

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.640>

<https://orcid.org/0000-0002-4348-0142>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Vilmantas Pupkis

Menturdumblių *Nitellopsis obtusa*  
membranų  $\text{Ca}^{2+}$  pernašos sistemų  
elektrofiziologinis tyrimas

**DAKTARO DISERTACIJA**

Gamtos mokslai,  
Biofizika (N 011)

VILNIUS 2024

Disertacija rengta 2019–2023 metais Vilniaus universitete.

**Mokslinė vadovė** – doc. dr. Vilma Kisnierienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biofizika, N 011).

Gynimo taryba:

**Pirmininkas** – prof. dr. Saulius Šatkauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biofizika, N 011).

**Nariai:**

prof. dr. Aidas Alaburda (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biofizika, N 011),

prof. dr. Virginijus Barzda (Toronto universitetas, Kanada, gamtos mokslai, biofizika, N 011),

doc. dr. Robertas Guzulaitis (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biofizika, N 011),

prof. dr. Daumantas Matulis (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2024 m. rugpjūčio mėn. 28 d. 15:30 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje. Adresas: (Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva), tel. +370 5223 4420; el. paštas [info@gmc.vu.lt](mailto:info@gmc.vu.lt) Disertacija bus ginama lietuvių kalba.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.640>

<https://orcid.org/0000-0002-4348-0142>

VILNIUS UNIVERSITY

Vilmantas Pupkis

Electrophysiological Investigation of  
Macroalgae *Nitellopsis obtusa*  
Membrane Ca<sup>2+</sup> Transport Systems

**DOCTORAL DISSERTATION**

Natural Sciences,  
Biophysics (N 011)

VILNIUS 2024

The dissertation was prepared between 2019 and 2023 at Vilnius University.

**Academic supervisor** – Assoc. Prof. Dr. Vilma Kisnierienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biophysics, N 011)

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

**Chairman** – Prof. Dr. Saulius Šatkauskas (Vytautas Magnus University, Natural sciences, Biophysics, N 011).

**Members:**

Prof. Dr. Aidas Alaburda (Vilnius University, Natural Sciences, Biophysics, N 011),

Prof. Dr. Virginijus Barzda (University of Toronto Mississauga (Canada), Natural sciences, Biophysics, N 011),

Assoc. Prof. Dr. Robertas Guzulaitis (Vilnius University, Natural Sciences, Biophysics, N 011),

Prof. Dr. Daumantas Matulis (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 3:30 PM on 28<sup>th</sup> August 2024 in Room R401 of the Life Sciences Center, Vilnius University. Address: Saulėtekio Ave. 7, Vilnius, Lithuania. Tel. +370 5223 4420; e-mail: [info@gmc.vu.lt](mailto:info@gmc.vu.lt)

The dissertation shall be defended in Lithuanian.

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

[www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)

## SANTRUMPOS

- ABA – augalų streso hormonas abscizinė rūgštis
- ACS – (angl. *artificial cell sap*) – dirbtinės ląstelės sultys, kontrolinis tirpalas
- ALMT – (angl. *Aluminium-induced malate transporter*) malato transporteriai
- APW – (angl. *artificial pond water*) – dirbtinis tvenkinio vanduo, kontrolinis tirpalas
- CICR – (angl. *Calcium-induced calcium release*) -  $\text{Ca}^{2+}$  indukuotas  $\text{Ca}^{2+}$  išleidimas
- DMSO – dimetilsulfoksidas, tirpiklis
- $E_{th}$  – veikimo potencialo sužadinimo slenkstis
- GLR – augalų glutamato receptoriai
- HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazino etanosulfoninė rūgštis, buferis
- $\text{IP}_3$  – inozitolio 1,4,5-trisfosfatas
- $\text{IP}_6$  – inozitolio heksakisfosfatas
- MP – membranos potencialas
- NED-19 –  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatorius
- PLC – fosfolipazė C
- RP – membranos ramybės potencialas
- TPC / SV – (angl. *two-pore / slow vacuolar channel*) – dviejų porų / lėtieji vakuoliniai kanalai
- TPK – (angl. *tandem pore  $\text{K}^+$  channel*) - tandeminių porų  $\text{K}^+$  kanalas
- TRIS – tris(hidroksimetil)aminometanas, buferis
- U73122 – fosfolipazės C inhibitorius
- VP – veikimo potencialas

