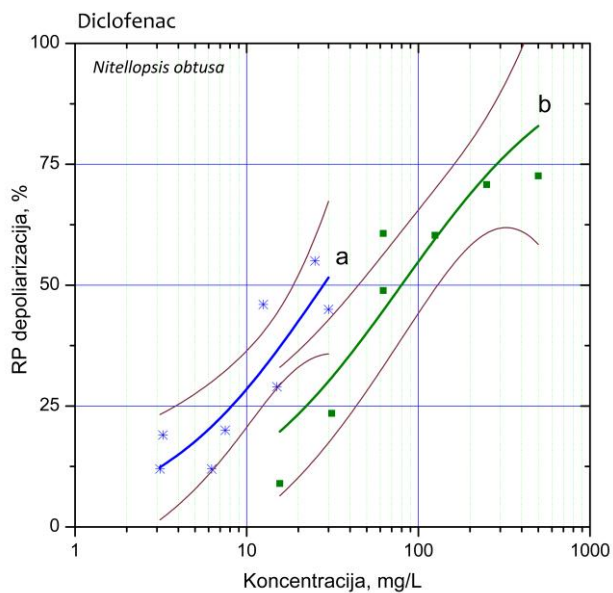


3.12 pav. *Nitellopsis obtusa* ląstelių RP kinetika paveikus jas 500 mg/l diklofenako tirpalu ir kontroline terpe APW. Storesnės kreivės žymi vidurkį (n=8) ir 95% pasikliautinosius intervalus.

Bendra visų atskiruose eksperimentuose tirtų koncentracijų diklofenako poveikio menturdumblių ląstelėms koncentracijų-atsako priklausomybė parodyta 3.13 pav. Iš priklausomybės nustatyta 50% RP depoliarizavimo per 90 minučių koncentracija yra $60,3 \pm 15,5$ mg/l (vidurkis \pm sp). Atskyrus 2020 m. gruodžio ir 2021 m. gegužės mėnesiais atliktus bandymus buvo gauti atskaitos taškų (90-min IC_{50}) įverčiai $28 \pm 6,9$ mg/l ir $76,5 \pm 17,5$ mg/l, rodantys, kad ląstelių reakcijoms turėjo įtakos laikymo laboratorijos sąlygomis trukmė, atitinkamai 1 ir 6 mėnesiai.



3.13 pav. *Nitellopsis obtusa* ląstelių vidutinio ramybės potencialo (RP) depoliarizacijos (%) priklausomybė nuo diklofenako koncentracijos. Kiekvienas taškas gautas suvidurkinus 4–8 dumblių ląstelių RP reikšmes. Bandymai ($n = 4$) atlikti 2020–2021 m.



3.14 pav. *Nitellopsis obtusa* ląstelių vidutinio ramybės potencialo (RP) depoliarizacijos (storesnės kreivės) ir 95% pasikliautinių intervalų priklausomybė nuo diklofenako koncentracijos. Kiekvienas taškas gautas suvidurkinus 4–8 dumblių ląstelių RP reikšmes. Bandymai atlikti 2020 m. gruodžio mėn. (a) ir 2021 m. gegužės mėn. (b). 90-min IC_{50} reikšmės kreivei (a) $28 \pm 6,9$ mg/l (gruodžio mėn.) ir kreivei (b) 76.5 ± 17.5 mg/l (gegužės mėn.).

3 lentelė. *N. obtusa* ląstelių, paveiktų skirtingų koncentracijų paracetamolio tirpalu, ramybės potencialo reikšmės prieš poveikį RP(0-min), poveikio 90-ą min RP(90-min), procentinė depoliarizacija poveikio pabaigoje ir liekamoji depoliarizacija po 90 min atplovimo.

Koncentracija,	RP(0-min),	RP(90-min),	n	RPdep,	LD,
mg/l	mV	mV		%	%
2	-176 ± 14	-150 ± 28	6	14,7	–
20	-185 ± 12	-169 ± 25	6	8,6	–
60	-183 ± 10	-151 ± 36	5	17,4	–
200	-172 ± 35	-151 ± 26	6	12,4	–
1000	-178 ± 20	-133 ± 49	9	25,5	110±64
2000	-173 ± 19	-116 ± 16	11	33,1	86±44
3000	-176 ± 29	-110 ± 18	5	37,9	–

