

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Neurobiofizikos bakalauro studijų programos IV kurso studentė

Eglė PLUKAITĖ

Bakalauro baigiamasis darbas

***Nitellopsis obtusa* veikimo potencialų sklidimo greičio ląstelėse ir
tarpląstelinio perdavimo tyrimas**

Darbo vadovas:
Doc. dr. V. Kisnierienė

Darbo konsultantas:
Vilmantas Pupkis

Vilnius 2021

TURINYS

Santrumpos	3
ĮVADAS	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1. Veikimo potencialo generavimas.....	6
1.2. Centrinės vakuolės įtaka AP generavimui	8
1.3. Veikimo potencialo sklidimas ląstelėje	9
1.4. Plazmodezmos	10
1.5. Tarpląstelinis perdavimas	11
1.6. Citoplazminis judėjimas	11
1.7. Variabilus potencialas.....	12
1.8. Kalcio pernašos sistemos augalų ląstelėse.....	13
1.9. Verapamilas	14
1.10. <i>Nitellopsis obtusa</i>	14
2. METODIKA.....	16
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	21
3.1. Veikimo potencialo sklidimas vienoje ląstelėje.....	21
3.1.1. Kontroliniai eksperimentai	21
3.1.2. Verapamilo įtaka.....	22
3.2. Veikimo potencialo tarpląstelinis perdavimas	29
3.2.1. Kontroliniai eksperimentai	29
3.2.2. Verapamilo įtaka.....	30
3.3. Rezultatų aptarimas.....	32
IŠVADOS	34
SANTRAUKA	35
SUMMARY	36
LITERATŪRA	38

Santrumpos

AP – veikimo potencialas (angl. *action potential*)

VP – variabilus potencialas (angl. *variation potencial*)

PD – plazmodezma (angl. *plasmodesmata*)

APW – kontrolinis tirpalas (angl. *artificial pond water*)

H⁺-ATPazė – protonų siurblys (angl. *proton pump*)

HEPES – C₈H₁₈N₂O₄S – 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfoninė rūgštis (buferis)

TRIS – C₄H₁₁NO₃ – hidroksimetilaminometanas (buferis)

IVADAS

Aplinkos suvokimas ir prisitaikymas prie jos yra būtini procesai gyvų organizmų išlikimui. Gyvūnų karalystėje šiuos procesus valdo nervų sistema – elektriniais signalais koduota informacija specializuotomis ląstelėmis keliauja į reikiamus organus ir aktyvuoja funkcinius, morfologinius, genetinius pakitimus, sukelia mechaninį organizmo judesį. Nors augalai ir neturi nervų sistemos, jie taip pat geba fiksuoti aplinkos sąlygas ir atitinkamai vykdyti pokyčius organizmo viduje. Norint sukelti sisteminį augalo atsaką į išorinį veiksnių ir pakitimus atlikti tiesioginio kontakto su dirgikliu neturėjusioje organizmo dalyje, reikalingi didelį atstumą įveikiantys signalai. Tokie signalai augaluose gali būti cheminiai (Pieterse et al., 2012), hidrauliniai (Christmann et al., 2013) ir elektriniai (Fromm ir Lautner, 2007).

Gebėjimą generuoti elektrinius signalus ląstelei suteikia plazminės membranos selektyvus pralaidumas jonams ir dėl jo susidaręs skirtingas jonų turinys bei krūvių skirtumas priešingose membranos pusėse. Manipuliuodami jonų ir kitų cheminių medžiagų turiniu ląstelės išorėje, galime paveikti jonų pernašos sistemas ir gauti informacijos apie elektrinių potencialų augaluose generavimą, sklidimą ir jų parametrus įtaką darančius faktorius (Kisnieriene et al., 2018). Tačiau aukštesniųjų augalų ląsteles sunku atskirti nuo organizmo, izoliuoti ir manipuliuoti jų aplinkine terpe, todėl augalų elektrofiziologiniams tyrimams dažnai naudojami didžiules, pailgas ląsteles turintys, *Charophytes* tipui priklausančios menturdumbliai (Beilby, 2007).

Šiuo metu yra žinomi trijų tipų elektriniai signalai augaluose: veikimo, variabilūs (Vodeneev et al., 2015) ir sisteminiai (Zimmermann et al., 2009) potencialai. Iš išvardintųjų, veikimo potencialai tyrinėjami plačiausiai, o jų generavimo mechanizmas bei parametrai išsamiai išaiškinti (Beilby, 2007), tačiau sklidimo parametrai, tokie kaip greitis ir tarpląstelinis perdavimas, bei jiems poveikį darantys veiksniai nėra gerai žinomi. Yra mažai duomenų, kaip įvairios biologiškai aktyvios medžiagos veikia AP sklidimą. Vienas iš tokių potencialių junginių – gyvūninių ląstelių L-tipo Ca^{2+} jonų kanalų blokatorius verapamilas. Nors augaluose L-tipo Ca^{2+} jonų kanalų nėra ir tikslus verapamilo veikimo mechanizmas nėra nustatytas, tyrimai su menturdumbliais indikuoja Ca^{2+} jonų kanalų blokavimo poveikį (Koselski et al., 2021; Tsutsui et al., 1987), o mažesnis Ca^{2+} jonų pritekėjimas į citoplazmą galėtų veikti ir veikimo potencialo sklidimo parametrus. Šio bakalaurnio darbo tyrime tirti du menturdumblio *Nitellopsis obtusa* veikimo potencialo sklidimo parametrai – greitis pavienėse

ląstelėse bei tarpląstelinis perdavimas ląstelių porose, kontrolinėmis sąlygomis ir ląsteles veikiant 0,1 mM verapamilio tirpalu.

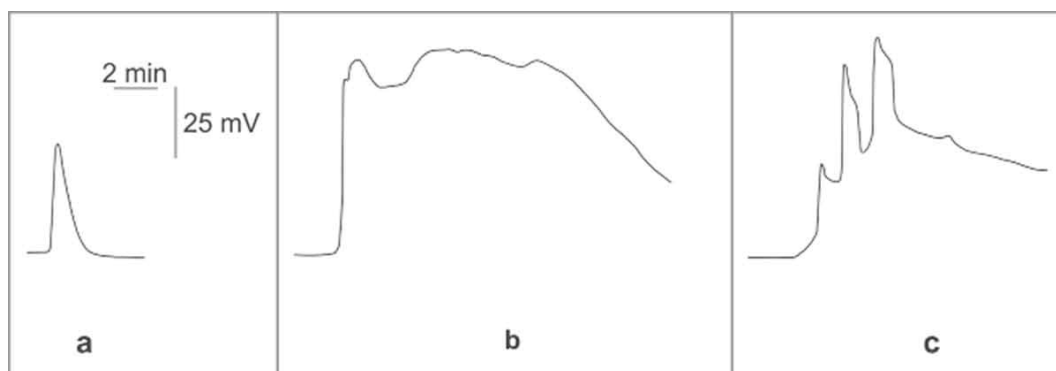
Darbo tikslas – įvertinti veikimo potencialo sklidimo greitį *Nitellopsis obtusa* ląstelėje, tarpląstelinį perdavimą bei verapamilio įtaką šiems parametrams.

Uždaviniai:

- Įvertinti veikimo potencialo sklidimo greitį ląstelėje kontrolinėmis sąlygomis;
- Nustatyti veikimo potencialo sklidimo greitį ląstelę veikiant 0,1 mM verapamilio tirpalu;
- Įvertinti veikimo potencialo tarpląstelinį perdavimą kontrolinėmis sąlygomis;
- Nustatyti 0,1 mM verapamilio įtaką veikimo potencialo tarpląsteliniai perdavimui.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

Augaluose sukulto elektrinio signalo tipas priklauso nuo dirgiklio – įprastai veikimo potencialas (AP) sukeliamas nežalojančių aplinkos veiksnių (pvz., prisilietimų, šalčio ar šviesos), o variabilus potencialas (VP) sukeliamas žalojančių aplinkos veiksnių (pvz., karščio ar traiškymo) (Vodeneev et al., 2015). Abu elektriniai signalai veikia per laikiną plazminės membranos depoliarizaciją, tačiau potencialų dinamika ir parametrai yra skirtingi (**1.1 pav.**).



1.1 pav. Skirtingais stimuliais sukelti elektriniai signalai moliūgo sodinuko hipokotilyje: a) veikimo potencialas, sužadintas ledinio vandens; (b) variabilus potencialas be spaikų, sužadintas veikiant augalo lapą ugnimi; (c) variabilus potencialas su spaikais, sužadintas veikiant augalo lapą ugnimi (Vodeneev et al., 2015).

1.1. Veikimo potencialo generavimas

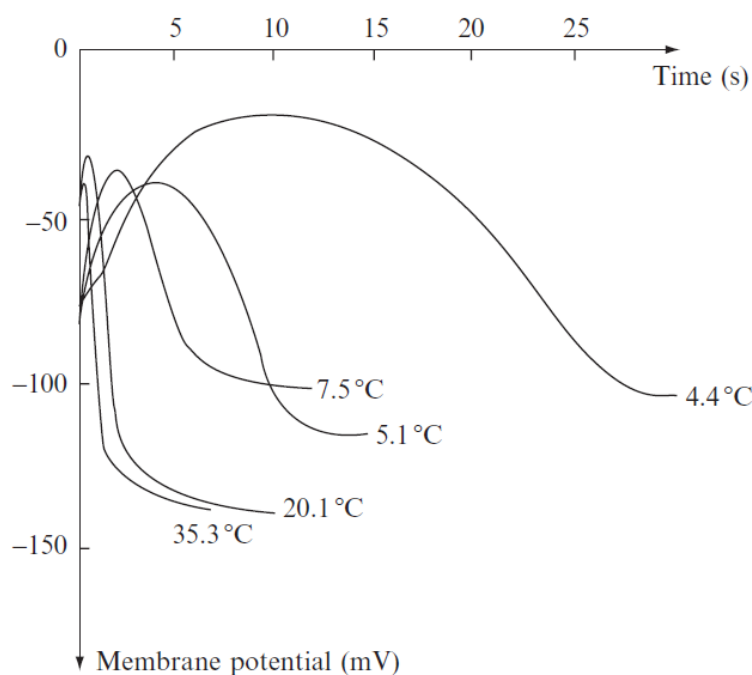
AP generavimui gyvūnų ląstelėse svarbiausi Na^+ jonai – depoliarizacijai, ir K^+ jonai – repoliarizacijai (Raghavan et al., 2019), o augaluose šias funkcijas atlieka Ca^{2+} , Cl^- ir K^+ jonai. AP generacija augalų ląstelėse prasideda Ca^{2+} jonų srove iš endoplazminio tinklo į citoplazmą, nors pagal Thiel-Beilby modelį, *Chara* dumbliuose kalcio jonų srautai į citoplazmą yra du – trumpalaikis srautas iš ląstelės išorės ir srautas iš vidinių saugyklų (Beilby ir Al Khazaaly, 2016). Nepaisant jonų turinio ekstraląstelinėje terpėje, *Characeae* šeimos dumblių ląstelėms svarbu citoplazmoje palaikyti mažą Ca^{2+} jonų koncentraciją, kad sužadinus ląstelę ji galėtų išaugti (Kisnieriene et al., 2018). Padidėjusi Ca^{2+} koncentracija citoplazmoje aktyvuoja nuo įtampos priklausomus Cl^- jonų kanalus, anijonai plūsta iš ląstelės, ir tuo pačiu inaktyvuojama H^+ -ATPazė – vyksta depoliarizacija. Dar nepasiekus depoliarizacijos piko, aktyvuojami nuo įtampos priklausomi K^+ kanalai, reaktyvuojama

H⁺-ATPazė, tad K⁺ ir H⁺ juda iš ląstelės. Dėl Ca²⁺ kanalų inaktyvavimo ir Ca²⁺-ATPazės aktyvavimo citoplazmoje mažėja Ca²⁺ jonų koncentracija – vyksta repoliarizacija (Sukhov, 2016; Sukhov ir Vodeneev, 2009), ir membranos potencialas ilgainiui atsistato į ramybės būsenos vertę.

Nuo AP generacijos pradžios praeina tam tikras laikotarpis, vadinamas absoliučiuoju refrakteriniu periodu, kuomet naujo AP generacija negali būti pradėta, nepriklausomai nuo stimulo tipo ar intensyvumo. Po šio laikotarpio seka santykinis refrakterinis periodas, kurio metu naujas AP gali būti sužadintas, tačiau su intensyvesniu stimulu, kadangi plazminės membranos potencialas dar nebūna grįžęs į ramybės būsenos vertę. Vienas svarbiausių refrakterinį periodą augalų ląstelėse lemiančių veiksnių – mažos Ca²⁺ jonų koncentracijos atstatymas ląstelės citozolyje (Price et al., 1994; White ir Broadley, 2003). Lyginant su AP generavimo trukme bei refrakteriniais periodais gyvūnų ląstelėse, trunkančiais milisekundes (Raghavan et al., 2019), refrakteriniai periodai augalų ląstelėse trunka ilgai – pavyzdžiui, kerpsamanių *Conocephalum conicum* refrakteriniai periodai trunka keletą minučių (Dziubińska et al., 1983), o saulėgražos *Helianthus annuus* – keletą valandų (Zawadzki et al., 1991).

AP generavimui galioja „viskas arba nieko“ dėsnis – esama slenkstinio membranos potencialo vertės, kurios nepasiekus AP nėra generuojamas, o pasiekus – ne tik generuojamas, bet ir pasiekama maksimali amplitudė. AP iniciavimas *Characeae* šeimos dumbliuose priklauso ne tik nuo potencialo pokyčių, bet ir nuo Ca²⁺ jonų kanalų aktyvumo – į citoplazmą turi pritekėti pakankamas kiekis Ca²⁺ jonų (Beilby, 2007). Įprastomis sąlygomis AP amplitudė visuomet vienoda ir nepriklauso nuo stimulo stiprumo, o jos pokyčiai siejami su plazminės membranos Ca²⁺ ir/ar Cl⁻ kanalų aktyvacija arba slopinimu (Beilby ir Al Khazaaly, 2016). Gyvūninėse ląstelėse AP depoliarizacija paprastai pasiekia teigiamas vertes, o augaluose pikas dažniausiai neperkopia į teigiamų verčių pusę (Beilby, 2007). Tačiau elektrodą įvedus į *Nitellopsis obtusa* ląstelės vakuolę AP pikas taip pat būna teigiamas (Kisnieriene et al., 2019). Įprastomis sąlygomis AP forma griežtai apibrėžta, tačiau mažėjant temperatūrai AP depoliarizacijos greitis mažėja, tad pakinta ir AP forma (**1.2 pav.**) (Beilby ir Coster, 1976).

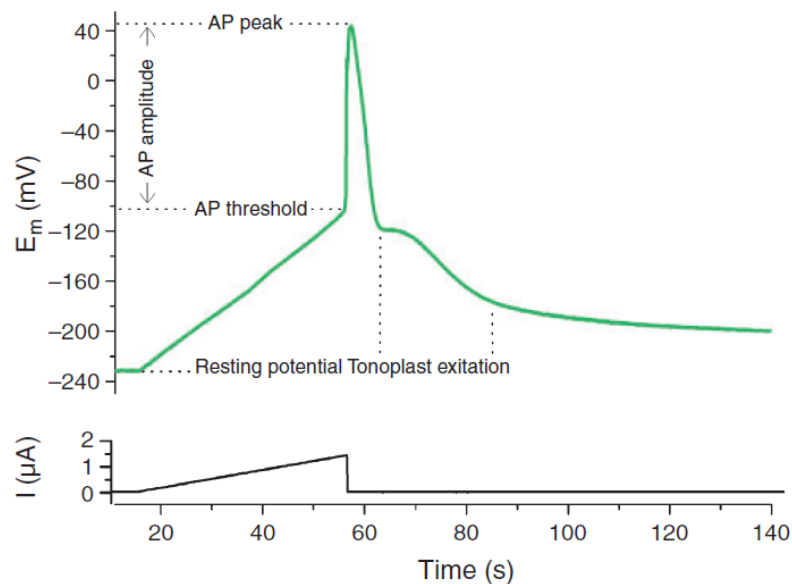
Yra cheminių ir fizinių faktorių, kurie gali paveikti jonų pernašos sistemas, dalyvaujančias elektrinių signalų augaluose generavime, pakeisti AP parametrus, tokius kaip slenkstinis potencialas ar amplitudė, arba visai stabdyti AP generavimą (Kisnieriene et al., 2018).