## TURINYS

1. ĮVADAS .....	9
1.1. Tikslas ir uždaviniai .....	11
1.2. Ginamieji teiginiai .....	11
2. LITERATŪROS APŽVALGA .....	12
2.1. Membranų pernašos sistemos augaluose .....	12
2.1.1. Augalų plazminės membranos $K^+$ kanalai .....	12
2.1.2. Augalų plazminės membranos anijonų kanalai .....	13
2.1.3. Augalų plazminės membranos $Ca^{2+}$ laidūs kanalai .....	14
2.1.4. Augalų vakuolės membranos jonų kanalai .....	15
2.1.5. Augalų elektrogeninės pompos .....	15
2.2. Augalų elektriniai signalai .....	16
2.2.1. Augalų veikimo potencialai .....	16
2.2.2. Augalų veikimo potencialų molekulinis mechanizmas .....	17
2.3. Characeae šeimos menturdumbliai .....	20
2.4. Characeae šeimos dumblių jonų pernašos sistemos .....	21
2.4.1. Characeae šeimos dumblių $K^+$ kanalai ir transporteriai .....	21
2.4.2. Characeae šeimos dumblių anijonų kanalai .....	22
2.4.3. Characeae šeimos dumblių $Ca^{2+}$ laidūs kanalai .....	23
2.4.4. Characeae šeimos dumblių elektrogeniniai transporteriai .....	24
2.5. Characeae šeimos dumblių veikimo potencialai .....	25
2.5.1. Thielio-Beilby modelis .....	25
2.6. Potencialus Characeae šeimos dumblių veikimo potencialų molekulinis mechanizmas .....	27
2.6.1. Characeae šeimos dumblių $K^+$ kanalų molekulinė tapatybė .....	27
2.6.2. Characeae šeimos dumblių $Cl^-$ kanalų molekulinė tapatybė .....	28
2.6.3. Characeae šeimos dumblių $Ca^{2+}$ kanalų molekulinė tapatybė .....	29
2.6.4. Kitų Characeae šeimos dumblių transporterių molekulinė tapatybė .....	33
2.7. Inozitolio fosfatai augaluose .....	35

2.7.1. Inozitolio 1,4,5-trisfosfatas (IP <sub>3</sub> ) ir jo vaidmuo.....	36
2.7.2. Inozitolio heksakisfosfatas (IP <sub>6</sub> ) ir jo vaidmuo .....	38
3. METODAI .....	41
3.1. Tiriamieji menturdumbliai <i>Nitellopsis obtusa</i> .....	41
3.2. Naudoti tirpalai .....	41
3.3. Tarpubamblinių ląstelių elektrofiziologinių atsakų tyrimas .....	42
3.4. Citoplazminių lašų jonų kanalų tyrimas .....	49
3.5. Ciklozės greičio tyrimas .....	49
3.6. Tarpubamblinių ląstelių gyvybingumo tyrimas.....	50
3.7. Statistinė analizė .....	50
3.8. Autoriaus indėlis.....	52
4. REZULTATAI.....	54
4.1. Ca <sup>2+</sup> kanalų blokatorių poveikio tyrimas .....	54
4.1.1. Verapamilo poveikio tyrimas .....	54
4.1.2. Tetrandrino poveikio tyrimas .....	61
4.1.3. NED-19 poveikio tyrimas.....	70
4.1.4. Lantano poveikio tyrimas .....	76
4.2. Inozitolio fosfatų poveikio tyrimas.....	78
4.2.1. Inozitolio 1,4,5-trisfosfato (IP <sub>3</sub> ) poveikio tyrimas.....	79
4.2.2. Inozitolio heksakisfosfato (IP <sub>6</sub> ) poveikio tyrimas .....	82
5. DISKUSIJA .....	93
5.1. Ca <sup>2+</sup> kanalų blokatorių poveikis <i>Nitellopsis obtusa</i> ląstelėms .....	93
5.2. Tirpiklio DMSO poveikis <i>Nitellopsis obtusa</i> ląstelėms .....	96
5.3. Inozitolio fosfatų poveikis <i>Nitellopsis obtusa</i> ląstelėms .....	97
5.3.1. Inozitolio 1,4,5-trisfosfato (IP <sub>3</sub> ) poveikis .....	97
5.3.2. Inozitolio heksakisfosfato (IP <sub>6</sub> ) poveikis.....	98
5.4. Tyrimo ribotumas .....	100
IŠVADOS .....	102
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	103
PRIEDAI.....	125