Paracetamolio poveikis menturdumblių ramybės potencialui buvo tirtas dideliame koncentracijų diapazone – nuo 2 iki 3000 mg/l. Šio vaisto indukuota ląstelių depoliarizacija buvo ženkliai mažesnė nei diklofenako ir tesiekė 26–38%, esant net ir didžiausioms 1000–3000 mg/l koncentracijoms (3 lentelė). Ląstelių liekamoji depoliarizacija, fiksuota kontrolinėje terpėje praėjus 90 minučių po poveikio buvo apie 100%, o tai rodo, negrįžtamą poveikį ląstelėms. Ląsteles išlaikius kontrolinėje APW terpėje apie 18 val. po 90-ies min 1000 mg/l paracetamolio poveikio ląstelių depoliarizacija dar padidėjo. Tuo tarpu ląsteles paveikus 31,3 mg/l, 62,5 mg/l ir 500 mg/l koncentracijų diklofenako tirpalais, kurie po 90 min sukėlė 23,6%, 51,3% ir 55,9% vidutinę RP depoliarizaciją, jos nuo toksikanto atsiplovė geriau – jų liekamoji depoliarizacija, atitinkamai, buvo 33 ± 21%, 55 ± 19% ir 63 ± 16%.

4. Rezultatų aptarimas

Farmacinių medžiagų poveikio vandens ekosistemų organizmams problemos aktualumą rodo per pastaruosius metus didėjantis mokslinių publikacijų šią tema skaičius. Darbe atlikta, nors ir ribota, toksikologinių duomenų metaanalizė atskleidė, kad per 2005–2020 metų periodą straipsnių, skirtų skausmą malšinančių vaistų – paracetamolio, ibuprofeno ir diklofenako – poveikio hidrobiontams padaugėjo, atitinkamai 4, 9 ir 16 kartų ir siekia apie 500 per metus (2020 ir 2021 pirmasis pusmetis). Apžvelgtoje literatūroje dumbliams skirta apie trečdalis visų tirtų organizmų, kas yra nemažai, tačiau duomenų apie minėtų farmacinių medžiagų poveikį

menturdumbliams neaptikta. Kita vertus, nėra nustatytos ribinės nekenksmingos biotai koncentracijos ir galutinai įteisinti aplinkosauginiai reglamentai (Joachim et al., 2021).

Pasirinktų farmacinių medžiagų, diklofenako, ibuprofeno ir paracetamolio, poveikis makrofitinių dumblių *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinėms ląstelėms buvo tiriamas skirtinguose toksikologine prasme atskaitos taškuose, surandant veikliąsias koncentracijas letalumo ir elektrofiziologiniuose eksperimentuose, t.y. 4–36 d LC₅₀ ir ląstelių ramybės potencialo (RP) depoliarizacijos per 90 minučių IC₅₀ reikšmes. Siekiant nustatyti veikliąsias koncentracijas, pasirinktas gana platus koncentracijų diapazonas, pradedant 1 mg/l, baigiant 3000 mg/l koncentracijomis. Kadangi anksčiau skausmą malšinančių vaistų poveikis menturdumbliams nebuvo tyrinėtas, nebuvo aišku, kokia trukmė šiai vaistų klasei būtų optimali atsako jautrumo ir tyrimo trukmės požiūriu. Pradėjus mirtingumo tyrimus, paaiškėjo, kad iki 10 mg/l visos tirtos farmacinės medžiagos silpnai veikia *N. obtusa* ląstelių išgyvenamumą. Atlikus letalumo tyrimus buvo pastebėta, kad ilgėjant farmacinių medžiagų poveikio trukmei ląstelių žūtis greitis yra nevienodas. Per pirmąsias 12 dienų toksiškumo seka *N. obtusa* ląstelėms buvo diklofenakas > ibuprofenas > paracetamolis, tuo tarpu po maždaug dviejų savaitių paracetamolis menturdumblių ląsteles pradeda veikti stipriau negu ibuprofenas. Diklofenakas ir po mėnesio ekspozicijos išliko toksiškiausias mentudumblių ląstelėms. Jis taip pat pasižymėjo sparčiausiu poveikiu – 1000 mg/l koncentracijos tirpale visos ląstelės žuvo per pirmąsias 24 poveikio valandas, tuo tarpu 100% ląstelių žūčiai tokių pačių koncentracijų ibuprofeno ir paracetamolio tirpaluose prireikė, atitinkamai, 22 ir 16 dienų ekspozicijos.

Iš tirtųjų farmacinių medžiagų diklofenakas buvo toksiškiausias menturdumblių ląstelei. Trumpalaikio 4 dienų poveikio metu nustatyta LC₅₀ reikšmė 31 mg/l, ilgalaikio 36 dienų poveikio metu – LC₅₀ = 6,8 mg/l. Palyginimui, pagal metaanalizės surinktus duomenis jautriausias diklofenakui testorganizmas buvo aukštesnysis vandens augalas *Lemna minor* (mažoji plūdena), kuriam nustatyta augimo slopinimo per 7 dienas koncentracija IC₅₀ = 7,5 mg/l (Cleuvers, 2003). Mažiau jautrus diklofenakui buvo jūrinis titnagdumbilis *Skeletonema costatum* 2-d EC₅₀ = 42 mg/l (1 lentelė), o mažiausiai jautrus – žaliadumbilis *Dunaliella tertiolecta* – 4-d LC₅₀ = 186 mg/l (De Lorenzo et al., 2008). Ibuprofeno atveju, didžiausias toksiškumas buvo stebėtas vėžiagyviams, vidutiniškai 24-h LC₅₀ = 27,3 mg/l, o mažiausias – žaliadumbliui *S. subspicatum* 4-d IC₅₀ = 342 mg/l (1 lentelė). taip pat iš metaanalizės paaiškėjo, kad paracetamoliui jautriausios iš tirtų testorganizmų buvo krevetės *Streptocephalus proboscideus*,