1.2 pav. Veikimo potencialo generavimo trukmė menturdumblyje *Chara corallina*, esant skirtingoms temperatūroms (Beilby ir Coster, 1976).

1.2. Centrinės vakuolės įtaka AP generavimui

Kitaip nei gyvūnų ląstelėse, augalų ląstelių AP generavime dalyvauja dvi membranos – plazminė membrana ir centrinės vakuolės membrana, vadinama tonoplastu. Vakuolės AP generuojamas lėčiau ir turi mažesnę amplitudę nei plazminės membranos AP (**1.3 pav.**) (Kisnieriene et al., 2018). Dėl tonoplaste esančių nuo Ca^{2+} jonų koncentracijos priklausomų jonų, pvz., Cl^- ir Ca^{2+} , pernašos sistemų, sužadinus plazminę membraną ir citozolyje išaugus Ca^{2+} jonų koncentracijai, susižadina ir centrinės vakuolės membrana (Kikuyama ir Munehiro, 2001). Abi membranos yra skirtingai poliarizuotos: plazminės membranos ramybės potencialas svyruoja nuo -80 mV iki -200 mV ir daugiau (Kisnieriene et al., 2018), t.y. žymiai neigiamesnis nei gyvūnų ląstelių (Raghavan et al., 2019), o tonoplasto potencialas svyruoja nuo 0 mV iki 30 mV (Bethmann et al., 1995). Abiejose membranose yra ir protonų siurbliai, pumpuojantys H^+ iš citozolio į ląstelės išorę, plazminės membranos atveju, ir į vakuolę, tonoplasto atveju (Buch-Pedersen et al., 2009).



1.3 pav. Tipinis *Nitellopsis obtusa* veikimo potencialas (viršuje) ir jį sukėlęs elektrinis stimulus (apačioje) (Kisnieriene et al., 2018).

1.3. Veikimo potencialo sklidimas ląstelėje

AP sklinda tik gyvuose audiniuose: dumbliuose ir samanose simplastiškai organizmo ląstelėmis, o aukštesniuose augaluose - simplastiškai floemos (rėtinių indų) plokštelėmis ir parenchiminėmis ląstelėmis. Rėtinių indų plokštelėse yra varžą mažinančios poros, todėl nuo parenchiminių ląstelių skiriasi elektrofiziologiškai – elektriniu laidumu (Fromm ir Lautner, 2007). Pagal Sukhov ir kitų mokslininkų modelį, AP sklidimui svarbu ne tik elektrinis laidumas, bet ir H^+ -ATPazės aktyvumas; o žinodami apie mažą H^+ -ATPazių koncentraciją rėtiniuose induose (Fleurat-Lessard et al., 1997), mokslininkai padarė išvadą, kad floema – gera, tačiau neoptimali terpė AP sklidimui (Sukhov et al., 2011).

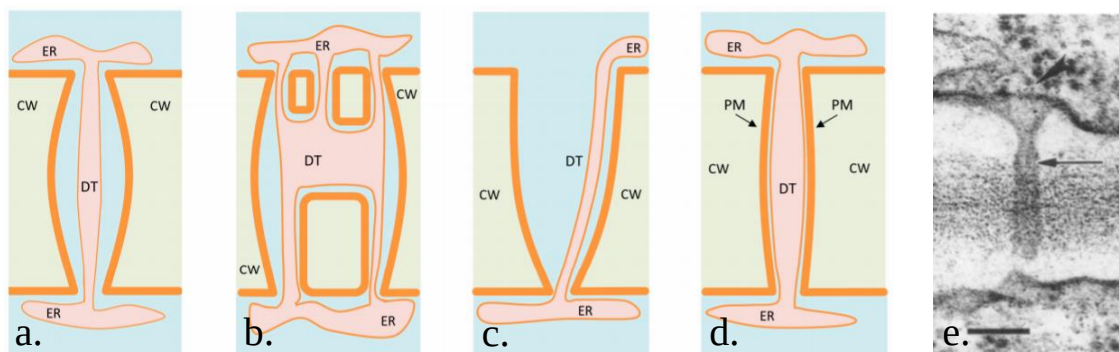
Manoma, kad AP sklinda pasyviai, sužadintos membranos srities depoliarizacijai stimuliuojant nesužadintą sritį, ir taip keliauja ląstele ar ląstelių grandinėmis (Fromm ir Lautner, 2007). Skirtingose augalų rūšyse AP sklidimo greitis svyruoja nuo 0,1 cm/s iki 10 cm/s (Sukhov, 2016), t.y. apie 10 ar net 10^3 kartų lėčiau nei neuronuose (Raghavan et al., 2019). Jei ląstelės membranos ir išorinės terpės elektrinės savybės yra homogeniškos kiekviena atskirai, AP sklidimo greitis ląstelėje yra pastovus, išskyrus vietose aplink bamblių. Eksperimentais su menturdumblio *Chara braunii* tarpubamblinėmis ląstelėmis APW terpėje nustatytas 1,5 cm/s AP sklidimo greitis, kuris artėjant prie bamblio (~2 cm iki bamblio) išaugo iki 5,7 cm/s (Tabata ir Sibaoka, 1987).

1.4. Plazmodezmos

Augalų ląsteles gaubia ne tik plazminė membrana, bet ir ląstelės sienelė, tad reikalingos specialios struktūros vykdyti tarpląstelinę komunikaciją. Augalų gretimų ląstelių citoplazmą tiesiogiai jungia plazmodezmos (PD) – baltyminės struktūros ląstelių sienelėse, kurių dėka iš ląstelės į ląstelę simplastiškai gali pereiti ir cheminiai junginiai, ir elektriniai signalai (Sager ir Lee, 2014).

Plazminė membrana augaluose nėra atskiras kiekvienos ląstelės darinys, o vientisa struktūra, gaubianti PD ir einanti ištiesai jų jungiamomis ląstelėmis. PD ertmės centrą dažnai veria baltyminė struktūra, vadinama desmotubule (**1.4 pav.**), jungianti gretimų ląstelių endoplazminį tinklą (Oparka, 1993), tad pro PD gali praeiti tik atitinkamos molekulinės masės molekulės. Dumbliai, turintys didžiules ląsteles, pvz. *Nitella*, desmotubulių neturi ir pro jas gali praeiti makromolekulės iki 45 kDa (Kikuyama et al., 1992). Neskaitant gausaus endoplazminio tinklo *Chara* menturdumblių ląstelių periferijoje, desmotubulės taip pat randamos retai (Cook et al., 1997). Nepaisant to, *Characeae* dumblių PD labai panašios į aukštesniųjų augalų (Franceschi et al., 1994).

Tipinės vieno kanalo PD diametras yra apie 30 nm, o ilgis - vidutiniškai 100 nm, tačiau priklausomai nuo audinio prigimties ir amžiaus PD struktūra gali varijuoti (**1.4 pav.**)(Dorokhov et al., 2019).



1.4 pav. Skirtingų tipų plazmodezmų iliustracijos (Dorokhov et al., 2019) ir realios plazmodezmos elektroninės mikroskopijos nuotrauka (Cook et al., 1997): a) paprasta, tipinė vieno kanalo PD; b) sudėtinga, daugiakanalė PD; c) piltuvėlio formos PD, matoma *Arabidopsis* šaknų audiniuose; d) nepereinama PD, randama mitotiškai aktyviuose audiniuose po citokinezės; e) menturdumblio *Chara zeylanica* menturio bamblio PD (pažymėta rodykle). Juoda juostelė žymi 50 nm; ER – endoplazminis tinklas, CW – ląstelės sienelė, DT – desmotubulė, PM – plazminė membrana.

1.5. Tarpląstelinis perdavimas

Chlorofilo mikrofluorometrijos būdu nustatyta, kad apšviestuose *Chara australis* menturdumbliuose iš vienos ląstelės į gretimą simplastiškai pereina apie 30% į citoplazmą chloroplastų išskirtų metabolitų (Bulychev, 2019). Tuo pačiu tyrimu pastebėtas ir tarpląstelinio transporto jautrumas osmoliaringumui – eksperimentinį tirpalą papildžius 0,2 M sorbitoliu, dėl slėgio gradiento metabolitų transportas ląstelėje liko nepaveiktas, o tarpląstelinis metabolitų perdavimas – sustabdytas.

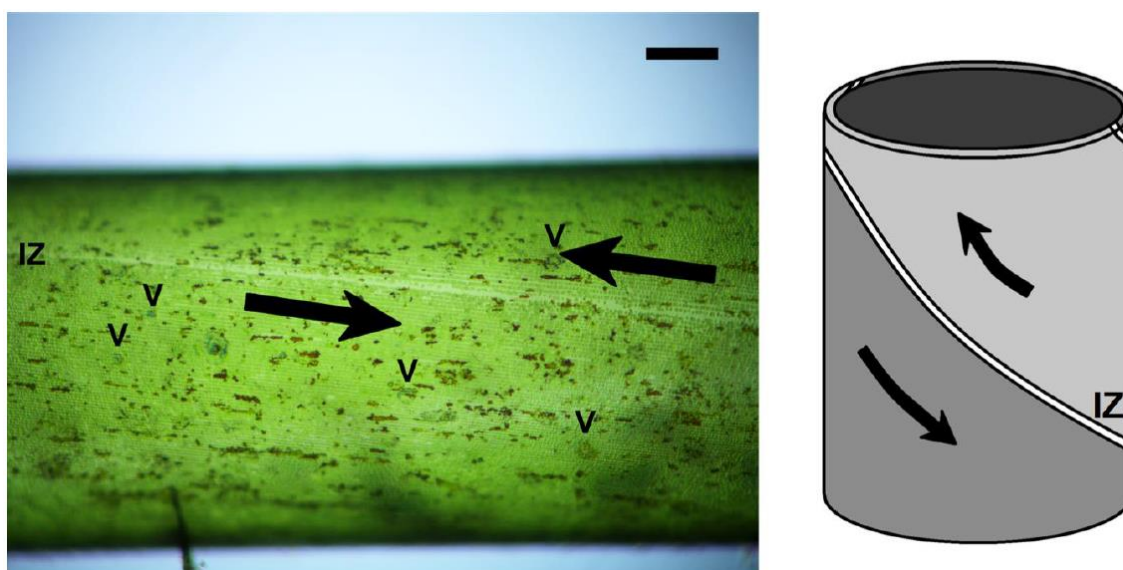
Pastebėta, kad sužadinus tarpubamblių, bamblio ląstelių elektrinis aktyvumas nebūna paveiktas, tačiau depoliarizacija persiduoda į gretimą tarpubamblių (Sibaoka ir Tabata, 1981). Eksperimentais su *Chara corallina* nustatytas sezoniškumo poveikis simplastiniam AP pralaidumui: žiemos metu AP perdavimas per plazmodezmą buvo ribotas, o pavasario mėnesiais, keičiantis ir morfologinėms, ir elektrofiziologinėms savybėms dėl ruošos dauginimosi periodui, tarpląstelinė komunikacija suintensyvėjo (Shepherd ir Goodwin, 1992). Kitu tyrimu su *Chara corallina* ląstelėmis pastebėtas ryškus bamblio varžos padidėjimas dėl keleto faktorių: turgoro slėgio pokyčių, senesnio ląstelių amžiaus, mažos ATP koncentracijos citoplazmoje ir ląstelių nukirpimo (Reid ir Overall, 1992). Iš bamblių susijungusios *Chara corallina* ląstelių poros iškirpus vieną ląstelę, antrojoje stebimas elektrinis aktyvumas, pasireiškiantis ilgai besitęsiančia depoliarizacija, kartais lydima AP ar nedidelių spaių (Shimmen, 2001). Ilga depoliarizacija užregistruota visose tirtose ląstelėse, tačiau spėjama, kad ji per bamblių neperėjo, o susigeneravo antrojoje ląstelėje; tačiau AP persidavė iš nukirptosios, nors buvo užregistruoti tik dalyje tiriamų ląstelių.

1.6. Citoplazminis judėjimas

Tarp dviejų membranų esančios citoplazmos storis labai mažas, *Charophytes* tipo menturdumbliuose vos 10 μm , o dėka aktino gijomis keliaujančio nešiklio miozino citoplazma pastoviai juda. Menturdumbliuose judėjimo aplink vakuolę greitis 100 $\mu\text{m/s}$, priklausomai nuo temperatūros (Beilby, 2007). Citoplazmos judėjimo kryptis *N. obtusa* ląstelėse panaši į dvi susisupusias spirales (**1.5 pav.**) – vienos srautas juda į viršų, kitos į apačią, ir abu srautai susijungia ties bambliais. Judėjimo funkcija siejama su organelių ir makromolekulių tolygiu pasiskirstymu, kadangi didelėse ląstelėse pasyvi difuzija nėra efektyvi. Citoplazmos judėjimas išjudina ir vakuolės turinį, tačiau kuo toliau nuo vakuolės

membranos, tuo judėjimas mažesnis, ir vakuolės centre visai išnyksta (Kamiya ir Kuroda, 1956).

Pastebėta, kad AP generavimo metu citoplazminis judėjimas augalo ląstelėje nevyksta – Ca^{2+} jonų koncentracijos padidėjimas depoliarizacijos metu stabdo miozino veiklą, tad citoplazminis judėjimas sustoja (Morimatsu et al., 2000) ir pradinį greitį įgyja tik po 5-10 min (Tazawa ir Kishimoto, 1968). Dėl šio reiškinio citoplazma neišteka iš ląstelės pro pažeistą plazminę membraną, o veikimo potencialo generavimą galima atpažinti tiesiog stebint optiniu mikroskopu (Pupkis et al., 2020).



1.5 pav. Citoplazminis judėjimas *Nitellopsis obtusa* ląstelėje: ląstelė 40x didinimu (kairėje) ir sisteminis citoplazminio judėjimo modelis (dešinėje). Juoda juostelė žymi 200 μm , rodyklės – judėjimo kryptį, IZ – nejudanti sritis, V – judančios vezikulės. (Pupkis et al., 2020).

1.7. Variabilus potencialas

VP gali skliti ne tik gyvuose, bet ir neaktyviuose, mirusiuose audiniuose (Fromm ir Lautner, 2007). VP negalioja „viskas arba nieko“ dėsnis, amplitudės dydis nefiksuotas, proporcingas sudirginimo intensyvumui. VP turi nepastovią formą su dviem pagrindinėmis komponentėmis: ilgalaikė depoliarizacija (**1.1 pav.**, b), trunkanti minutę ar daugiau, lėtai sklindanti (mm per s), ir su plačiai kintančia amplitude (dešimtys mV); ir greiti depoliarizacijos impulsai, panašūs į AP (**1.1 pav.**, c) (Vodeneev et al., 2015).

Atsiradus stimului, VP susiformuoja ne iškart – praeina tam tikras vėlinimo laikas. Pastebėta, kad sužeidus stiebą ar lapą, pirmiausia jų diametras padidėja dėl hidraulinės srovės, o tik paskui sugeneruojamas VP. Hidraulinė srovė galimai susijusi su potencialo inicijavimu,

nes sumažinus srovės amplitudę pailgėja potencialo vėlinimo laikas, o padidinus ksilemos hidraulinį slėgį, sukelti VP panašūs potencialai (Stahlberg ir Cosgrove, 1997). VP sklaidimo greitis ir amplitudė slopsta signalui tolstant nuo sudirgintos vietos (apie 10% per cm); slopimo greitis, manoma, taip pat priklauso nuo dirgiklio intensyvumo, o sklaidimo parametrai gali tiesiogiai paveikti augalo fiziologinį atsaką (Vodeneev et al., 2015).