SUMMARY.....	192
PADEKA .....	220
APIE DISERTANTA .....	221



## 1. ĮVADAS

Siekdami išgyventi nuolat besikeičiančiomis aplinkos sąlygomis, augalai nuolat analizuoja savo aplinką, reaguoja į aplinkos sąlygų pokyčius ir adaptuojasi. Negalėdami pakeisti savo gyvenamosios vietos, augalai turi kuo tiksliau ir kuo greičiau aptikti aplinkos sąlygų pokyčius ir atitinkamai reguliuoti savo fiziologinius procesus (Conde *et al.*, 2011). Pavyzdžiui, žinoma, kad keičiantis aplinkos apšvietimo intensyvumui, augalai geba aktyvuoti arba prislopinti fotosintetinius procesus įvairiais lygmenimis – molekulinio, organelių, ląstelių, ar net viso organizmo (Velez-Ramirez *et al.*, 2011). Įvairaus modalumo išoriniai veiksniai – žolėdžių sukeltos mechaninės pažeidimai, išaugusio aplinkos druskingumo stresas, išdžiūvimas – gali reikalauti sisteminio viso augalo atsako, ypač, jei kyla grėsmė organizmui žūti (Fromm, Lautner, 2007). Dėl šios priežasties reikalinga greitai perduoti informaciją iš lokaliai paveiktos augalo vietos į kitas jo kūno dalis ir inicijuoti plataus spektro atsakus, įskaitant fotosintetinių procesų ir ląstelinio kvėpavimo intensyvumo moduliavimą, genų raiškos pokyčius, streso hormonų sintezę (Sukhov *et al.*, 2019). Difuzijos būdu perduodami cheminiai signalai reikiamo informacijos perdavimo greičio užtikrinti negali, todėl augalai pasitelkia elektrinius signalus (Pyatygin, 2008) – grįžtamojo ryšio ciklais paremtas sklindančias membranos poliarizacijos bangas (Sukhov *et al.*, 2019). Veikiant augalą žeidžiančiu stimulu, sugeneruojama kintančios formos erdvėje slopstanti membranos depoliarizacijos banga – variabilus potencialas, bet, jei stimulus yra tik dirginantis, bet ne žeidžiantis, sugeneruojamas veikimo potencialas (VP) – pastovios formos ilgais atstumais sklindanti membranos depoliarizacijos banga (Vodeneev *et al.*, 2016).

Veikimo potencialai augaluose pirmą kartą aptikti XIX amžiuje, tiriant jautriuosius musėkautus (*Dionaea muscipula*) (Burdon-Sanderson, 1873), viduląsteliniais mikroelektrodais pirmą kartą augalų VP pavyko užregistruoti XX a. pradžioje Characeae šeimos dumbliuose *Nitella mucronata* (Umrath, 1930). Nepaisant ilgos tyrimų istorijos, dar nėra iki galo išaiškinta, koku būdu sklindantis VP inicijuoja stebimus fiziologinius pokyčius, kita vertus, iki galo nėra išgvildentas ir VP generavimo mechanizmas. Žinoma, kad, priešingai nei gyvūnuose, membraną depoliarizuojantį srautą sudaro ne  $\text{Na}^+$ , bet  $\text{Ca}^{2+}$  ir  $\text{Cl}^-$  jonai, o repoliarizacijos fazę, kaip ir gyvūnuose, įgalina  $\text{K}^+$  kanalų aktyvavimas (Beilby, 2007).

Jau kurį laiką mėginama sieti konkrečias VP generavimo metu stebimas jonų sroves su tam tikrų genų raiškos produktais (Cuin *et al.*, 2018). Tik