kurių 24-h LC50 = 9,2–29,6 mg/l (Calleja et al., 1994; Kuhn et al., 1989). Mažiausiai paracetamoliui jautrus testorganizmas – verpetės *Brachyonus calyciflorus* su 24-h LC50 = 5306 mg/l (Webb et al., 2001).

Matome, kad įvairių autorių panaudoti skirtingi testorganizmai buvo veikiami farmacinėmis medžiagomis nevienodą laiką. Kadangi toksiškumas priklauso nuo testorganizmo, ekspozicijos trukmės, atskaitos taško lygio (%), stebimojo biologinio organizuotumo lygmens ir pan., sunku palyginti jautrumo tam tikram toksikantui duomenis. Apskritai, *N. obtusa* ląstelių mirtingumo rodiklis yra pakankamai informatyvus, leidžiantis išrikiuoti pagal toksiškumą menturdumbliams bent jau magistriniame darbe tirtas farmacinės medžiagas.

Atliekant elektrofiziologinius tyrimus stebėta menturdumblių ląstelių ramybės potencialo kinetika tiek poveikio metu, tiek ir atplaunant jas kontrolinėje terpėje po poveikio. Iš skirtingų koncentracijų diklofenako paveiktų ląstelių atsakų, gautų nepriklausomuose eksperimentuose, ir koncentracijų priklausomybės nustatyta 50% RP depoliarizavimo per 90 minučių koncentracija diklofenakui – 90-min IC₅₀ = 60,3 ± 15,5 mg/l. Atskyrus 2020 m. gruodžio ir 2021 m. gegužės mėnesiais atliktus bandymus buvo gauti šie 90-min IC₅₀ įverčiai: 21–35 mg/l ir 59–94 mg/l, rodantys, kad ląstelių reakcijoms turėjo įtakos laikymo laboratorijos sąlygomis trukmė. Kito nesteroidinio vaisto paracetamolio poveikis *N. obtusa* ląstelių RP buvo tirtas koncentracijose nuo 2 mg/l iki 3000 mg/l. Tokių didelių koncentracijų prirėkė todėl, kad šio vaisto sukelta RP depoliarizacija buvo ženkliai mažesnė nei diklofenako ir daugiausiai siekė 38%, esant net ir didžiausiai 3000 mg/l koncentracijai. Menturdumblių liekamoji depoliarizacija (LD) buvo apskaičiuota iš RP reikšmės kontrolinėje terpėje praėjus 90 minučių po poveikio. Šis parametras naudingas aiškinantis toksikanto poveikio pobūdį ląstelės membrana. Paracetamolio liekamoji depoliarizacija buvo apie 100%, t.y. trumpalaikis 1,5 val poveikis sukelia negrįžtamą poveikį ląstelėms. Menturdumblio ląsteles paveikus 31,3 mg/l, 62,5 mg/l ir net 500 mg/l koncentracijų diklofenako tirpalais jos nuo užpildo toksikanto atsiplovė geriau – jų liekamoji depoliarizacija buvo mažesnė, tuo signalizuodama apie mažiau toksišką poveikį menturdumbliams.

Modeliniuose (bandymuose laboratorinėmis sąlygomis) paprastai panaudojamos tokios medžiagų koncentracijos, kurios leistų stebėti tiriamų organizmų reakcijas. Dažnai jos esti gerokai didesnės negu kad aptinkamos nuotekose ar vandens telkiniuose. Iš Beek et al. (2016) apžvalgoje pateiktų duomenų matome, kad maksimali išmatuota koncentracija paviršiniuose vandenyse Europoje diklofenakui siekia 18,7 µg/l, ibuprofeniui – 303 µg/l ir paracetamoliui –

230 µg/l. Farmacinės medžiagos į gamtinius vandens telkinius daugiausiai patenka iš nuotekų valymo įrenginių, o kai kurių jų išvalymo efektyvumas nedidelis, pavyzdžiui, diklofenakui – vos ketvirtadalis (Suzdalev, 2020), todėl svarbu nustatyti šių medžiagų poveikį biotai taikant ilgai (mėnesio ir daugiau) trunkančius ekotoksikologinius tyrimus.