1.8. Kalcio pernašos sistemos augalų ląstelėse

Ramybės būsenai būdingą, pastovią $<1 \mu\text{M}$ Ca^{2+} jonų koncentraciją augalų ląstelių citozolyje palaiko Ca^{2+} -ATPazės ir $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporteriai (Mimura ir Tazawa, 1983). Abi jonų pernašos sistemos priešinasi elektrocheminiam Ca^{2+} jonų gradientui ir naudoja energiją: Ca^{2+} -ATPazė – ATP hidrolizės energiją, o $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporteriai – protonų elektrocheminio gradiento energiją. Signalų iniciacijos metu Ca^{2+} jonų koncentracija citozolyje turi išaugti, o šią funkciją atlieka Ca^{2+} jonams pralaidūs kanalai, kurie paklūsta elektrocheminiam Ca^{2+} jonų gradientui ir vykdo pasyvią Ca^{2+} jonų pernašą. Kalciui pralaidūs jonų kanalai randami plazminėje membranoje, vakuolės bei kitose vidinėse ląstelės membranose, o priklausomai nuo aktyvacijos, kanalai gali būti lėtos (milisekundžių) ir greitos (sekundžių) aktyvacijos, skirtingai priklausyti nuo įtampos, ligandų, ir net nuo pačių Ca^{2+} jonų koncentracijos (apžvelgta Demidchik et al., 2018). Augalų ląstelėse taip pat esama ir mechano-jautrių Ca^{2+} jonų kanalų, kurie aktyvuojasi sureagavę į plazminės membranos įtempimo ar osmosinius pokyčius (Hamilton et al., 2015).

Centrinės vakuolės membranoje daugiausiai TPC/SV (Two-Pore-Channels/Slow Vacuole) – nuo įtampos ir Ca^{2+} jonų koncentracijos priklausomų, lėtai aktyvuojamų, neselektyvių katijonų kanalų. Manoma, kad citozolyje esant pakankamai didelei kalcio jonų koncentracijai, aktyvuojami TPC/SV ir jais kalcio jonų srautai teka iš vakuolės į citozolį, tokiu būdu dar labiau didindami kalcio jonų koncentraciją citozolyje – toks reiškinys vadinamas kalciu skatinamas kalcio išskyrimu (angl. *Calcium-Induced Calcium Release*). Šių Ca^{2+} jonų kanalų homologų esama ir gyvūnų ląstelėse bei protistuose (apžvelgta Hedrich ir Marten, 2011).

Dėl genetinių tyrimų stokos menturdumblių ląstelėse esančios Ca^{2+} jonų pernašos sistemos žinomos funkciškai, tačiau nežinoma jų molekulinė struktūra (Kisnieriene et al., 2019).

1.9. Verapamilas

Ca^{2+} kanalų blokatoriai, tokie kaip verapamilas, gyvūninėse ląstelėse daugiau ar mažiau selektyviai blokuoja Ca^{2+} srautą į ląstelę per įtampos aktyvuojamus lėtuosius (L-tipo, angl. *Long-lasting activation*) Ca^{2+} kanalus plazminėje membranoje, tačiau neveikia pasyvaus, ramybės būsenos Ca^{2+} įtekėjimo ir Na^+ - Ca^{2+} antiporterių veiklos. Verapamilas nėra specifiškas Ca^{2+} kanalų blokatorius, kadangi didelėmis koncentracijomis gali paveikti ir greituosius Na^+ srautus į ląstelę (apžvelgta Andersson ir Högestätt, 1984).

Nors augalų ląstelėse L-tipo Ca^{2+} jonų kanalų nėra, laboratorijoje viduląsteliniais tyrimo metodais nustatyta, kad *N. obtusa* ląsteles paveikus 0,1 mM – 0,3 mM verapamilu, sumažėjo AP amplitudė – galimai dėl sumažėjusio Ca^{2+} transporto; taip pat depoliarizavosi sužadinimo slenkstis, o dar stipriau – ramybės potencialas, todėl ląstelė tapo lengviau sužadinama (Koselski et al., 2021).

1.10. *Nitellopsis obtusa*

Aukštesniųjų augalų ląsteles sunku izoliuoti ir ištirti dominančių ląstelių elektrinį aktyvumą, tad augalų elektrofiziologijos tyrimuose dažnai naudojami didžiules ląsteles turintys *Charophytes* dumbliai. Šiam augalų tipui priklauso ne tik dumbliai, bet ir sausumos augalai, tad tyrimų metu gauti duomenys gali būti pritaikyti plačiam augalų spektrui (Beilby, 2007). Vienas tokių modelinių organizmų – *Charophytes* tipo *Characeae* šeimai priklausantis *Nitellopsis obtusa* (N.A. Desvaux) J. Groves dumblis, plačiai ištyrinėtomis savybėmis ir gebantis generuoti veikimo potencialus (Kisnieriene et al., 2018, 2019).

N. obtusa yra gėlavandenis dumblis, randamas Europos ir Azijos žemynuose, o tuo pačiu ir Lietuvoje. Dumblio tarpubambliai yra didžiulės, cilindro formos ląstelės, 1 mm diametro ir vidutiniškai 10 cm ilgio, tačiau gali užaugti ir iki 30 cm. Nepaisant dydžio, ląstelės turi visas augalui tipiškas organeles, daug branduolių ir centrinę vakuolę, užimančią 95% viso ląstelės tūrio (Beilby ir Casanova, 2014). Gretimi tarpubambliai tarpusavyje sujungti plazmodezmomis, todėl geba vykdyti tarpląstelinę komunikaciją.

Atskirtos nuo pamatinio augalo, tarpubamblio ląstelės gali būti laikomos atskirais vienaląsčiais organizmais ir išgyventi mėnesius laikomos minimalių kaštų reikalaujančiomis sąlygomis – su apšvietimu geriamajame vandenyje.

Iprastomis sąlygomis *N. obtusa* plazminės membranos ramybės potencialas svyruoja nuo -100 mV iki -250 mV ir daugiau, o slenkstinis potencialas apie $-90 \text{ mV} \pm 10 \text{ mV}$ (Kisnieriene et al., 2018).

2. METODIKA

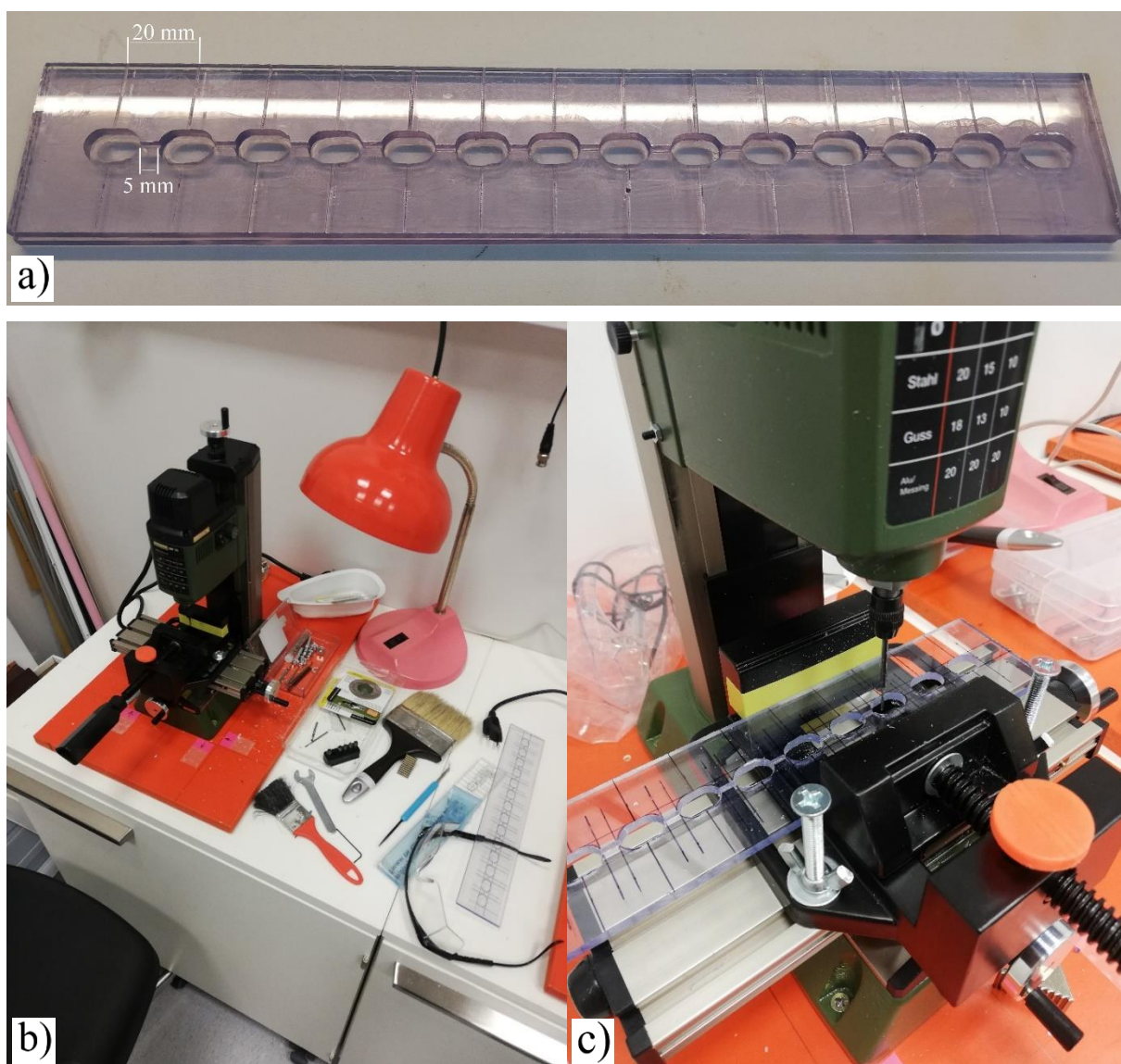
Tyrimo objektas: *Nitellopsis obtusa* (N.A. Desvaux) J. Groves menturdumblių ląstelės.

Augalai renkami Lietuvos ežeruose rudens mėnesiais ir laikomi stikliniuose akvariumuose su kambario temperatūros ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) geriamu vandeniu iš čiaupo, imituojamomis dienos šviesos sąlygomis ($9.5\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1} \pm 0.19\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) su 12/12 valandų šviesos/tamsos režimu. Tyrimuose naudojamos tarpubamblinės *N. obtusa* ląstelės, atskirtos nuo pamatinio augalo ir prieš eksperimentus pernakt paliekamos APW (angl. *artificial pond water*) su tuo pačiu 12/12 valandų šviesos/tamsos režimu. APW sudėtis: 0,1 mM KCl, 1,0 mM NaCl, 0,1 mM CaCl_2 , 3 mM HEPES ir 1,5 mM TRIS, pH 7,2.

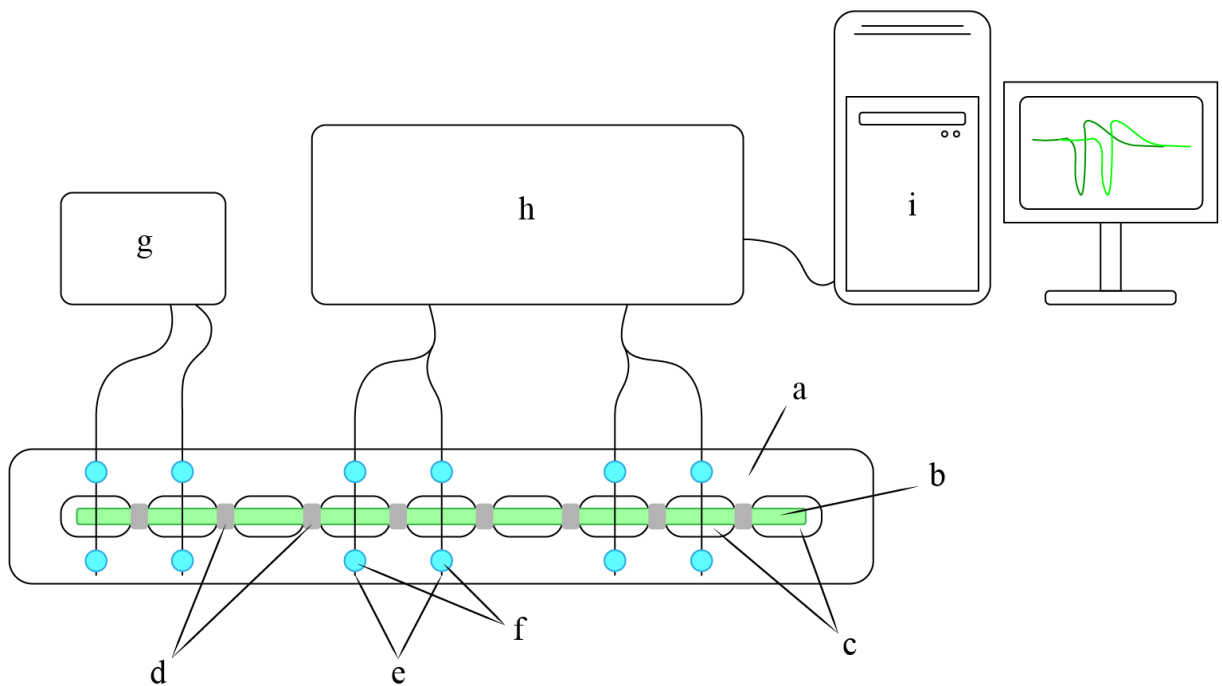
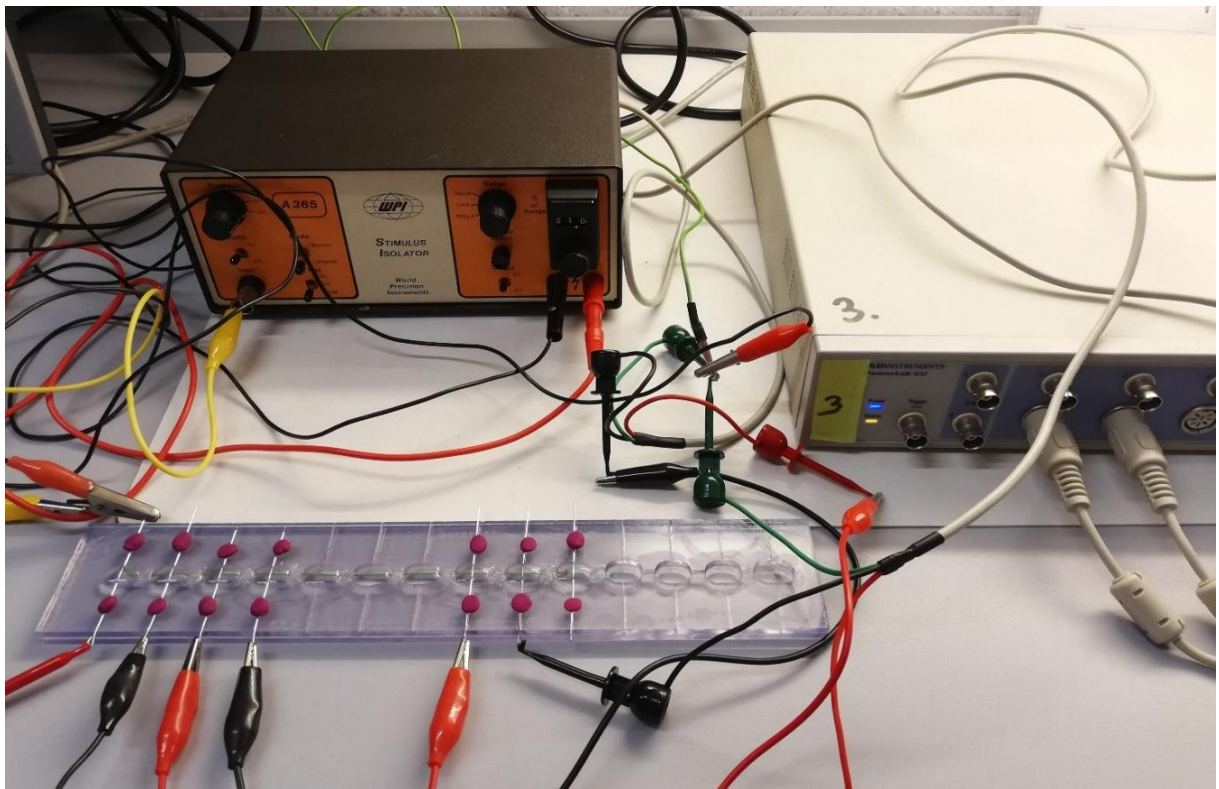
Tyrimo metodas: ekstraląstelinis AP sklidimo registravimo metodas, naudojant Pupkio aprašytą sistemą (**2.2 pav.**) (Pupkis et al., 2020). Bakalaurinio darbo metu laboratorijoje specialiai šiam tyrimui buvo pagaminta organinio stiklo kamera (**2.1 pav.**), į kurią telpa iki 27 cm ilgio ląstelė arba ląstelių pora. Ruošiantis eksperimentui kameros šulinėliai izoliuojami, juos jungiančius griovelius užpildant bet kokio tipo grynu vazelinu; *N. obtusa* tarpubamblio ląstelė dedama į kamerą išilgai šulinėlių, atsargiai įspraudžiama į vazelinu užpildytus griovelius ir tose vietose vazelinu pilnai apgaubiamo. Šulinėliai papildomi eksperimentinio tirpalo, kontrolės atveju – APW, o virš stimuliavimui ir registravimui reikalingų šulinėlių plastilinu pritvirtinamos elektrodų funkciją atliekančios sidabrinės vielos atkarpos – po vieną šulinėliui. Viena elektrodų pora, reikalinga elektrinio stimulo generavimui, pritvirtinama bet kuriame ląstelės krašte virš dviejų gretimų šulinėlių; dar dvi vielučių poros naudojamos kaip du atskiri potencialų skirtumą tarp gretimų šulinėlių registruojantys kanalai – 2 cm tarp poroje esančių elektrodų ir pasirinktinis atstumas (2 cm kartotinis nuo 4 cm) tarp elektrodų porų. AP pasiekus pirmąją elektrodą poroje – antrasis laikomas referentiniu, o nusklidus iki antrojo – referentinę funkciją atlieka pirmasis. Geriausia, kad registruojantys elektrodai nuo ląstelės galų būtų nutolę bent 2 cm atstumu, siekiant išvengti bamblių įtakos AP sklidimui (Tabata ir Sibaoka, 1987).