neseniai literatūroje išsamiai aprašytas pirmojo aukštesniojo augalo – jautriojo musėkauto – VP generavimo mechanizmas, identifikuoti už šį procesą atsakingi baltymai (Iosip *et al.*, 2020; Scherzer, Böhm, *et al.*, 2022; Hedrich, Kreuzer, 2023). Vis dėlto, nedera pamiršti, kad jautriojo musėkauto generuojami VP savo biofizikinėmis savybėmis ir išskirtine funkcija nėra panašūs į daugelio kitų augalų VP, tad negalima teigti, kad visų augalų VP generavimo mechanizmas yra identiškas. Ypač trūksta žinių apie VP generavimo iniciaciją: žinoma, kad pradinė depoliarizacija yra sukeliama  $\text{Ca}^{2+}$  kanalams praleidžiant  $\text{Ca}^{2+}$  jonus į citoplazmą (Lunevsky *et al.*, 1983), tačiau vis dar diskutuojama dėl šių kanalų molekulinės tapatybės, jų reguliavimo principų (Kisnieriene *et al.*, 2022). Aukštesniuosiuose augaluose  $\text{Ca}^{2+}$  srovę įgalina gyvūnų jonotropiniams glutamato receptoriams (iGluR) homologiški glutamato receptoriai GLR (Mousavi *et al.*, 2013; Salvador-Recatalà, 2016; Hedrich, Kreuzer, 2023). Vis dėlto, nusekvenavus elektriškai sužadintų menturdumblių *Chara braunii* genomą, paaiškėjo, kad jame nėra GLR kanalus koduojančių genų (Nishiyama *et al.*, 2018), nors tos pačios šeimos atstovų *Nitellopsis obtusa* VP parametrai yra moduluojami aminorūgščių (Lapeikaitė *et al.*, 2019, 2020).

Siekiant paaiškinti Characeae šeimos dumblių VP generavimo mechanizmą, pritaikytas gyvūninėse sistemose nustatytas principas, pagal kurį pradinę membranos depoliarizaciją sukelia  $\text{Ca}^{2+}$  srovė per kanalą, aktyvuojamus antrinės signalinės molekulės – inozitolio 1,4,5-trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ). Remiantis šia prielaida bei eksperimentiniais elektrofiziologiniais duomenimis, sukurtas matematinis Thielio-Beilby modelis, aprašantis membranos potencialo (MP) kitimą Characeae šeimos dumbliuose VP generavimo metu (Biskup *et al.*, 1999; Wacke, Thiel, 2001; Wacke *et al.*, 2003; Beilby, Al Khazaaly, 2016, 2017; Kisnieriene *et al.*, 2019). Nepaisant modelio tinkamumo simuliuojant empirinius duomenis, neatkartoti kai kurie eksperimentiniai rezultatai verčia abejoti kertine prielaida, pagal kurią  $\text{Ca}^{2+}$  kanalai aktyvuojami  $\text{IP}_3$  (Tazawa, Kikuyama, 2003). Dar daugiau, nei viename iš nusekvenuotų augalų genomų nėra rasta gyvūnų  $\text{IP}_3$  receptorių genams homologiškų genų (Krinke *et al.*, 2007; Edel, Kudla, 2015). Keliama hipotezė, kad augaluose kaip aktyvi signalinė molekulė gali veikti ne  $\text{IP}_3$ , o visiškai fosforilinta inozitolio forma – inozitolio heksakisfosfatas ( $\text{IP}_6$ ) (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2000, 2003; Munnik, Vermeer, 2010), tačiau iki šiol nežinoma, ar ši medžiaga veikia augalų ląstelių elektrinį sužadimumą.

Taigi, nors  $\text{Ca}^{2+}$  vaidmuo augalų elektrinių signalų generavimo procese yra neginčijamas, vis dar trūksta žinių, kokiomis savybėmis pasižymi Characeae šeimos dumblių VP inicijuojantys  $\text{Ca}^{2+}$  kanalai, kokie specifiniai jonų kanalų blokatoriai gali juos blokuoti, kokios potencialios signalinės

molekulės gali juos aktyvuoti. Ypač daug klausimų kyla, nustatant potencialių antrinių signalinių molekulių  $IP_3$  (ir galimai  $IP_6$ ) vaidmenį VP generavimo procese.

### 1.1. Tikslas ir uždaviniai

Išsikeltas tikslas nustatyti  $Ca^{2+}$  pernašos sistemų įtaką menturdumblių *Nitelloopsis obtusa* elektrofiziologiniams atsakams, moduluojant šių sistemų aktyvumą.

Šiam tikslui pasiekti išsikelti uždaviniai:

- charakterizuoti  $Ca^{2+}$  kanalų blokatorių verapamilo, tetrandrino, NED-19 ir  $La^{3+}$  poveikį *Nitelloopsis obtusa* elektrofiziologiniams parametrams;
- įvertinti potencialių antrinių signalinių molekulių inozitolio 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ) ir inozitolio heksakisfosfato ( $IP_6$ ) poveikį veikimo potencialų iniciacijai ir generavimui *Nitelloopsis obtusa* ląstelėse.