Išvados

- Farmacinių medžiagų – diklofenako, ibuprofeno ir paracetamolio, – ekotoksikologinių duomenų metaanalizė išryškino poveikio vandens biotai problemos aktualumą – per du pastaruosius metus atspausdinama po maždaug 500 mokslinių straipsnių, palyginus su maždaug 10 straipsnių 2005 m. Apibendrinti metaanalizės, apimančios viso gyvūninio ar augalinio organizmo reakcijas įvairios trukmės tyrimuose, duomenys parodė diklofenaką esant toksiškiausiu visoms vandens organizmų grupėms.
- Palyginus skirtingos trukmės letalumo tyrimuose gautų LC_{50} efektyviųjų koncentracijų (LC_{50}) reikšmių dinamiką, nustatyta, kad ilgėjant farmacinių medžiagų poveikio trukmei ląstelių žūtis greitis yra nevienodas skirtingoms farmacinėms medžiagoms. Per pirmąsias 12 dienų toksiškumo seka *N. obtusa* ląstelėms buvo diklofenakas > ibuprofenas > paracetamolis, tuo tarpu po dviejų savaičių paracetamolis menturdumblių ląsteles pradeda veikti stipriau negu ibuprofenas. Diklofenakas ir po mėnesio ekspozicijos išliko toksiškusias menturdumblių ląstelėms.
- Nustatyta diklofenako tirpalo efektyvioji $60,3 \pm 15,5$ mg/l (vidurkis \pm sp) koncentracija, kuri per 90 minučių trukmės ekspoziciją sukėlė *N. obtusa* ląstelių 50% ramybės potencialo depoliarizaciją. Paracetamolis indukavo ženkliai mažesnę 26–38% RP depoliarizaciją, paveikus net ir didžiausiomis 1000–3000 mg/l koncentracijomis. Mažesnė už diklofenako paracetamolio liekamoji depoliarizacija taip pat rodė mažesnę šio skausmą malšinančio vaisto toksiškumą menturdumblių ląstelėms.
- Makrofitinio dumblio *N. obtusa* ląstelės buvo jautresnės negu vienaląsčiai dumbliai nedidelės trukmės (4–12 d) ekspozicijose diklofenako ($LC_{50} = 31$ mg/l) ir ibuprofeno (235 mg/l) tirpaluose, bet mažiau jautrios paracetamoliui (438 mg/l). Mėnesio trukmės ląstelių mirtinumo LC_{50} vertės buvo artimos aukštesniojo augalo *Lemna minor* 7-d augimo slopinimo IC_{50} vertėms.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
NEUROBIOLOGIJOS IR BIOFIZIKOS KATEDRA

Goda Plučaitė

Magistro baigiamasis darbas

Skausmą malšinančių vaistų poveikis menturdumblio *Nitellopsis obtusa* ląstelei

SANTRAUKA

Augant farmacinių medžiagų vartojimui daugėja įrodymų apie vaistų patekimą į aplinką: vaistų likučių randama paviršiniuose bei požeminiuose vandenyse, dirvožemyje, gyvūnų audiniuose. Didelė dalis farmacinių medžiagų patenka į aplinką per nuotekas iš miesto valymo įrenginių bei netinkamai utilizuojamų nebegaliojančių ar panaudotų vaistų.

Šio magistrinio darbo tikslas - nustatyti farmakologinių medžiagų poveikį menturdumblių ląstelių funkcionavimui. Darbo uždaviniai: ibuprofeno, paracetamolio ir diklofenako poveikio vandens organizmams duomenų metaanalizė; iširti diklofenako, paracetamolio ir ibuprofeno poveikį *Nitellopsis obtusa* ląstelių išgyvenamumui; iširti diklofenako ir paracetamolio poveikį elektrofiziologiniam atsakui; palyginti menturdumblių ir kitų vandens organizmų jautrumus ibuprofeniui, paracetamoliui ir diklofenakui.

Farmacinių medžiagų poveikis *N. obtusa* ląstelėms buvo tiriamas keliais etapais: renkama tiriamoji medžiaga, atliekami mirtingumo tyrimai, įvertinta ekspozicijos trukmė. Remiantis mirtingumo tyrimo duomenimis ir surinkta metaanalizės medžiaga buvo lyginama koks poveikis yra tyrime naudotomis menturdumblių ląstelėms ir kitiems vandens organizmams. Taip pat buvo vertinami elektrofiziologinio tyrimo rezultatai.

Palyginus skirtingos trukmės letalumo tyrimuose gautų LC₅₀ efektyviųjų koncentracijų (LC₅₀) reikšmių dinamiką, nustatyta, kad ilgėjant farmacinių medžiagų poveikio trukmei ląstelių žūtis greitis yra nevienodas skirtingoms farmacinėms medžiagoms. Nustatyta diklofenako tirpalo efektyvioji $60,3 \pm 15,5$ mg/l (vidurkis \pm sp) koncentracija, kuri per 90 minučių trukmės ekspoziciją sukėlė *N. obtusa* ląstelių 50% ramybės potencialo depoliarizaciją.