Signalų stiprinimui ir skaitmeninimui naudota *PowerLab 8/30* duomenų surinkimo ir valdymo sistema, kontroliuojama personaliniu kompiuteriu su įdiegta *LabChart 7* programa. Elektrinis stimulus generuotas prijungus elektrinį stimuliatorių *Stimulus Isolator A365* prie dviejų gretimų kraštinių elektrodų ir mygtuko paspaudimu įjungus ~1 sek. trukmės 1 μA stiprio elektros srovę; ląstelės nesužadinus, stimulus kartojamas kaskart srovės stiprį padidinant per 0,5 μA iki kol sukeliamas AP. Terminis šaltinio stimulus generuotas iš kraštinio

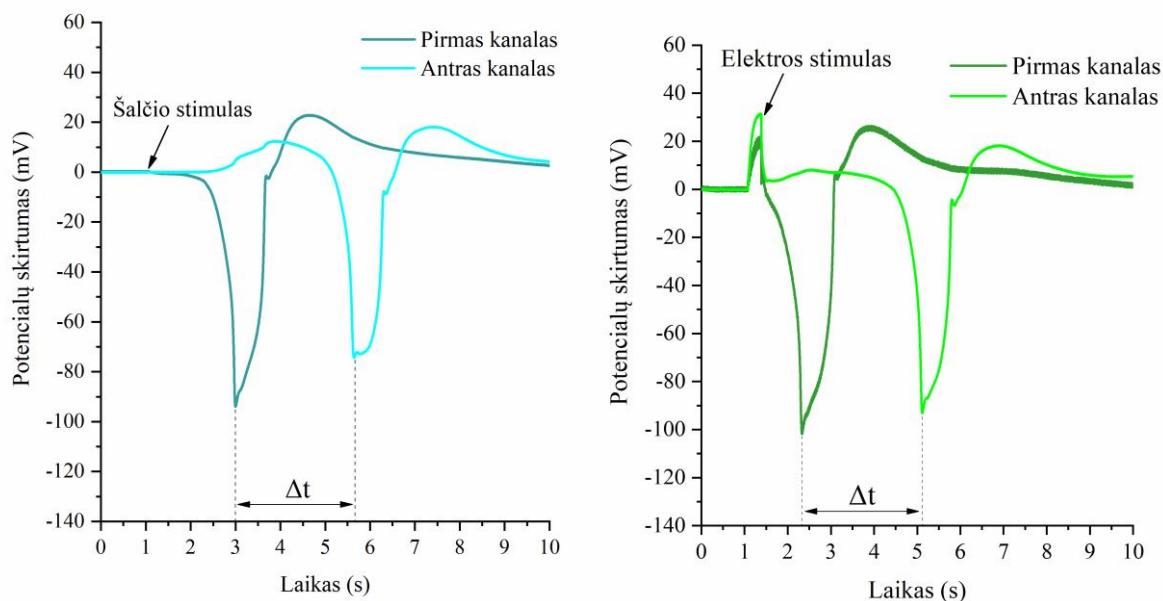
kameros šulinėlio švirkštu išsiurbiant eksperimentinį tirpalą ir įšvirkščiant to paties, tik 0 °C tirpalo. Skirtingo modalumo stimulai įrodo, kad registruojamas signalas tikrai yra AP, o ne stimulo artefaktas (**2.3 pav.**). Nepriklausomai nuo stimulo modalumo, žadinama kas 10 min – viduląsteliniais metodais nustatyta, kad 5 min neužtenka atsistatyti plazminės membranos ramybės potencialui (Kisnierienė et al., 2009), o per maždaug 9 min atsistato citoplazminis judėjimas (Pupkis et al., 2020), kurio greitis yra tiesiogiai susijęs su Ca^{2+} koncentracija citoplazmoje. Užregistravus AP ir išmatavus laiką (**2.3 pav.**, Δt), per kurį signalas nusklido nuo vienos elektrodų poros iki kitos, pagal paprastą greičio formulę $v = s/\Delta t$ apskaičiuojamas AP sklidimo greitis.



2.1 pav. Laboratorijoje specialiai AP sklidimo greičio ląstelėse ir tarpląstelinio perdavimo tyrimui pagaminta organinio stiklo kamera: a) galutinis produktas; b) grąžtas ir kiti gamybos įrankiai; c) gamybos procesas.



2.2 pav. Ekstraląstelinė registravimo sistema (adaptuota pagal Pupkis et al., 2020): sujungtos sistemos nuotrauka (viršuje) ir blokinė schema (apačioje): a – kamera, b – ląstelė, c – kameros šulinėliai, d – izoliacija (vazelinai), e – elektrodai (sidabro vielutės), f – plastilinas, g – elektrinis stimulatorius, h – duomenų surinkimo ir valdymo sistema (*PowerLab*), i – personalinis kompiuteris.



2.3 pav. Dviem kanalais (dviem elektrodų poromis) užregistruotas skirtingo modalumo stimulais sužadintų veikimo potencialų sklidimas: a) terminiu šalčio stimulu; b) elektriniu stimulu.

Verapamilo koncentracija eksperimentiniame tirpale pasirinkta 0,1 mM, nes *N. obtusa* ląstelės veikiant 0,3 mM verapamilo tirpalu, ląstelės visą registravimo laiką generuoja spontaninius AP ir todėl stimuliavimas kas 10 min negalimas.

Tyrimo eiga: išskirta į dvi dalis: i) AP sklidimo greitis pavienėse *N. obtusa* ląstelėse – neporiniai kontroliniai ir verapamilo įtakos eksperimentai; ir ii) AP perdavimas tarp ląstelių – poriniai kontroliniai ir verapamilo įtakos eksperimentai.

i) AP sklidimo greičio pavienėse ląstelėse eksperimentams paruošiama registravimo sistema su APW ir tarpubamblinė *N. obtusa* ląstele, iš karto pradedamas registravimas ir ląstelei leidžiama 10 min stabilizuotis; registruojant dar prieš stimulą siekiama įsitikinti, kad ląstelė nesugeneravo jokio mechanškai sukulto ar spontaninio AP ir bus sužadinta mažiausiai 10 min po paskutiniojo AP. Stimuliuojama 9 kartus kas 10 min elektriniu arba terminiu stimulu. Po 9-tojo stimulo dar porą minučių registruojamas signalas, o tada įrašas stabdomas, ląstelė ištraukiama iš kameros ir tolimesniuose matavimuose nebenaudojama.

Verapamilo įtaka AP sklidimo greičiui tirta pavienėse ląstelėse, kurios prieš tai nebuvo tirtos kontrolinėmis sąlygomis, o eksperimentų eiga vyko tokiu pačiu būdu kaip ir kontrolės atveju, tik visus kameros šulinėlius pripildant ne APW, o 0,1 mM verapamilo, ištirpinto APW, tirpalu. Kadangi verapamilo veikiamos ląstelės linkusios generuoti spontaninius AP, pradedama stimuliuoti mažiausiai 10 min neužregistravus jokio spontaninio AP.

Stimuliuojama elektriniu arba terminiu stimulu kas 10 min tol, kol ląstelė susižadina. Kai ląstelės sužadinti nebepavyksta, eksperimentas užbaigiamas.

ii) AP perdavimo iš ląstelės į ląstelę kontroliniams eksperimentams paruošiama registravimo sistema su bambliu susijungusia *N. obtusa* ląstelių pora taip, kad viena elektroda pora registruotų vienos ląstelės signalą, o kita – kitos. Iš karto pradedamas registravimas ir ląstelių porai leidžiama 10 min stabilizuotis. Stimuliuojama nuo 4 iki 10 kartų kas 10 min elektriniu stimulu. Po paskutiniojo stimulo dar porą minučių registruojamas signalas, o tada tai pačiai ląstelių porai taikomas vienas iš dviejų verapamilo įtakos AP tarpląsteliniai perdavimui tikrinimo būdų:

- 1) Verapamilas užpilamas tik ant ląstelių porą jungiančio bamblio – atlikus kontrolinius matavimus ląstelių porai, iš kameros šulinėlio, kuriame yra ląstelės jungiantis bamblys, švirkštu išsiurbiamas kontrolinis tirpalas ir šulinėlis pripildomas 0,1 mM verapamilo tirpalo. Palaukiama 10 min ir, jei neužregistruojama spontaninių AP, pradedama stimuliuoti. Stimuliuojama nuo 4 iki 10 kartų kas 10 min elektriniu stimulu, o tada įrašas stabdomas, ląstelių pora ištraukiama iš kameros ir daugiau nebenaudojama.
- 2) Verapamilas užpilamas ant vienos poroje esančios ląstelės – atlikus kontrolinius matavimus ląstelių porai, pasirenkama viena ląstelė iš poros ir visi jos užimami šulinėliai, išskyrus ląsteles jungiančio bamblio, pripildomi 0,1 mM verapamilo tirpalu, prieš tai švirkštu pašalinus kontrolinį tirpalą. Laukiama 10 min ir, neužregistravus spontaninių AP, pradedamas elektrinis stimuliavimas 10 min intervalais. Stimuliuojama tol, kol ląstelė susižadina. Kai ląstelės sužadinti nebepavyksta, eksperimentas užbaigiamas.

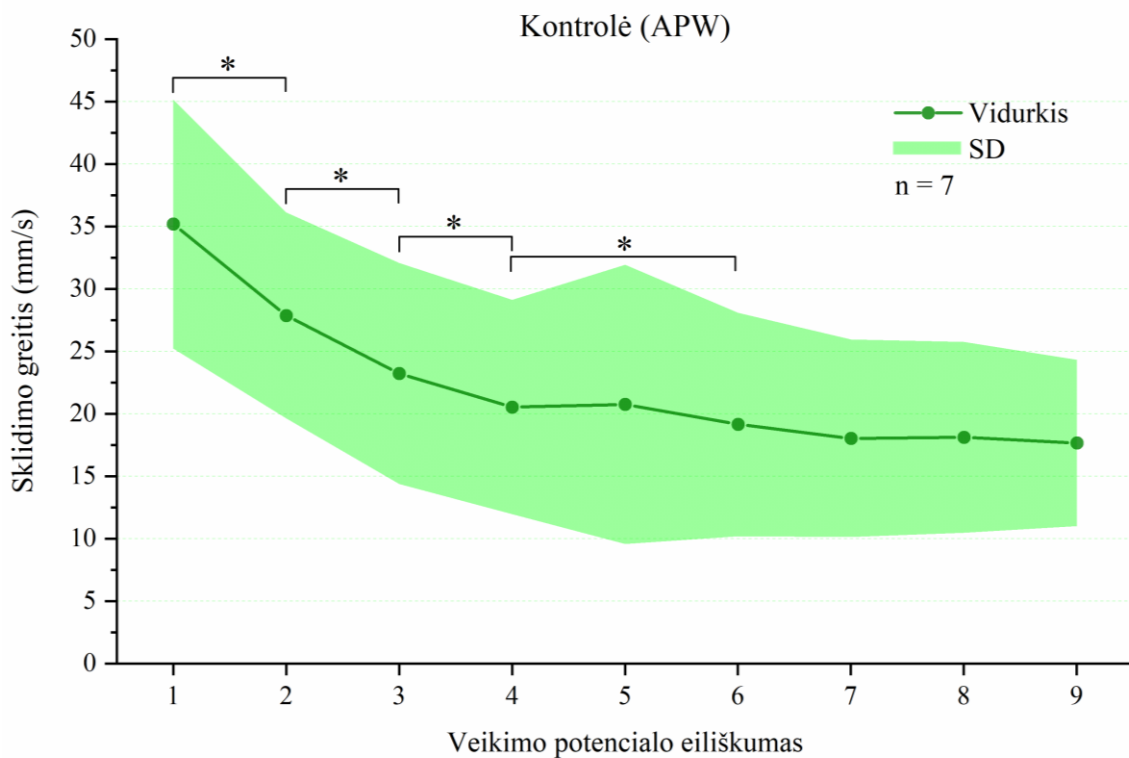
Statistiniai metodai: duomenų analizavimui naudota OriginPro 2018 programa – Shapiro-Wilk kriterijus duomenų pasiskirstymo normalumui tikrinti; Stjudento t kriterijus nepriklausomoms imtims normaliai pasiskirsčiusių, neporinių duomenų skirtumo reikšmingumui tikrinti; Stjudento t kriterijus priklausomoms imtims normaliai pasiskirsčiusių, porinių duomenų skirtumo reikšmingumui tikrinti; Mann-Whitney kriterijus nenormaliai pasiskirsčiusių, neporinių duomenų skirtumo reikšmingumui tikrinti, Wilcoxon kriterijus priklausomoms imtims nenormaliai pasiskirsčiusių, porinių duomenų skirtumo reikšmingumui tikrinti. Reikšmingumo lygmuo $p = 0,05$. Rezultatų skaitinės vertės išreikštos vidurkiu $\pm$ SD.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Veikimo potencialo sklidimas vienoje ląstelėje