### 1.2. Ginamieji teiginiai

- Tirti  $Ca^{2+}$  kanalų blokatoriai – verapamilas ir NED-19 – depoliarizuoja *Nitelloopsis obtusa* veikimo potencialo sužadinimo slenkstį, tačiau pasižymi ir nespecifiniu poveikiu.
- Inozitolio heksakisfosfatas ( $IP_6$ ) hiperpoliarizuoja *Nitelloopsis obtusa* veikimo potencialo sužadinimo slenkstį.
- Inozitolio heksakisfosfatas ( $IP_6$ ) geriau nei inozitolio 1,4,5-trisfosfatas ( $IP_3$ ) atitinka hipotetinę antrinę signalinę molekulę matematiniam menturdumblių veikimo potencialų generavimo Thielio-Beilby modelyje.

## 2. LITERATŪROS APŽVALGA

### 2.1. Membranų pernašos sistemos augaluose

Augaluose tiek plazminėje membranoje, tiek ir vakuolės membranoje – tonoplaste – esama įvairių jonų kanalų ir transporterių, atsakingų už daugelį fiziologinių funkcijų: per šias pernašos sistemas iš aplinkos pasisavinamos reikalingos neorganinės medžiagos, iš ląstelių ir į jas gali patekti susintetinti organiniai junginiai, taip pat palaikoma jonų homeostazė, priešinamasi sunkiųjų metalų, padidėjusio druskingumo aplinkoje ir kitų veiksnių sukeltam stresui (Conde *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2021). Elektrinių signalų formavimui ypač svarbios protonų bei  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazės ir jonų kanalai, nes šios pernašos sistemos kuria ir keičia jonų gradientus, kurių aktyvumo pokyčiai lemia signalų perdavimą tolimais atstumais. Daugiausiai žinių turima apie dažniausiai tiriamo modelinio augalo baltažiedžio vairo (Arabidopsis thaliana) pernašos sistemas ir jas koduojančius genus (Hedrich, 2012).

#### 2.1.1. Augalų plazminės membranos $\text{K}^+$ kanalai

Iš visų jonų kanalų tipų augalų  $\text{K}^+$  kanalai pasižymi didžiausia gausa ir įvairove pagal struktūrą, rektifikavimą ir valdymą. Daugumos baltažiedžio vairo plazminės membranos  $\text{K}^+$  kanalų aktyvumas priklauso nuo įtampos, šie kanalai priklauso nesiinaktyvuojančių *Shaker* ( $\text{K}_V$ ) kanalų tipui (Dreyer, Uozumi, 2011).

AKT1 (*Arabidopsis K<sup>+</sup> Transporter 1* – vairo  $\text{K}^+$  transporteris 1) kanalai ekspresuojami šaknyse ir šakniaplaukiuose, sudaro kompleksus su savaime neaktyviu, bet AKT1 jautrumą įtampai moduliuojančiu kanalu *AtKC1/KAT3* (*K<sup>+</sup> Channel 1 / K<sup>+</sup> Arabidopsis' Transporter 3* –  $\text{K}^+$  kanalas 1 /  $\text{K}^+$  transporteris vairyje). Šiuos kanalus aktyvuoja membranos hiperpolarizacija, jie praleidžia įtekančias  $\text{K}^+$  sroves. Taip pat  $\text{K}_{in}$  tipui priskiriami silpnai rektifikuojantys AKT2 kanalai, kartais vadinami AKT3 arba AKT2/3. Šiai kanalų grupei priklauso ir AKT5 bei AKT6/SPIK (*Shaker Pollen Inward K<sup>+</sup> channel* – *Shaker* tipo  $\text{K}_{in}$  kanalas dulkiadaigiuose) kanalai, ekspresuojami dulkiadaigiuose. Visų šių kanalų funkcija –  $\text{K}^+$  pasisavinimas iš ląstelės aplinkos (Dreyer, Uozumi, 2011; Pantoja, 2021).