Paracetamolis indukavo ženkliai mažesnę 26–38% RP depoliarizaciją, paveikus net ir didžiausiomis 1000–3000 mg/l koncentracijomis. Mažesnė už diklofenako paracetamolio liekamoji depoliarizacija taip pat rodė mažesnę šio skausmą malšinančio vaisto toksiškumą menturdumblių ląstelėms.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCE CENTER
DEPARTMENT OF NEUROBIOLOGY AND BIOPHYSICCS

Goda Plučaitė

Master thesis

**The effect of pain suppressing pharmaceuticals on the charophyte
cell of *Nitellopsis obtusa***

SUMMARY

With the growth of the use of pharmaceutical substances, there is increasing evidence of the release of drugs into the environment: drug residues are found in surface and underground waters, soil, animal tissues. A large proportion of pharmaceutical substances enter the environment through wastewater from urban treatment plants and improperly disposed of obsolete or used drugs.

The aim of this master 's thesis is to determine the effect of pharmacological substances on the function of menthol cells. Objectives: meta-analysis of data on the effects of ibuprofen, paracetamol and diclofenac on aquatic organisms; to investigate the effect of diclofenac, paracetamol and ibuprofen on the survival of *Nitellopsis obtusa* cells; to investigate the effect of diclofenac and paracetamol on the electrophysiological response; to compare the sensitivities of menthol algae and other aquatic organisms to ibuprofen, paracetamol, and diclofenac.

The effect of pharmaceutical substances on *N. obtusa* cells was studied in several stages: collection of the test substance, mortality studies, evaluation of the duration of exposure. Based on the data from the mortality study and the meta-analysis material collected, the effects of the menthol algae cells and other aquatic organisms used in the study were compared. The results of the electrophysiological examination were also evaluated.

Comparing the dynamics of LC₅₀ effective concentration (LC₅₀) values obtained in mortality studies of different durations, it was found that the cell death rate is not different for different pharmaceuticals with increasing duration of exposure to pharmaceuticals. The effective concentration of diclofenac solution was found to be 60.3 ± 15.5 mg / l (mean \pm sp), which caused depolarization of the 50% resting potential of *N. obtusa* cells during 90 minutes of exposure. Paracetamol induced a significantly lower depolarization of resting potential (RP) by 26–38% when exposed to even the highest concentrations of 1000–3000 mg / l. The residual

depolarization of paracetamol lower than that of diclofenac also showed a lower toxicity of this analgesic to menthol cells.

Literatūra

1. Aus der Beek T, Weber F A, Bergmann A, Hickmann S, Ebert I, Hein A, Küster A. *Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. Environmental Toxicology and Chemistry*. 2016;35(4), 823–835. doi:10.1002/etc.3339
2. Backhaus T. Medicines, shaken and stirred: a critical review on the ecotoxicology of pharmaceutical mixtures. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369(1656). doi:10.1098/rstb.2013.0585
3. Beilby M J, Casanova M T. *The physiology of characean cells*. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin. 2014. DOI 10.1007/978-3-642-40288-3.
4. Benotti MJ, Trenholm RA, Vanderford BJ, Holady JC, Stanford BD, Snyder SA. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environ Sci Technol*. 2009;43(3):597-603. doi:10.1021/es801845a
5. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Rev*. 2006;12(3-4):250-275. doi:10.1111/j.1527-3458.2006.00250.x
6. Bharathan S. Bulbils of some charophytes. *Proc Indian Acad Sci (Plant Sci)*. 1987;97(3):257-263. doi:10.1007/BF03053351
7. Boissezon A, Auderset Joye D. A temporary gravel pit as a biodiversity hotspot for aquatic plants in the Alps. *Archives des Sciences*. 2012;65:177-190.
8. Bose JC.. *Tin motor mechanism of plants*. London: Longmans. 1928.
9. Bound JP, Voulvoulis N. Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: implications for risk assessment. *Water Res*. 2006;40(15):2885-2892. doi:10.1016/j.watres.2006.05.036
10. Bowles D, Isayenkova J, Lim E-K, Poppenberger B. Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr Opin Plant Biol*. 2005;8(3):254-263. doi:10.1016/j.pbi.2005.03.007
11. Boxall ABA. The environmental side effects of medication. *EMBO Rep*. 2004;5(12):1110-1116. doi:10.1038/sj.embor.7400307
12. Callaway RM, Ridenour WM. Novel Weapons: Invasive Success and the Evolution of Increased Competitive Ability. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 2004;2(8):436-443. doi:10.2307/3868432
13. Calleja MC, Persoone G, Geladi P. Comparative acute toxicity of the first 50 Multicentre