3.1.1. Kontroliniai eksperimentai

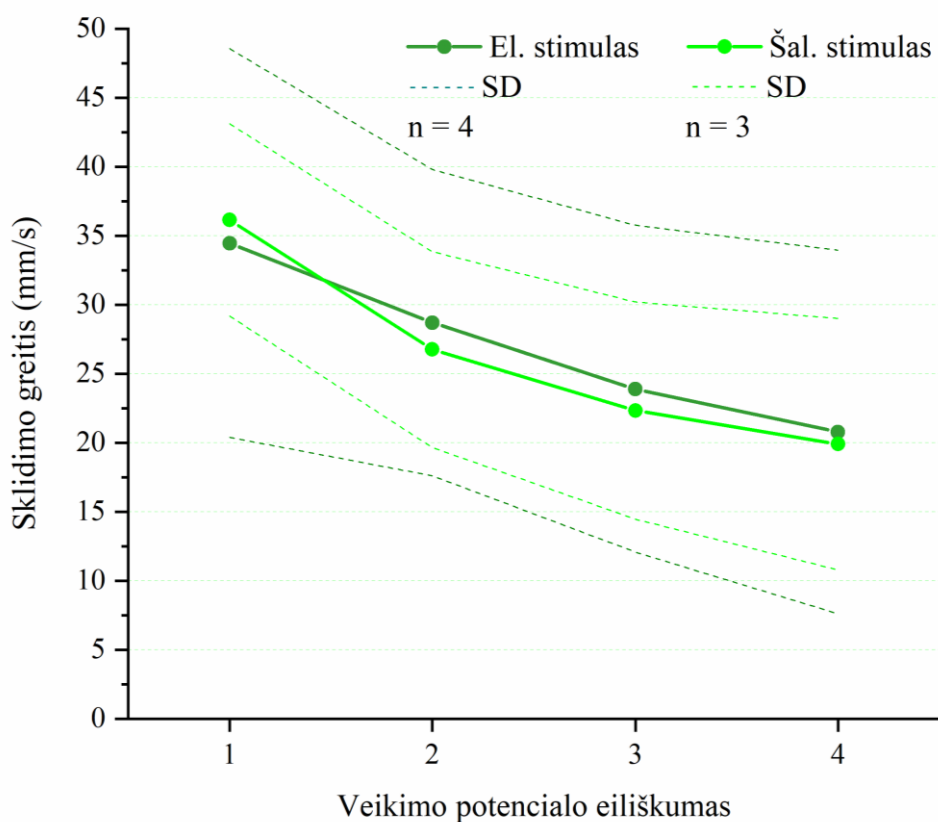
Kontroliniame tirpale esančias ląsteles ($n = 7$) keletą kartų sustimuliavus elektriniais arba terminiais stimulais, pastebėtas AP sklidimo greičio polinkis mažėti su kiekvienu sužadiniu iki kol vertė nusistovi (**3.1 pav.**). Pats pirmasis sužadintas AP per ląstelę sklido greičiausiai – $(35,2 \pm 10,0)$ mm/s greičiu, o maždaug 5 – 6-to stimulo sukeltas AP sklido jau nereikšmingai kintančiu $(19,1 \pm 9,0)$ mm/s greičiu.



3.1 pav. Veikimo potencialo sklidimo greičio dinamika iš eilės stimuliuojant kas 10 min kontrolinėmis sąlygomis (APW).

Siekiant preliminariai patikrinti, ar stimulo modalumas turi įtakos AP sklidimo greičiui, keturios ląstelės keturis kartus buvo sužadintos elektriniu stimulu, o kitos trys –

keturiais terminiais stimulais. Tačiau nei sklaidimo greičio vertės, nei jų dinamika skirtingais stimulo modalumo atvejais nesiskyrė (**3.2 pav.**).

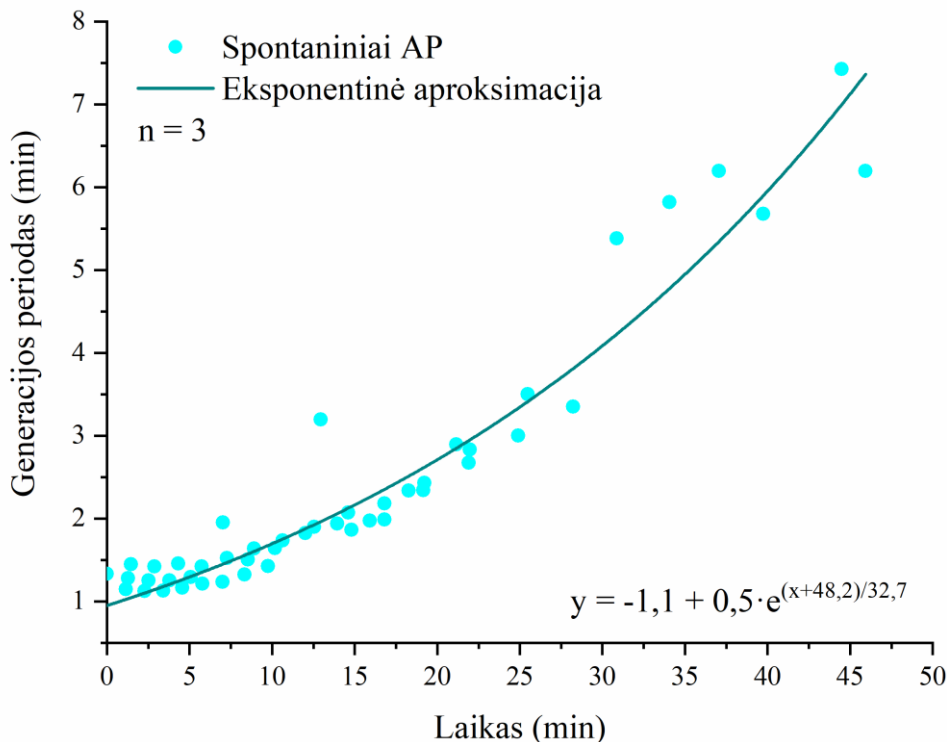


3.2 pav. Elektriniais ir terminiais stimulais sužadintų veikimo potencialų sklaidimo greičiai kontrolinėmis sąlygomis (APW).

3.1.2. Verapamilo įtaka

Atliekant verapamilo įtakos AP sklaidimo greičiui ląstelėje eksperimentus, buvo pastebėta bendra, daugelyje tiriamų ląstelių atsikartojanti reakcija į tirpalą (**3.4 pav.**). 8-ių iš 10-ies tiriamų ląstelių atveju per pirmąsias 10 min nuo įrašo pradžios užregistruotas bent vienas spontaninis AP (**3.4 pav., a**). Šie savaiminiai potencialai skirtingose ląstelėse generavosi nuo 1 iki 21 karto apytikriai kas 1,5 min ir vis retėjant (**3.3 pav.**), sklido ($5,8 \pm 1,3$) mm/s greičiu, kartais pasikeičiant susižadinimo vietai ląstelėje ir tuo pačiu sklaidimo kryptčiai. Ant ląstelės užpylus 0,1 mM verapamilo tirpalo, elektrodų ir laidų pritvirtinimui buvo užgaišamos bent 3,5 min iki registravimo pradžios, tad galbūt per šį laiką praleista dar keletas spontaninių AP. Nors kontroliniams eksperimentams ląstelė ruošta lygiai tokiu pačiu būdu ir spontaninių AP neužregistruota, veikiant verapamilui savaiminį generavimąsi galėjo iššaukti netyčinis mechaninis stimulus ląstelės įtvirtinimo kameroje metu

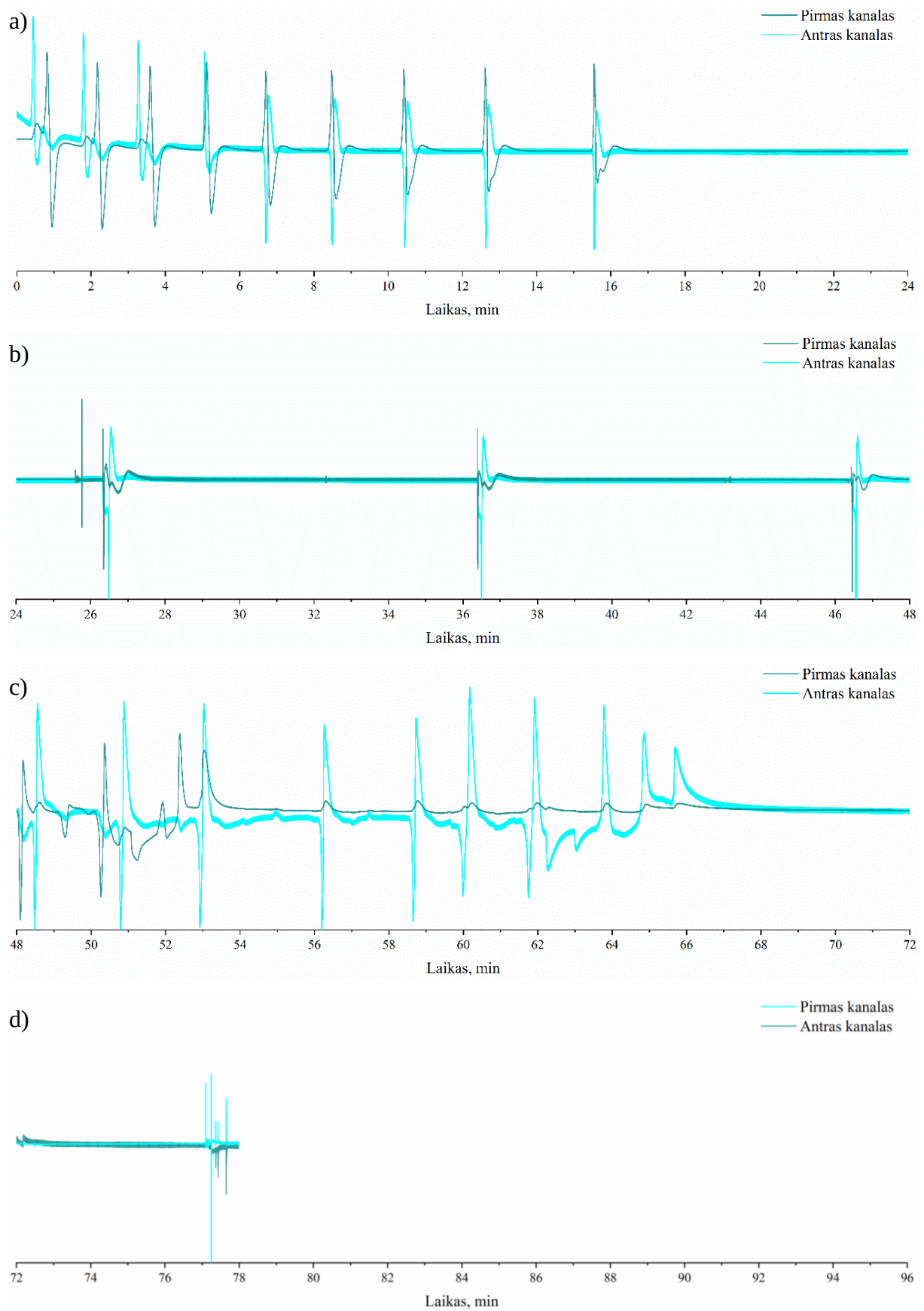
– laboratorijoje viduląsteliniais tyrimo metodais nustatyta, kad verapamilas depoliarizuoja sužadavimo slenkstį, o dar stipriau – ramybės potencialą, todėl ląstelė tampa lengviau sužadinama (Koselski et al., 2021).



3.3 pav. Spontaninių veikimo potencialų generacijos periodo pokytis per laiką.

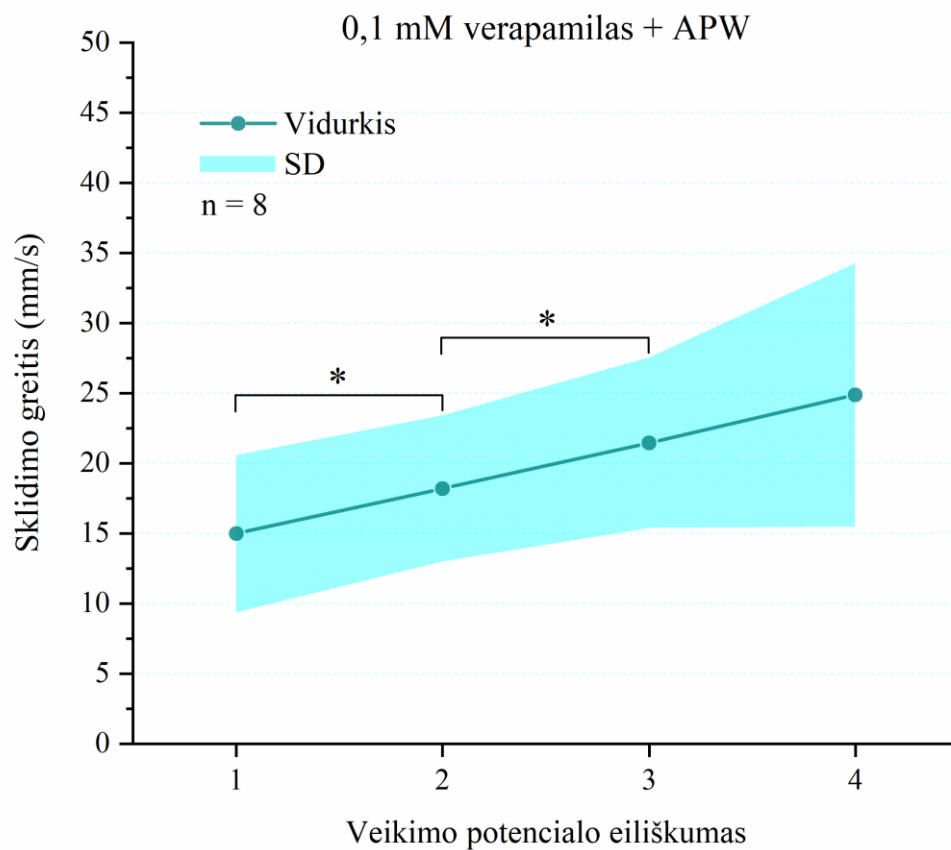
Spontaninių AP neužregistravus bent 10 min, pradedamas elektrinis stimuliavimas 10 min intervalais (**3.4 pav., b**) iki kol ląstelė vėl pradeda generuoti spontaninius AP. Antrosios spontaninių AP serijos signalas atrodo chaotiškai (**3.4 pav., c**) – sunku nustatyti, iš kurios pusės potencialas sklido, kurioje ląstelės dalyje susigeneravo ir ar signale jis matomas pavienis, ar dviejų suma – iš skirtingų pusių sklindantys AP susidūrę vienas kitą anuliuoja (Fillafer et al., 2017). Dėl šių priežasčių chaotinių spontaninių AP sklidimo greičio įvertinti nepavyko.

Chaotinių spontaninių AP aktyvumui pasibaigus, laukiama 10 min ir ląstelę bandoma sužadinti elektriniu stimulu keletą kartų vis padidinant srovės stiprį; tačiau 100% tiriamų ląstelių po tokios chaotinės spontaninių AP serijos nebesusizadino ir prarado turgorą (įvertinta ląstelę mechaniškai sulenkus), todėl buvo laikomos mirusiomis (**3.4 pav., d**).