Taip pat įtekančias  $\text{K}^+$  sroves praleidžia KAT1 ir KAT2 kanalai, ekspresuojami baltažiedžio vairo žiotelių varstomosiose ląstelėse. Šių kanalų funkcija – žiotelių varstymosi reguliavimas keičiant turgorą (Pantoja, 2021).

GORK kanalai (*Guard cell outward rectifying K<sup>+</sup> channel* – varstomųjų ląstelių K<sub>out</sub> kanalas) ekspresuojami žiotelių varstomosiose ląstelėse. Remiantis bioinformatiniais duomenimis, GORK kanalų aktyvumą potencialiai galėtų veikti specifiskai prisijungusios signalinės molekulės –  $\gamma$  aminosviesto rūgštis (GABA), G baltymai, cikliniai nukleotidai, fosforilinto inozitolio junginiai (Ache et al. 2000; Adem et al. 2019). GORK kanalų homologai SKOR (*Stelar K<sup>+</sup> outward rectifier* – šaknies centrinio veleno K<sub>out</sub> kanalas) randami ksilemos parenchimos ląstelėse. Šie kanalai praleidžia ištekančias K<sup>+</sup> sroves, jų aktyvacija sekundžių eilės, inaktyvacija nestebima (Pantoja, 2021).

Vienintelis dviejų porų / tandeminių porų (*two-pore / tandem-pore*) grupės kanalas, aptinkamas plazminėje membranoje – TPK4. Šių kanalų aktyvumas nepriklauso nuo įtampos, nors lengviau praleidžiamos įtekančios srovės, kanalai aktyvuojami mechaninės jėgos, juos blokuoja [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>. Šie kanalai veikia kaip viduląsteliniai osmolingumo jutikliai, reguliuoja MP (Becker et al., 2004; Sharma et al., 2013).

Visų šių kanalų savybės ir funkcijos detalai apžvelgtos (Dreyer, Uozumi, 2011; Hedrich, 2012; Sharma et al., 2013; Pantoja, 2021).

### 2.1.2. Augalų plazminės membranos anijonų kanalai

Anijonų kanalai augaluose laidūs ne tik iš visų anijonų elektrofiziologiškai svarbiausiems Cl<sup>-</sup> jonams, bet ir nitratams, sulfatams, kitiems anijonams. Šie kanalai atsakingi už osmolingumo reguliavimą, metabolitų paskirstymą ląstelėje ir kitas funkcijas (Barbier-Brygoo et al., 2011). Pagal savybes, anijonų kanalai baltažiedžiame vairyneje skirstomi į S-tipo, R-tipo ir jautrius aliuminiui (Hedrich, 2012).

S-tipo (*slow* – lėtos aktyvacijos) – SLAC1 kanalai (*Slow Anion Channel 1* – lėtos aktyvacijos anijonų kanalas 1) ekspresuojami žiotelių varstomosiose ląstelėse. Jie pasižymi silpna priklausomybe nuo įtampos ir lėta deaktyvacija ties hiperpolarizuojančiomis įtampomis. Taip pat aptinkami 4 SLAC1 homologai – SLAH kanalai. SLAH3 randami žiotelių varstomosiose ląstelėse, pasižymi panašiomis savybėmis į SLAC1, bet yra selektyvesni nitratui, o ne chloridui, aktyvuojami depoliarizacijos (Hedrich, 2012; Pantoja, 2021).

Geriausiai ištirtas R-tipo (*rapid* – greitos aktyvacijos) kanalų atstovas – QUAC1 (*quick anion channel* – greitos aktyvacijos anijonų kanalas). QUAC1 aktyvuoja depoliarizacija, šie kanalai pasižymi stipria priklausomybe nuo įtampos, greita aktyvacijos ir deaktyvacijos kinetika, laidžiausi malatui ir sulfatui. Aptikta, kad šiuos kanalus koduoja *ALMT12*

genas. ALMT (*Aluminium-induced malate transporter* – malato transporteriai, rasti aliuminiui atspariose kviečių linijose) šeimos atstovai yra malatui laidūs kanalai, daugiausiai aptinkami plazminėje membranoje, jų funkcija susijusi su žiotelių varstymusi (Hedrich, 2012; Pantoja, 2021). Vis dėlto, nors apie 40 % R-tipo srovių lemia jonų tekėjimas per ALMT12, tačiau, išveiklinus šį kanalą koduojantį geną, dalis srovių išlieka. Spėjama, kad jas lemia ne vien ALMT tipo kanalai (Meyer *et al.*, 2010; Barbier-Brygoo *et al.*, 2011; Jašlan *et al.*, 2023).