- Evaluation of In Vitro Cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1994;26(1):69-78. doi:10.1007/BF00212796
14. Cleuvers M. Aquatic Ecotoxicity of Pharmaceuticals Including the Assessment of Combination Effects. *Toxicology letters*. 2003;142:185-194. doi:10.1016/S0378-4274(03)00068-7
 15. Cleuvers M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2004;59(3):309-315. doi:10.1016/S0147-6513(03)00141-6
 16. Conservation Committee, Peterborough, UK. , 1992.
 17. DeLorenzo ME, Fleming J. Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2008;54(2):203-210. doi:10.1007/s00244-007-9032-2
 18. Dienst M, Strang I, Schmieder K. Die Wasserpflanzen des Bodensee-Untersees im Wandel der letzten 100 Jahre. 2012;41.
 19. DiTomaso J M, Kyser G B, Oneto S R, Wilson R G, Orloff S B, Anderson L W, Wright S D, Roncoroni J A, Miller T L, Prather T S. Weed control in natural areas in the western United States. Weed Research and Information Center, University of California, Davis, CA. 2013.
 20. Dökmeci AH, Dökmeci I, Ibar H. The Determination of Single and Mixture Toxicity at High Concentrations of Some Acidic Pharmaceuticals via *Aliivibrio fischeri*. *Environ Process*. 2014;1(2):95-103. doi:10.1007/s40710-014-0009-7
 21. Edwards R, Dixon D P. Metabolism of natural and xenobiotic substrates by the plant glutathione S-transferase superfamily. *Ecol Stud* . 2004; 170:17–50.
 22. Escobar LE, Qiao H, Phelps NBD, Wagner CK, Larkin DJ. Realized niche shift associated with the Eurasian charophyte *Nitellopsis obtusa* becoming invasive in North America. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep29037
 23. Ferrari B, Paxéus N, Lo Giudice R, Pollio A, Garric J. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2003;55(3):359-370. doi:10.1016/s0147-6513(02)00082-9
 24. Fromm J, Lautner S. Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, Cell & Environment*. 2007;30(3):249-257. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01614.x

25. Gąbka M. Charophytes (Characeae, Charophyta) in the Czech Republic: taxonomy, autecology and distribution. *Fottea*. 2009;9(1):1-43. doi:10.5507/fot.2009.001
26. Geis JW, Schumacher GJ, Raynal DJ, Hyduke NP. Distribution of *Nitellopsis obtusa* (Charophyceae, Characeae) in the St Lawrence River: a new record for North America. *Phycologia*. 1981;20(2):211-214. doi:10.2216/i0031-8884-20-2-211.1
27. González-Pleiter M, Gonzalo S, Rodea-Palomares I, et al. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: implications for environmental risk assessment. *Water Res*. 2013;47(6):2050-2064. doi:10.1016/j.watres.2013.01.020
28. Griffiths RW, Thornley S, Edsall TA. Limnological aspects of the St. Clair River. *Hydrobiologia*. 1991;219(1):97-123. doi:10.1007/BF00024749
29. Grigutyte R, Nimptsch J, Manusadzianas L, Pflugmacher S. Effects of decomposing leaf litter from *Fagus sylvatica* and *Quercus robur* of different degradation levels on oxidative stress response in the charophyte *Nitellopsis obtusa*. *Bot Lituanica*. 2008;14:223-240.
30. Grigutyte R, Nimptsch J, Manusadzianas L, Ugmacher S. Response of oxidative stress enzymes in charophyte *Nitellopsis obtusa* exposed to allochthonous leaf extracts from beech *Fagus sylvatica*. 2009;55:142-149.
31. Groves J. Notes on *Lychnothamnus* Braun. *J. Bot.* 1919;57, 125–129.
32. Haberlandt G. *Physiological Plant Anatomy* (trans. from the fourth German edition by Montagu Drummond). Macmillan, London. 1914;777.
33. Han GH, Hur HG, Kim SD. Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem*. 2006;25(1):265-271. doi:10.1897/05-193r.1
34. Hedrich R. Ion channels in plants. *Physiol Rev*. 2012;92(4):1777-1811. doi:10.1152/physrev.00038.2011
35. Henschel KP, Wenzel A, Diedrich M, Fliedner A. Environmental hazard assessment of pharmaceuticals. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1997;25(3):220-225. doi:10.1006/rtph.1997.1102
36. Hou B, Lim E-K, Higgins GS, Bowles DJ. N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*. 2004;279(46):47822-47832. doi:10.1074/jbc.M409569200
37. Houwink AL.. The conduction of excitation in *Mimosa pudica*. *Recueil des travaux botaniques neerlandais* 1935;32: 51-91.
38. Huang HH, Lin LH, Zhang P, Qi XL, Zhong DF. Formation of glucoside conjugate of