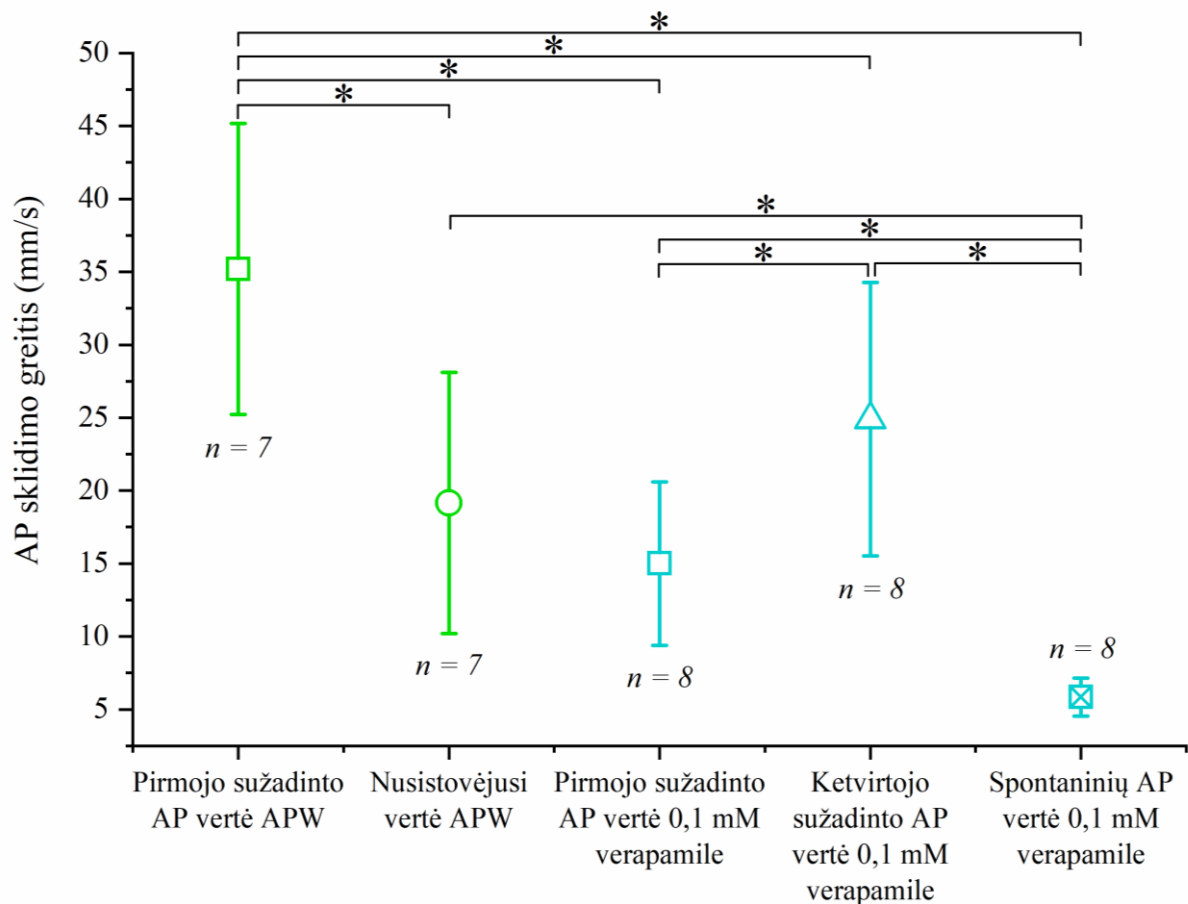


3.4 pav. *N. obtusa* ląstelės reakcijos į 0,1 mM verapamilo tirpalą eiga: a) spontaniniai veikimo potencialai; b) ramybės laikotarpis, kurio metu ląstelė žadinama kas 10 min; c) chaotiniai spontaniniai veikimo potencialai; d) mirtis – ląstelė nebesužadinama (signale matomas tik pakartotinas stimulo artefaktas).

Verapamilo veikiamai ląstelei baigus generuoti pirmuosius spontaninius AP ir esant galimybei ją sužadinti stimulu (**3.4 pav., b**), iki chaotiškos spontaninių AP serijos pradžios pavyksta sukelti vidutiniškai 3 – 4 AP, o dviem ląstelėms iš 10-ies taip ir nepavyko suteikti stimulo, nes baigiantis pirmajai savaiminio aktyvumo serijai iškart prasidėjo chaotinių AP generacija. Pagal likusiųjų 8-ių tiriamų ląstelių rezultatus, pirmieji trys sukelti AP sklido didėjančiu greičiu (**3.5 pav.**), tačiau nei vienas jų reikšmingai nesiskyrė nuo kontroliniame tirpale nusistovėjusios sklido greičio vertės (**3.6 pav.**).

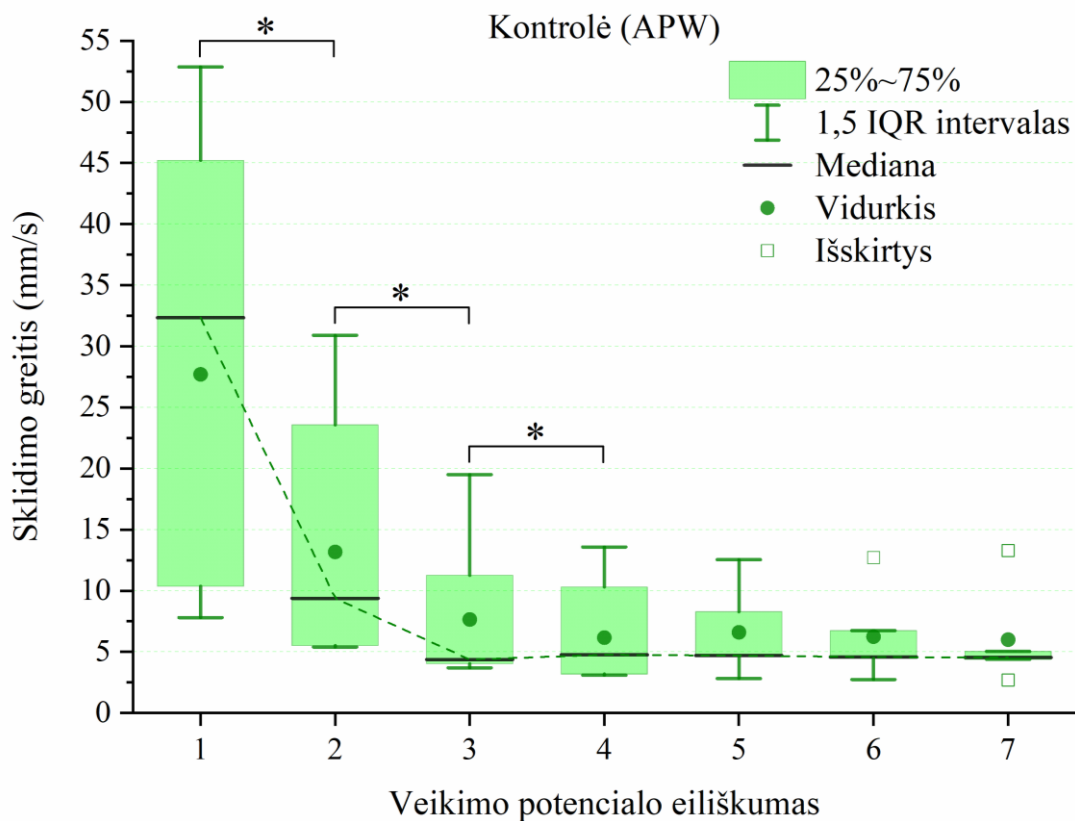


3.5 pav. Veikimo potencialo sklido greičio dinamika iš eilės stimuliuojant kas 10 min, veikiant ląstelę 0,1 mM verapamilo, ištirpinto APW, tirpalu.



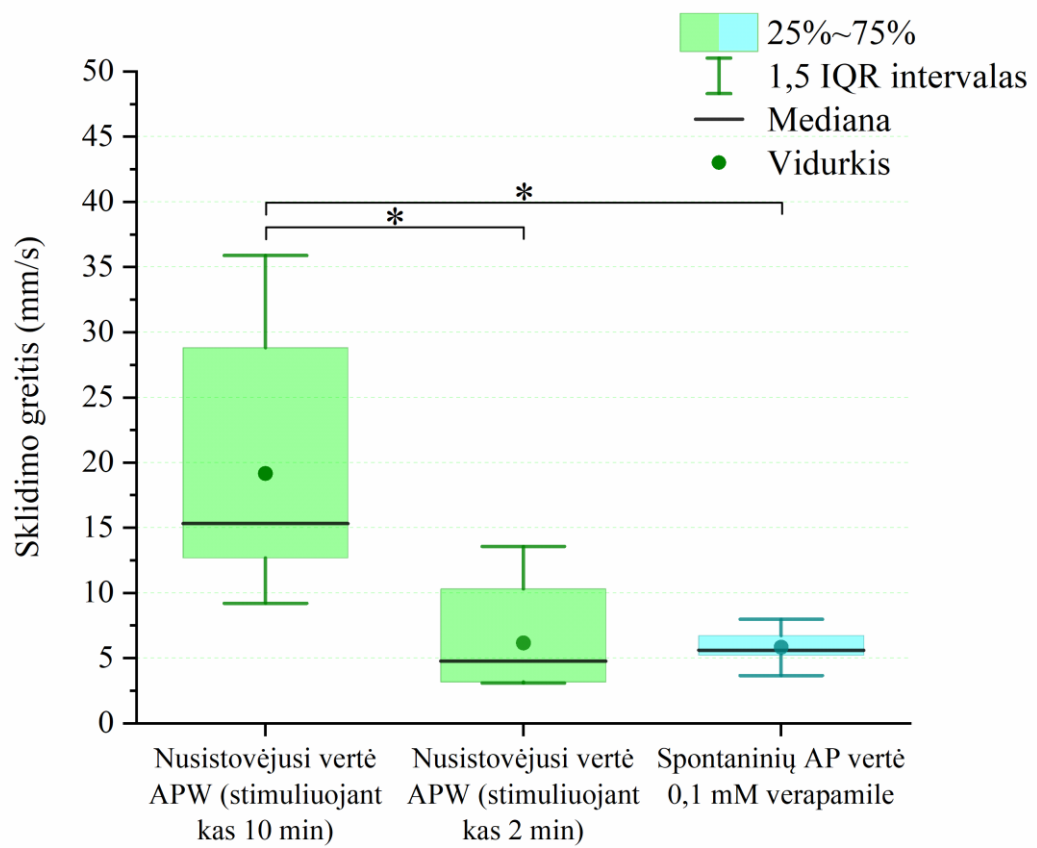
3.6 pav. Veikimo potencialo *N. obtusa* ląstelėje sklaidimo greitis skirtingomis sąlygomis.

Spontaniniai AP ląstelę veikiant verapamilu ne tik sklido lėčiau už sukeltuosius, bet ir didesniu dažniu vyko jų generacija. Siekiant patikrinti, ar mažas greitis yra būtent spontaninių AP sklaidimo savybė, ar sklaidimo greičio priklausomybė nuo generacijos dažnio, buvo atlikti papildomi matavimai, paruošiant ląsteles įprastu būdu kontrolinių sąlygų eksperimentams, tačiau stimuliuojant elektriniu stimulu kas 2 min. Daugumos ląstelių kas 2 min sužadinti nepavyko, o visgi sukėlus AP, kartais jis užgesdavo nepasiekęs antrosios elektrodų poros. 4 – 7 kartus iš eilės kas 2 min pasisėkus sužadinti 7 ląsteles, pastebėta eksponentinė greičio lėtėjimo tendencija iki vertės stabilizavimosi (3.7 pav.).



3.7 pav. Veikimo potencialo sklaidimo greičio dinamika iš eilės stimuliuojant kas 2 min kontrolinėmis sąlygomis (APW).

2 min intervalų žadinimo AP sklaidimo greičio dinamika panaši į žadinimo 10 min intervalais – pirmuoju stimulu sukeltas AP sklido greičiausiai, o po 4-tojo stimulo greičio vertė nusistovėjo ties $(6,16 \pm 4,12)$ mm/s pagal vidurkį, 4,76 mm/s pagal medianą, ir reikšmingai nebekito. Tačiau nusistovėjusi žadinimo 2 min intervalais AP sklaidimo greičio vertė žymiai mažesnė už žadinimo 10 min intervalais, lygią $(19,1 \pm 9,0)$ mm/s, o nuo spontaninių AP sklaidimo greičio vertės ląstelę veikiant verapamilu nesiskyrė (**3.8 pav.**). Taigi, remiantis šiais rezultatais galima teigti, kad sklaidimo greitis priklauso nuo generacijos dažnio, ir tikėtina, kad spontaninių AP sklido greitis yra dažnos generacijos pasekmė.



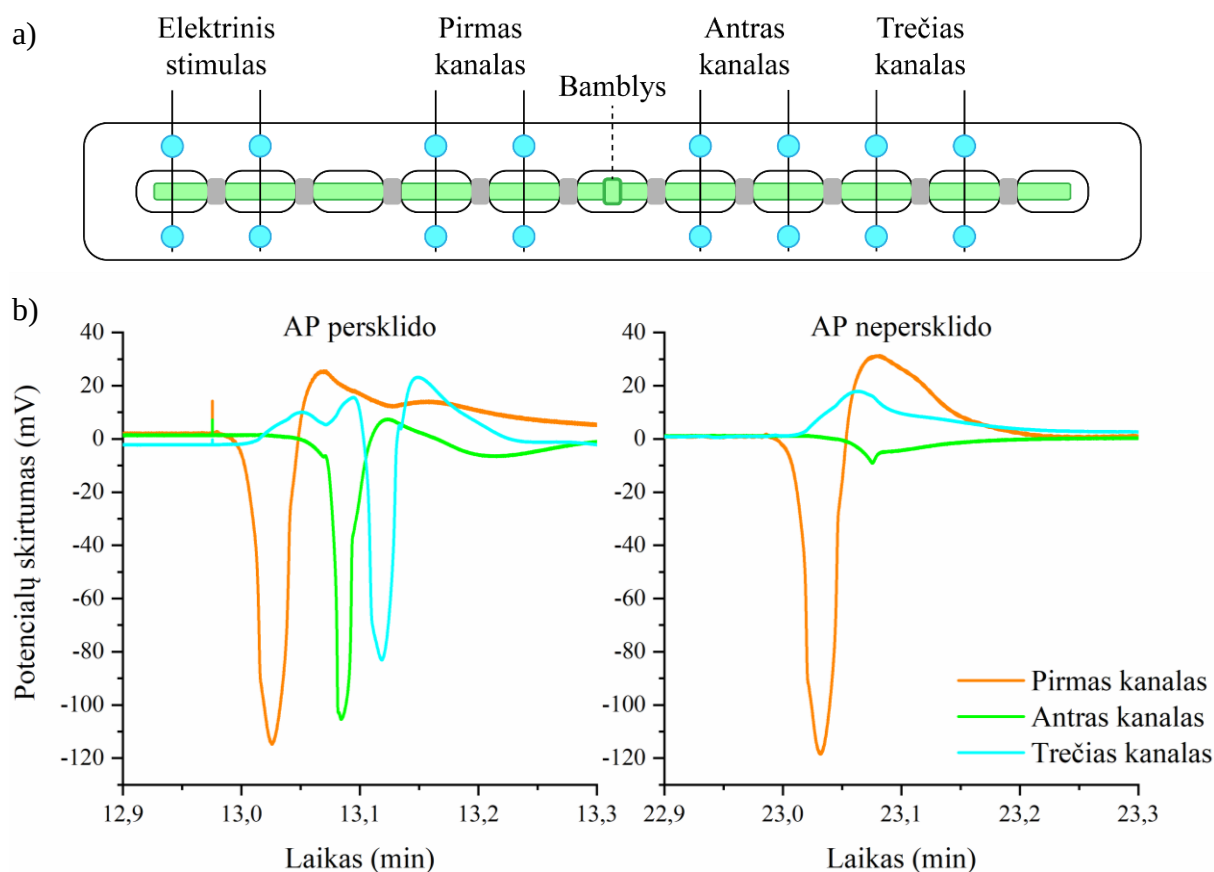
3.8 pav. Veikimo potencialo *N. obtusa* ląstelėje sklaidimo greitis esant skirtingam veikimo potencialo generacijos periodui.

3.2. Veikimo potencialo tarpląstelinis perdavimas

3.2.1. Kontroliniai eksperimentai

AP tarpląstelinio perdavimo eksperimentais vertinta per bamblių perskildusių sužadintų AP procentinė dalis. Kontrolinėmis sąlygomis ištirta 18 bamblių susijungusių ląstelių porų, iš kurių tik vienoje poroje per bamblių perskrido 100 % stimulių AP, keturiose – apie 30 %, o likusiose trylikoje per bamblių neperskrido nei vienas sukeltas AP.

Sužadinus vieną ląstelę ir AP per bamblių neerskrido, antroje užregistruojamas receptorinis potencialas. Pastebėta, kad skirtingose ląstelėse receptorinių potencialų signalo forma skiriasi, o preliminariniame eksperimente su trimis elektrodų poromis, net ir toje pačioje ląstelėje užregistruoti dviejų skirtingų formų receptoriniai potencialai (3.9 pav.).



3.9 pav. Veikimo potencialo tarpląstelinio perdavimo preliminaraus eksperimento su trimis elektrodų poromis išsidėstymo schema (a) ir gautas signalas (b) – AP perskildus per bamblių (kairėje) ir neperskildus (dešinėje).

Dvi skirtingos receptorinių potencialų formos, matomos 3.9 pav. b dalies dešiniajame grafike, nepriklausomai nuo stimulus modalumo, buvo tipinės ir atsikartojo daugelyje ląstelių, tačiau nekeičiant sąlygų ir elektrodų išdėstymo, pakartotinai stimuliuojant vieną poros ląstelę,

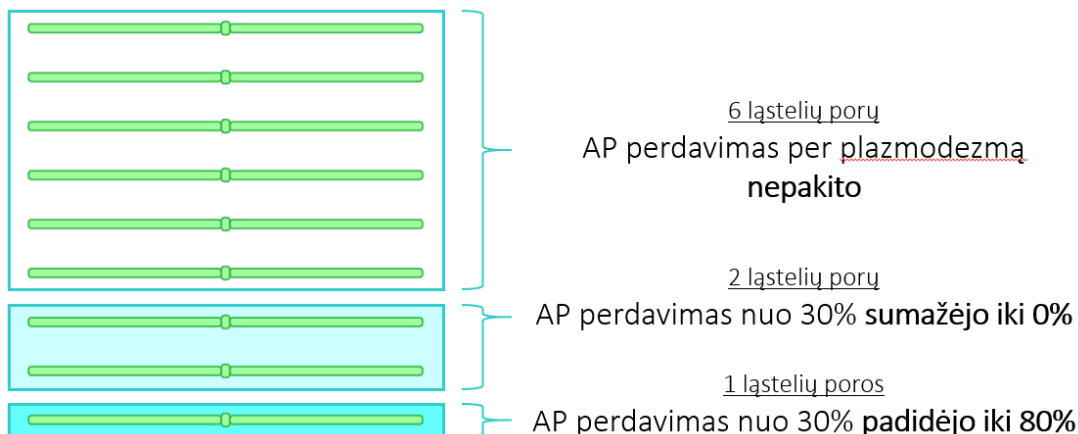
antrojoje registruojamo receptorinio potencialo forma nekito. Įdomu tai, kad trečiasis kanalas nuo ląstelės jungiančio bamblio buvo toliau, tačiau juo užregistruotas receptorinis potencialas susigeneravo ir pasiekė piką greičiau nei užregistruotas antruoju kanalu; signalo forma trečiajame kanale rodo ir tai, kad potencialo pokytis pirmiausia užregistruotas labiausiai į dešiniąją kraštą nutolusio elektrodo, tad galbūt receptorinis potencialas sklido iš kitos pusės, nei stimuliuota. Tokia pati forma trečiojo kanalo signale matoma ir 3.9 pav. b dalies kairiajame grafike prieš pat atsklindant AP. Spėjame, kad viename gale sužadinus ląstelę, stimulus gali paveikti visą tiriamą ląstelę ar ląstelių porą, o kitame, laisvajame gale, dėl stimulo įtakos gali susigeneruoti receptorinis potencialas, sklindantis į priešingą pusę nei sukeltas AP.

3.2.2. Verapamilo įtaka

Verapamilo įtaka AP perdavimui per bamblių tirta dvejopai: i) 0,1 mM verapamilo užpylus tik ant gretimas ląsteles jungiančio bamblio, ir ii) 0,1 mM verapamilo užpylus ant vienos poroje esančios ląstelės, kai porą jungiantis bamblys lieka APW. Abiem būdais ištirta po 9-ias ląstelių poras iš 18-os tirtųjų kontroliniame tirpale.

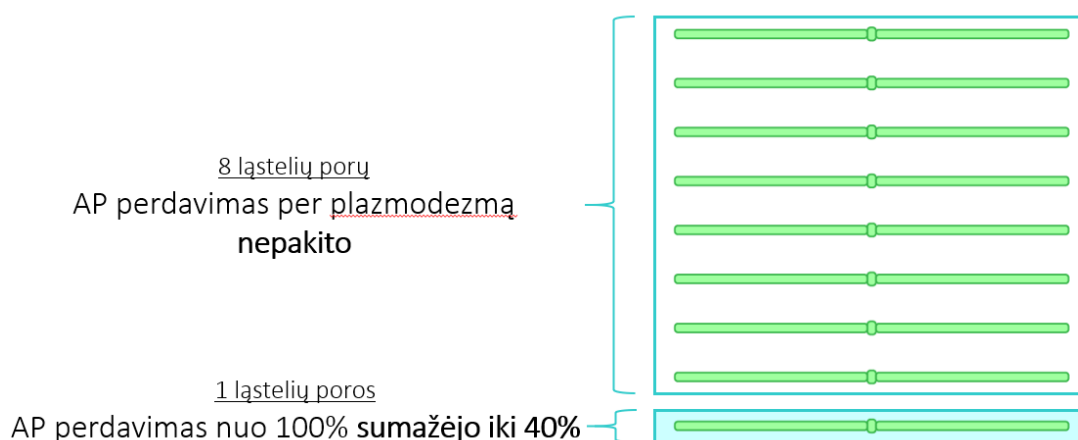
Analizuojant gautus duomenis pastebėta, kad jei kontrolinio eksperimento metu nei vienas AP pro bamblių neprasklido, tuomet nepersklis ir bet kuriuo būdu ląstelių porą veikiant verapamilo tirpalu.

Iš 9-ių ląstelių porų, kurių bamblys buvo veikiamas 0,1 mM verapamilo tirpalu, 6-iose ląstelėse prasklidusių AP procentas nepakito, dviejose sumažėjo iki 0 %, o vienoje nuo 30 % (kontrolė) padidėjo iki 80 % (**3.10 pav.**). Šių eksperimentų metu visos ląstelės išliko gyvybingos iki pat eksperimentų pabaigos.



3.10 pav. Veikimo potencialo tarpląstelinio perdavimo pokyčiai ląstelių porą jungiantį bamblių veikiant 0,1 mM verapamilo, ištirpinto APW, tirpalu.

Iš kitų 9-ių ląstelių porų, kurių viena ląstelė buvo apsemta 0,1 mM verapamilu, o kita APW, 8-iose porose praeinamumas pro bamblį nepakito (0 % - kaip ir kontrolėje), o vienoje poroje nuo 100 % (kontrolėje) nukrito iki 40 % (**3.11 pav.**).



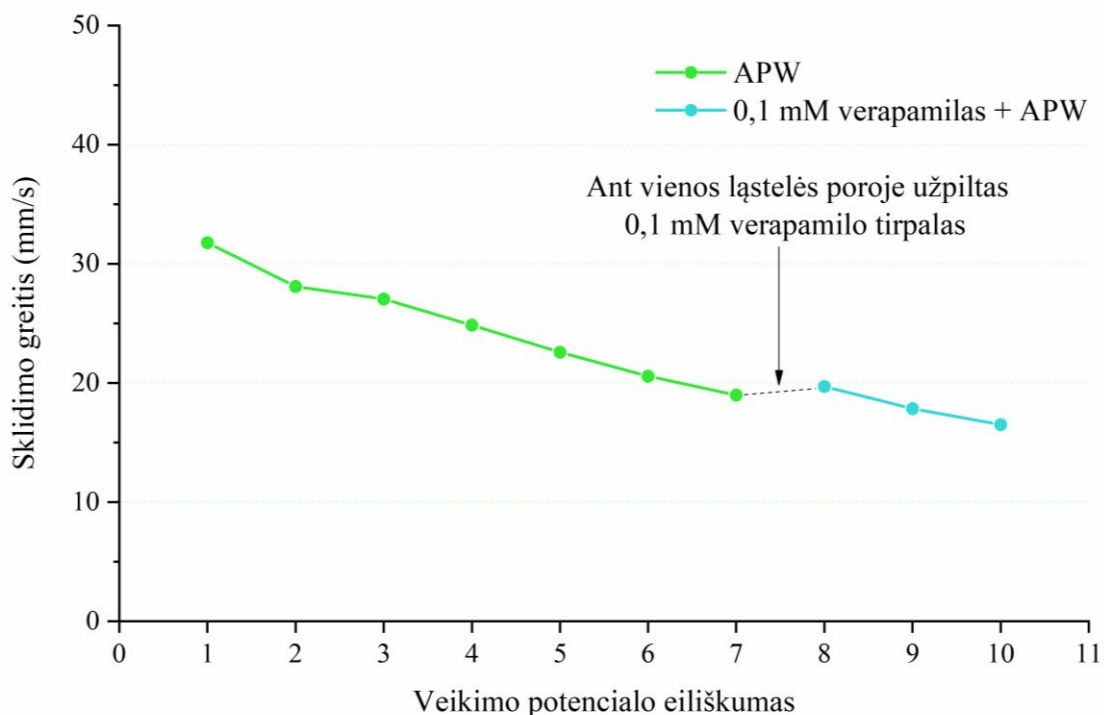
3.11 pav. Veikimo potencialo tarpląstelinio perdavimo pokyčiai vieną ląstelę poroje veikiant 0,1 mM verapamilu, ištirpinto APW, tirpalu.

Šių eksperimentų metu 100 % ląstelių, ant kurių buvo užpiltas verapamilas, po keleto žadinimo kartų pradėjo chaotinių spontaninių AP generaciją, visai kaip AP sklidimo greičio pavienėse ląstelėse eksperimentų metu (**3.4 pav.**, c). Tuo tarpu antrosios, kontroliniame tirpale esančios ląstelės signale matėsi receptoriniai potencialai, o 6-iose iš 9-ių tirtų ląstelių nuo ląstelių porą jungiančio bambliaus pusės nuskrido 1 – 2, ar net 9 spontaniniai AP. Galbūt potencialai perskrido per bamblį iš verapamilu veikiamos ląstelės, o galbūt užregistruotas ir VP, tačiau esama tyrimų, kuriais buvo tirta „mirties žinutė“ (angl. „*death message*“) ląstelių poroje – viena iš ląstelių nukerpama, o antroje tuo metu užregistruojami AP ar nedideli spaikai, o visais atvejais – ilgai besitęsianti depoliarizacija, kuri, spėjama, ne perėjo iš nukirptos ląstelės, o susigeneravo sveikojoje (Shimmen, 2001). Įtarta, kad to priežastis – turgoro praradimas miršančiojoje ląstelėje. O šio bakalaurnio darbo tyrimo eksperimentų metu 100 % tiriamų ląstelių, veikiamų verapamilu, po chaotinio savaiminio aktyvumo prarado turgorą ir tapo nebesužadinamomis; tuo tarpu kontroliniame tirpale esanti ląstelė išliko gyvybinga.

Taigi, nei vienu, nei kitu verapamilu užpylimo atveju nebuvo pastebėta jokia aiški, kryptinga tirpalo įtaka AP perdavimui per bamblį.

3.3. Rezultatų aptarimas

AP sklidimo greitis vienoje ląstelėje neatspindi tarpląstelinio AP sklidimo greičio, kadangi kaip ir kiekviena ląstelė, jas jungiantis bamblys taip pat turi savo varžą (Sibaoka ir Tabata, 1981) ir AP sklidimą gali užlaikyti/užvėlinti. Šiame tyrime per bamblių prasklidusių AP sklidimo greitis taip pat buvo vertinamas, tačiau turint galvoje AP sklidimo greičio vertės dinamiškumą, nustatytą pavienių ląstelių eksperimentais pakartotinai stimuliuojant, ir prasklidusių AP nereguliarumą bei mažą įvykių skaičių, turimų duomenų neužtenka rezultatams apibendrinti. Tik viena iš visų tirtų ląstelių porų gali reprezentuoti preliminarūs AP tarpląstelinio sklidimo greičio rezultatus (žr. **3.12 pav.**), kadangi kas 10 min iš eilės stimuliuojant 14 kartų, per bamblių prasklido 10 pirmųjų sužadintų AP ir jų greičiai galėjo būti sėkmingai buvo įvertinti.



3.12 pav. Veikimo potencialo tarpląstelinio sklidimo greičio dinamika vienos ląstelių poros duomenimis, stimuliuojant 10 min intervalais. 7 pirmieji stimulai sukelti kontrolinėmis sąlygomis, tuomet vienos ląstelės eksperimentinis tirpalas pakeistas 0,1 mM verapamilu, ir vėl stimuliuota 10 min intervalais; po verapamilo užpylimo tik trys pirmieji sužadinti AP persklido per bamblių, o likusieji keturi – ne.

Vertinant AP tarpląstelinio perdavimo eksperimentų rezultatus, būtina atsižvelgti į tai, kad eksperimentai vykdyti pavasario mėnesiais, kuomet *N. obtusa* menturdumbliai natūraliomis, fiziologinėmis sąlygomis jau būtų nunykę. Dar žiemos pradžioje preliminariam

eksperimento pabandymui buvo tirta viena bambliu susijungusių ląstelių pora, žadinant ją 5 kartus elektriniu ir 3 kartus terminiu stimulu. 100 % stimuliuotų AP perskrido per bamblių ir buvo sėkmingai užregistruoti. Galbūt visus stimuliuotus AP pro bamblių praleidžianti ląstelė pasitaikė visiškai atsitiktinai, tačiau žiemą tirtos ląstelės buvo jaunesnės ir gyvybingesnės nei pavasario mėnesiais.