- acetaminophen by fungi separated from soil. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2006;31(2):103-108. doi:10.1007/BF03191126
39. Huang Q, Bu Q, Zhong W, Shi K, Cao Z, Yu G. Derivation of aquatic predicted no-effect concentration (PNEC) for ibuprofen and sulfamethoxazole based on various toxicity endpoints and the associated risks. *Chemosphere*. 2018;193:223-229. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.11.029
 40. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360(8):765-773. doi:10.1056/NEJMoa0808710
 41. Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, Pascarella L, Parrella A. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Sci Total Environ*. 2005;346(1-3):87-98. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.11.017
 42. Joachim S, Beaudouin R, Daniele G, et al. Effects of diclofenac on sentinel species and aquatic communities in semi-natural conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021;211:111812. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111812.
 43. Karol KG, Sleith RS. Discovery of the oldest record of *Nitellopsis obtusa* (Charophyceae, Charophyta) in North America. *J Phycol*. 2017;53(5):1106-1108. doi:10.1111/jpy.12557
 44. Kergaravat S V, Hernández S R, Gagneten A M. Second-, third- and fourth-generation quinolones: Ecotoxicity effects on *Daphnia* and *Ceriodaphnia* species. *Chemosphere*. 2021;262:127823. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127823.
 45. Kim Y, Choi K, Jung J, Park S, Kim P, Park J. Aquatic Toxicity of Acetaminophen, Carbamazepine, Cimetidine, Diltiazem and Six Major Sulfonamides, and Their Potential Ecological Risks in Korea. *Environment international*. 2007;33:370-375. doi:10.1016/j.envint.2006.11.017
 46. Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, et al. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. *Environ Sci Technol*. 2002;36(6):1202-1211. doi:10.1021/es011055j
 47. Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD. Response to comment on, ‘Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: a national reconnaissance’. *Environ Sci Technol*. 2002;36:4007–4008
 48. Korsch H, Doege A, Raabe U, van der Weyer K. Rote Liste der Armleuchteralgen (Charophyceae) Deutschlands. *Haussknechtia Beiheft*. 2012;17, 1–32.
 49. Krause W. Über die Standortsansprüche und das Ausbreitungsverhalten der Stern Armleuchtealge *Nitellopsis obtusa* (Desvaux) J. Groves. *Carolina*. 1985;42, 31–42.

50. Larkin DJ, Monfils AK, Boissezon A, et al. Biology, ecology, and management of starry stonewort (*Nitellopsis obtusa*; Characeae): A Red-listed Eurasian green alga invasive in North America. *AQUAT BOT.* 2018;148:15-24. doi:10.1016/j.aquabot.2018.04.003.
51. Lunevsky VZ, Zherelova OM, Vostrikov IY, Berestovsky GN. Excitation of Characeae cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels. *J Membrin Biol.* 1983;72(1):43-58. doi:10.1007/BF01870313
52. Manusadžianas L, Gylytė B, Grigutyte R, Karitonas R, Sadauskas K, Vitkus R, Šiliauskas L, Vaičiūnienė J. Accumulation of copper in the cell compartments of charophyte *Nitellopsis obtusa* after its exposure to copper oxide nanoparticle suspension. *Environmental Science and Pollution Research.* 2017;24:27653–27661 DOI 10.1007/s11356-016-8023.
53. Marchlewicz A, Guzik U, Hupert-Kocurek K, Nowak A, Wilczyńska S, Wojcieszynska D. Toxicity and biodegradation of ibuprofen by *Bacillus thuringiensis* B1(2015b). *Environ Sci Pollut Res Int.* 2017;24(8):7572-7584. doi:10.1007/s11356-017-8372-3
54. McCourt R M, Karol K G, Guerlesquin M, Feist M. Phylogeny of extant genera in the family Characeae (Charales, Charophyceae) based on rbcL sequences and morphology. *Am. J. Bot.* 1996;83, 125–131.
55. Messner B, Thulke O, Schäffner AR. Arabidopsis glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates. *Planta.* 2003;217(1):138-146. doi:10.1007/s00425-002-0969-0
56. Minguez L, Pedelucq J, Farcy E, Ballandonne C, Budzinski H, Halm-Lemeille M-P. Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016;23(6):4992-5001. doi:10.1007/s11356-014-3662-5
57. Nieto E, Blasco J, González-Ortegón E, Drake P, Hampel M. Is *Atyaephyra desmarestii* a useful candidate for lethal and sub-lethal toxicity tests on pharmaceutical compounds? *J Hazard Mater.* 2013;263 Pt 1:256-265. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.08.035
58. Oikawa A, Matsuda F, Kikuyama M, Mimura T, Saito K. Metabolomics of a single vacuole reveals metabolic dynamism in an alga *Chara australis*. *Plant Physiology.* 2011;157:544–551 DOI 10.1104/pp.111.183772.
59. Orvos DR, Versteeg DJ, Inauen J, Capdevielle M, Rothenstein A, Cunningham V. Aquatic toxicity of triclosan. *Environ Toxicol Chem.* 2002;21(7):1338-1349.
60. Osterhout WJV. Chemical restoration in nitella : ii. Restorative action of blood. *Journal*