Iš visų šiuo tyrimu gautų rezultatų negalime pasakyti, ar verapamilas tikrai blokavo Ca^{2+} jonų kanalus ir ar tik juos; labiau tikėtina, kad verapamilas *Nitellopsis obtusa* ląstelės veikė nespecifiškai, kenkė ląstelių gyvybingumui, tačiau tai neturėjo įtakos AP sklidimo greičiui, o poveikis tarpląsteliniam perdavimui nebuvo nustatytas. ·

IŠVADOS

1. Kontrolinėmis sąlygomis pakartotinai stimuliuojant kas 10 min vidutinis AP sklidimo greitis mažėja iki kol nusistovi ties (19 ± 9) mm/s;
2. Kuo generacijos periodas mažesnis, tuo mažesnis veikimo potencialo sklidimo greitis;
3. 0,1 mM verapamilas sukelia *N. obtusa* tarpubamblinių ląstelių spontaninių AP generaciją ir po to sekančią žūtį;
4. Ląstelę veikiant 0,1 mM verapamilo tirpalu ir pakartotinai stimuliuojant kas 10 min AP sklidimo greitis didėja, tačiau nesiskiria nuo nusistovėjusios vertės kontrolinėmis sąlygomis;
5. Kontrolinėmis sąlygomis tarpląstelinis perdavimas užregistruotas 28 % ląstelių porų, kuriose vidutiniškai prasklido 40 % stimuliuotų AP;
6. 0,1 mM verapamilo poveikis tarpląstelinui perdavimui nenustatytas.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Eglė Plukaitė

Bakalauro baigiamasis darbas

***NITELLOPSIS OBTUSA* VEIKIMO POTENCIALŲ SKLIDIMO GREIČIO
LĄSTELĖSE IR TARPLĄSTELINIO PERDAVIMO TYRIMAS**

SANTRAUKA

Elektriniai signalai augaluose koduoja ir perneša informaciją apie įvairius aplinkos pokyčius siekiant suformuoti atitinkamą organizmo atsaką. Gebėjimą generuoti elektrinius signalus ląstelei suteikia plazminės membranos selektyvus pralaidumas jonams ir dėl jo susidaręs krūvių skirtumas priešingose membranos pusėse. Paprastai citozolyje palaikoma maža Ca^{2+} jonų koncentracija, kad jai padidėjus būtų skatinama plazminės membranos depoliarizacija ir inicijuojamas veikimo potencialo (AP) generavimas. AP generavimo mechanizmas ir jo parametrams įtaką turintys veiksniai jau gana plačiai ištirtinėti, tačiau sklidimo ypatybės nėra tokios aiškios. Naudodamiesi ekstraląsteliniu AP sklidimo registravimo metodu, *Nitellopsis obtusa* tarpbamblynėse ląstelėse tyrėme AP sklidimo greitį ir tarpląstelinį perdavimą kontrolinėmis sąlygomis (APW) bei veikiant ląsteles Ca^{2+} kanalų blokatoriumi verapamilu (0,1 mM). Pakartotinai stimuliuojant pavienes ląsteles kas 10 min elektriniais ir terminiais stimulais, nustatyta AP sklidimo greičio dinamika: nepriklausomai nuo stimulo modalumo, AP sklidimo greičio vertė kaskart stimuliuojant mažėjo iki kol stabilizavosi. Taip pat nustatyta sklidimo greičio priklausomybė nuo generacijos dažnio – kuo didesnis stimulo dažnis, tuo mažesnis AP sklidimo greitis stabilizuojasi. Visą ląstelę veikiant verapamilo tirpalu, nenustatyta jokia įtaka AP sklidimo greičiui, tačiau sukeltas AP spontaninis aktyvumas ir 100% mirtingumas vidutiniškai po 1h; spontaninių AP sklidimo greitis atitiko 2 min intervalais stimuliuotų AP sklidimo greitį. AP tarpląstelinis perdavimas užregistruotas apie 30 % tirtų ląstelių porų, kuriose per bamblių vidutiniškai perskrido apie 40 % stimuliuotų AP. Verapamilo įtaka AP tarpląsteliniam perdavimui liko neaiški.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Eglė Plukaitė

Bachelor thesis

**ACTION POTENTIAL PROPAGATION VELOCITY AND INTERCELLULAR
TRANSMISSION IN *NITELLOPSIS OBTUSA* CELLS**

SUMMARY

Electrical impulses in plants can code and transfer information about various environmental changes and condition an appropriate response. Generation of these impulses in plant cells heavily depends on the plasma membrane selective permeability to particular ions and their gradient on both sides of the membrane. Usually, Ca^{2+} concentration in the cytosol is kept low, whereas its increase causes depolarization of the membrane potential and initiates action potential (AP) generation. However, not much is known about the propagation characteristics of these impulses such as propagation velocity and intercellular transmission, or the compounds potentially affecting them. We used an extracellular AP propagation recording system and oblong *Nitellopsis obtusa* giant internodal cells to measure AP propagation velocity in single cells and intercellular transmission in cell pairs under control conditions (APW) and exposure to Ca^{2+} channel blocker verapamil (0.1 mM). Results showed the dynamics of AP propagation velocity, caused by repetitive stimulation with electrical and thermal stimuli every 10 min: in control solution, regardless of stimulus modality, the very first stimulated AP propagated with the greatest velocity and with each given stimulus it decreased until the value steadied. 0.1 mM verapamil solution evoked two sequences of spontaneous APs – before and after stimulation period; propagation velocity of stimulated APs didn't seem to be affected by verapamil, and spontaneous APs propagated with the same velocity as the APs in control solution caused by repetitive stimulation every 2 min. Intercellular transmission was recorded only in ~ 30 % of all studied cells, and in those cells, ~ 40 % of stimulated APs propagated through the node. Verapamil impact on intercellular transmission remained uncertain.

GAUTŲ REZULTATŲ VIEŠINIMAS

Publikacija:

Koselski, M., Pupkis, V., Hashimoto, K., Lapeikaite, I., Hanaka, A., Wasko, P., **Plukaite, E.**, Kuchitsu, K., Kisnieriene, V., ir Trebacz, K. (2021). Impact of Mammalian Two-Pore Channel Inhibitors on Long-Distance Electrical Signals in the Characean Macroalga *Nitellopsis obtusa* and the Early Terrestrial Liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plants*, 10(4), 647. <https://doi.org/10.3390/plants10040647>

Stendinis pranešimas:

Plukaite E., Pupkis V., Lapeikaite I., Kisnieriene V., Action Potential Propagation Velocity in *Nitellopsis obtusa*. Tarptautinė fizikos ir gamtos mokslų konferencija „Open readings 2021“, Vilnius, Lietuva.

LITERATŪRA

1. Andersson, K. E., & Högestätt, E. D. (1984). On the mechanism of action of calcium antagonists. *Acta Medica Scandinavica. Supplementum*, 681, 11–24.
<https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1984.tb08672.x>
2. Beilby, M. J. (2007). *Action Potential in Charophytes*. International Review of Cytology; Int Rev Cytol. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)57002-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)57002-6)
3. Beilby, M. J., & Casanova, M. T. (2014). *The Physiology of Characean Cells*. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-40288-3>
4. Beilby, M. J., & Coster, H. (1976). The Action Potential in Chara corallina: Effect of Temperature. *Australian Journal of Plant Physiology*, 3, 275.
<https://doi.org/10.1071/PP9760275>
5. Beilby, M. J., & Khazaaly, S. (2016). Re-modeling Chara action potential: I. from Thiel model of Ca²⁺ transient to action potential form. *AIMS Biophysics*, 3, 431–449.
<https://doi.org/10.3934/biophy.2016.3.431>
6. Bethmann, B., Thaler, M., Simonis, W., & Schonknecht, G. (1995). Electrochemical Potential Gradients of H⁺, K⁺, Ca²⁺, and Cl⁻ across the Tonoplast of the Green Alga *Eremosphaera Viridis*. *Plant Physiology*, 109(4), 1317–1326.
<https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1317>
7. Buch-Pedersen, M. J., Pedersen, B. P., Veierskov, B., Nissen, P., & Palmgren, M. G. (2009). Protons and how they are transported by proton pumps. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 457(3), 573–579. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0503-8>
8. Bulychev, A. A. (2019). Cyclosis-mediated intercellular transmission of photosynthetic metabolites in Chara revealed with chlorophyll microfluorometry. *Protoplasma*, 256(3), 815–826. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-01344-0>
9. Christmann, A., Grill, E., & Huang, J. (2013). Hydraulic signals in long-distance signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(3), 293–300.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.02.011>
10. Cook, M., Graham, L., Botha, C., & Lavin, C. (1997). Comparative ultrastructure of plasmodesmata of Chara and selected bryophytes: Toward an elucidation of the evolutionary origin of plant plasmodesmata. *American Journal of Botany*, 84(9), 1169.

11. Demidchik, V., Shabala, S., Isayenkov, S., Cuin, T. A., & Pottosin, I. (2018). Calcium transport across plant membranes: Mechanisms and functions. *New Phytologist*, 220(1), 49–69. <https://doi.org/10.1111/nph.15266>
12. Dorokhov, Y. L., Ershova, N. M., Sheshukova, E. V., & Komarova, T. V. (2019). Plasmodesmata Conductivity Regulation: A Mechanistic Model. *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/plants8120595>
13. Dziubińska, H., Paszewski, A., Trębacz, K., & Zawadzki, T. (1983). Electrical activity of the liverwort *Conocephalum conicum*: The all-or-nothing law, strength-duration relation, refractory periods and intracellular potentials. *Undefined*. /paper/Electrical-activity-of-the-liverwort-Conocephalum-Dziubi%C5%84ska-Paszewski/324024baccd423c6c86023c1998661c1d3a906a6
14. Fillafer, C., Paeger, A., & Schneider, M. F. (2017). Collision of two action potentials in a single excitable cell. *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects*, 1861(12), 3282–3286. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.09.020>
15. Fleurat-Lessard, P., Bouché-Pillon, S., Leloup, C., & Bonnemain, J.-L. (1997). Distribution and Activity of the Plasma Membrane H⁺-ATPase in *Mimosa pudica* L. in Relation to Ionic Fluxes and Leaf Movements. *Plant Physiology*, 113(3), 747–754.
16. Franceschi, V. R., Ding, B., & Lucas, W. J. (1994). Mechanism of plasmodesmata formation in characean algae in relation to evolution of intercellular communication in higher plants. *Planta*, 192(3), 347–358. <https://doi.org/10.1007/BF00198570>
17. Fromm, J., & Lautner, S. (2007, March). *Electrical Signals and Their Physiological Significance in Plants*. Plant, Cell & Environment; Plant Cell Environ. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01614.x>
18. Hamilton, E. S., Schlegel, A. M., & Haswell, E. S. (2015). United in diversity: Mechanosensitive ion channels in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 113–137. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114700>
19. Hedrich, R., & Marten, I. (2011). TPC1-SV channels gain shape. *Molecular Plant*, 4(3), 428–441. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr017>
20. Kamiya, N., & Kuroda, K. (1956). *Velocity Distribution of the Protoplasmic Streaming in Nitella Cells*. <https://doi.org/10.15281/jplantres1887.69.544>
21. Kikuyama, M. (2001). Role of Ca²⁺ in membrane excitation and cell motility in characean cells as a model system. In *International Review of Cytology* (Vol. 201, pp. 85–114). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(01\)01002-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(01)01002-6)

22. Kikuyama, M., Hara, Y., Shimada, K., Yamamoto, K., & Hiramoto, Y. (1992). Intercellular Transport of Macromolecules in *Nitella*. *Plant Cell Physiol.*, 33. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078269>
23. Kisnieriene, V., Lapeikaite, I., & Pupkis, V. (2018). Electrical signalling in *Nitellopsis obtusa*: Potential biomarkers of biologically active compounds. *Functional Plant Biology: FPB*, 45(2), 132–142. <https://doi.org/10.1071/FP16339>
24. Kisnieriene, V., Lapeikaite, I., Pupkis, V., & Beilby, M. J. (2019). Modeling the Action Potential in Characeae *Nitellopsis obtusa*: Effect of Saline Stress. *Frontiers in Plant Science*, 10, 82. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00082>
25. Kisnierienė, V., Sakalauskas, V., Pleskačiauskas, A., Yurin, V., & Rukšėnas, O. (2009). The combined effect of Cd²⁺ and ACh on action potentials of *Nitellopsis obtusa* cells. *Central European Journal of Biology*, 4(3), 343–350. <https://doi.org/10.2478/s11535-009-0028-y>
26. Koselski, M., Pupkis, V., Hashimoto, K., Lapeikaite, I., Hanaka, A., Wasko, P., Plukaite, E., Kuchitsu, K., Kisnieriene, V., & Trebacz, K. (2021). Impact of Mammalian Two-Pore Channel Inhibitors on Long-Distance Electrical Signals in the Characean Macroalga *Nitellopsis obtusa* and the Early Terrestrial Liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plants*, 10(4), 647. <https://doi.org/10.3390/plants10040647>
27. Mimura, T., & Tazawa, M. (1983). Effect of intracellular Ca²⁺ on membrane potential and membrane resistance in tonoplast-free cells of *Nitellopsis obtusa*. *Protoplasma*, 118(1), 49–55. <https://doi.org/10.1007/BF01284746>
28. Morimatsu, M., Nakamura, A., Sumiyoshi, H., Sakaba, N., Taniguchi, H., Kohama, K., & Higashi-Fujime, S. (2000). The molecular structure of the fastest myosin from green algae, *Chara*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270(1), 147–152. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2391>
29. Oparka, K. J. (1993). Signalling via plasmodesmata—The neglected pathway. *Seminars in Cell Biology*, 4(2), 131–138. <https://doi.org/10.1006/scel.1993.1016>
30. Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
31. Price, A. H., Taylor, A., Ripley, S. J., Griffiths, A., Trewavas, A. J., & Knight, M. R. (1994). Oxidative Signals in Tobacco Increase Cytosolic Calcium. *The Plant Cell*, 6(9), 1301–1310. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.9.1301>

32. Pupkis, V., Buisas, R., Lapeikaite, I., & Kisnieriene, V. (2020). *Using Plant Cells of Nitellopsis obtusa for Biophysical Education*.
<https://doi.org/10.35459/tbp.2019.000130>
33. Raghavan, M., Fee, D., & Barkhaus, P. E. (2019). Generation and propagation of the action potential. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 160, pp. 3–22). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64032-1.00001-1>
34. Reid, R. J., & Overall, R. L. (1992). Intercellular communication in Chara: Factors affecting transnodal electrical resistance and solute fluxes. *Plant, Cell & Environment*, 15(5), 507–517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1992.tb01484.x>
35. Sager, R., & Lee, J.-Y. (2014). Plasmodesmata in integrated cell signalling: Insights from development and environmental signals and stresses. *Journal of Experimental Botany*, 65(22), 6337–6358. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru365>
36. Shepherd, V. A., & Goodwin, P. B. (1992). Seasonal patterns of cell-to-cell communication in Chara corallina Klein ex Willd. I. Cell-to-cell communication in vegetative lateral branches during winter and spring. *Plant, Cell & Environment*, 15(2), 137–150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1992.tb01468.x>
37. Shimmen, T. (2001). Electrical perception of “death message” in Chara: Involvement of turgor pressure. *Plant & Cell Physiology*, 42(4), 366–373.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pce047>
38. Sibaoka, T., & Tabata, T. (1981). Electrotonic Coupling between Adjacent Internodal Cells of Chara braunii: Transmission of Action Potentials beyond the Node. *Plant and Cell Physiology*, 22(3), 397–411. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076182>
39. Stahlberg, R., & Cosgrove, D. J. (1997). The Propagation of Slow Wave Potentials in Pea Epicotyls. *Plant Physiology*, 113(1), 209–217.
40. Sukhov, V. (2016, December). *Electrical Signals as Mechanism of Photosynthesis Regulation in Plants*. Photosynthesis Research; Photosynth Res.
<https://doi.org/10.1007/s11120-016-0270-x>
41. Sukhov, Vladimir, Nerush, V., Orlova, L., & Vodeneev, V. (2011). Simulation of action potential propagation in plants. *Journal of Theoretical Biology*, 291, 47–55.
<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2011.09.019>
42. Sukhov, Vladimir, & Vodeneev, V. (2009). A Mathematical Model of Action Potential in Cells of Vascular Plants. *Journal of Membrane Biology*, 232(1), 59.
<https://doi.org/10.1007/s00232-009-9218-9>

43. Tabata, T., & Sibaoka, T. (1987). Conduction Velocity and Blockage of Action Potential in Chara Internodal Cells. *Plant and Cell Physiology*, 28(7), 1187–1194. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077405>
44. Tazawa, M., & Kishimoto, U. (1968). Cessation of cytoplasmic streaming of Chara internodes during action potential. *Plant and Cell Physiology*, 9(2), 361–368. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a079352>
45. Tsutsui, I., Ohkawa, T., Nagai, R., & Kishimoto, U. (1987). Role of calcium ion in the excitability and electrogenic pump activity of the Chara corallina membrane: I. Effects of La³⁺, verapamil, EGTA, W-7, and TFP on the action potential. *The Journal of Membrane Biology*, 96(1), 65–73. <https://doi.org/10.1007/BF01869335>
46. Vodeneev, V., Akinchits, E., & Sukhov, V. (2015). *Variation Potential in Higher Plants: Mechanisms of Generation and Propagation*. Plant Signaling & Behavior; Plant Signal Behav. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1057365>
47. WHITE, P. J., & BROADLEY, M. R. (2003). Calcium in Plants. *Annals of Botany*, 92(4), 487–511. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg164>
48. Zawadzki, T., Davies, E., Dziubinska, H., & Trebacz, K. (1991). Characteristics of action potentials in Helianthus annuus. *Physiologia Plantarum*, 83(4), 601–604. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb02475.x>
49. Zimmermann, M. R., Maischak, H., Mithöfer, A., Boland, W., & Felle, H. H. (2009). System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding. *Plant Physiology*, 149(3), 1593–1600. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133884>