- of General Physiology*. 1936;19(3):423-425. doi:10.1085/jgp.19.3.423.
61. Parolini M, Binelli A, Provini A. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2011;74:1586-1594. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.04.025
 62. Posthuma L, Traas TP, Suter II GW. General introduction to species sensitivity distributions CRC, Boca Ratón. 2002;–10
 63. Pounds N, Maclean S, Webley M, Pascoe D, Hutchinson T. Acute and chronic effects of ibuprofen in the mollusc *Planorbis carinatus* (Gastropoda: Planorbidae). *Ecotoxicol Environ Saf*. 2008;70(1):47-52. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.07.003
 64. Quinn B, Schmidt W, O'Rourke K, Hernan R. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. *Chemosphere*. 2011;84:657-663. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.03.033
 65. Ricca U. Transmission of stimuli in plants. *Nature* 117. 1916.
 66. Richman A, Swanson A, Humphrey T, et al. Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. *Plant J*. 2005;41(1):56-67. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02275.x
 67. Salomon M. Arzneimittel in der aquatischen Umwelt. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*. 2005;17:1-4. doi:10.1007/BF03038695
 68. Sandermann HJ. Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics and Genomics*. 1994;4(5):225-241.
 69. Sanjuan Girbau J, Martín-Closas C. Biogeographic history of two Eurasian Cenozoic charophyte lineages. *Aquatic Botany*. 2015;120:18-30. doi:10.1016/j.aquabot.2014.05.018
 70. Schloesser DW, Hudson PL, Nichols SJ. Distribution and habitat of *Nitellopsis obtusa* (Characeae) in the Laurentian Great Lakes. *Hydrobiologia*. 1986;133(1):91-96. doi:10.1007/BF00010806
 71. Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J, Püttmann W. Humanpharmakawirkstoffe in der Umwelt: Einträge, Vorkommen und der Versuch einer Bestandsaufnahme. *UWSF - Z Umweltchem Ökotox*. 2007;19(3):168-179. doi:10.1065/uwsf2007.07.202
 72. Snow R. Conduction of excitation in stem and leaf of *Mimosa pudica*. *Proceedings of the Royal Society London*. 1924;B 96: 349-374
 73. Soulié-Märsche I, Benammi M, Gemayel P. Biogeography of living and fossil *Nitellopsis*

- (Charophyta) in relationship to new finds from Morocco. *Journal of Biogeography*. 2002;29(12):1703-1711. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2002.00749.x>
74. Stahlberg R, Robert E, Cleland, van Volkenburgh Elizabeth. Slow wave potentials – a propagating electrical signal unique to higher plants. In: Baluska F, Mancuso S, Volkmann D, editors. *Communication in plants. Neuronal aspects of plant life*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2006;291–309.
75. Stankovic T, Kidd AM, Sutcliffe A, et al. ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. *Am J Hum Genet*. 1998;62(2):334-345. doi:10.1086/301706
76. Stewart N F, Church J M. Red data book of Britain and Ireland: Stoneworts. Joint Nature
77. Suzdalev S., Antibiotikai ir kitos farmacinės medžiagos mus supančioje aplinkoje: ką apie tai žinome? Nuotolinė konferencija „Antimikrobinis atsparumas COVID-19 infekcijos kontekste“, 2020.https://www.hi.lt/uploads/pdf/pranesimai/2020/AB_konferen_2020-11-18/Antiobiotikai_ir_kt.pdf
78. Trombini C, Hampel M, Blasco J. Evaluation of acute effects of four pharmaceuticals and their mixtures on the copepod *Tisbe battagliai*. *Chemosphere*. 2016;155:319-328. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.04.058
79. Umrath K. Untersuchungen über Plasma und Plasmaströmung an Characeen. IV. Potential messungen an *Nitella mucronata* mit besonderer Berücksichtigung der Erregungserscheinung. *Protoplasma*. 1930;9:576–597. 10.1007/BF01943373.
80. Vodeneev V, Katicheva L, Sukhov V. Electrical signals in higher plants: Mechanisms of generation and propagation. *Biophysics*. 2016;61:505-512. doi:10.1134/S0006350916030209
81. Wood RD. New Combinations and Taxa in the Revision of Characeae. *TAXON*. 1962;11(1):7-25. doi:<https://doi.org/10.2307/1216853>
82. Zimmermann NE, Yoccoz NG, Edwards TC, et al. Climatic extremes improve predictions of spatial patterns of tree species. *PNAS*. 2009;106(Supplement 2):19723-19728. doi:10.1073/pnas.0901643106.