Baltažiedis vairėnis taip pat turi 10 MSL (*Mechano sensitive-like* – mechaniniam poveikiui jautrių) kanalų, aktyvuojamų membranos įtempimo, nepriklausančių nuo įtampos, laidesnių anijonams (Maksaev, Haswell, 2012).

Anijonų kanalai augaluose plačiai apžvelgti (Barbier-Brygoo *et al.*, 2011; Hedrich, 2012; Pantoja, 2021).

### 2.1.3. Augalų plazminės membranos $\text{Ca}^{2+}$ laidūs kanalai

Augalų  $\text{Ca}^{2+}$  kanalai mažai tirti. Dauguma iš jų yra neselektyvūs, be  $\text{Ca}^{2+}$  praleidžiantys ir kitus katijonus, pasižymintys sudėtingais valdymo mechanizmais (Demidchik *et al.*, 2018).

Įtampos valdomų  $\text{Ca}^{2+}$  laidžių kanalų molekulinė tapatybė augaluose nežinoma. Šiuos kanalus (ar jų grupes) aktyvuoja hiperpoliarizacija,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hormonas abscizinė rūgštis (ABA) (Pottosin *et al.*, 2009).

Plačiau ištirti ciklinių nukleotidų valdomi kanalai CNGC (*cyclic nucleotide-gated channel*). Baltažiedis vairėnis turi 20 jų izoformų, dauguma jų aptinkami plazminėje membranoje, yra aktyvuojami hiperpoliarizacijos,  $\text{Ca}^{2+}$ , kalmodulino (Kaplan *et al.*, 2007; Pantoja, 2021).

Kita didelė ligandų valdomų neselektyvių katijonų kanalų grupė – glutamato receptoriai GLR (*glutamate receptor-like receptors*), homologiški gyvūnų jonotropiniams glutamato receptoriams. Baltažiedžio vairėnio genome esama 20 šio tipo kanalų genų kopijų. GLR kanalus aktyvuoja aminorūgštys, GLR3.3 ir GLR3.6 susiję su išaugusia streso hormono jazminų rūgšties sinteze sugeneravus VP (Vincent *et al.*, 2017).

MCA1 (*mid1-complementing activity 1* – mielių *mid1* mutantų laukinio tipo fenotipą atstatantis baltymas 1) ir MCA2 kanalai – aktyvuojami mechaninio poveikio. Taip pat esama vieno PIEZO kanalo (Pantoja, 2021).

Prie  $\text{Ca}^{2+}$  laidžių kanalų priskiriami ir OSCA (*reduced hyperosmolarity induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase* – hiperosmoliariškumo sukulto  $\text{Ca}^{2+}$  srauto) kanalai, jautrūs padidėjusiam aplinkos osmolingumui, tikėtina, atsidarantys dėl lipidinės membranos sukuriama mechaninio įtempimo (Zhang *et al.*,

2018; Murthy *et al.*, 2018).  $\text{Ca}^{2+}$  laidūs taip pat ir daugelyje augalų rūšių aptinkami, bet mažai tirti aneksinai (Sharma, Singh, 2023).

Visi šie kanalai išsamiai apžvelgti (Hedrich, 2012; Demidchik *et al.*, 2018; Pantoja, 2021)

#### 2.1.4. Augalų vakuolės membranos jonų kanalai

Dėl taikytų specifinių metodikų, augalų vakuolės membranos jonų kanalai vieni iš pirmųjų pradėti tirti „patch clamp“ metodu, dėl to dauguma iš jų yra gerai funkciškai charakterizuoti dar prieš pradedant disponuoti genominiais duomenimis (Hedrich *et al.*, 1986). Geriausiai ištirti lėtieji vakuoliniai SV (*slow vacuolar*) kanalai, kuriuos koduoja *TPC1* (*two pore channel*) genas. Šie kanalai neselektyvūs, laidžiausi  $\text{K}^+$ , šiek tiek  $\text{Na}^+$  ir  $\text{Ca}^{2+}$ , valdomi įtampos ir  $\text{Ca}^{2+}$  –  $\text{Ca}^{2+}$  jonai citoplazmoje juos aktyvuoja, vakuolėje – blokuoja (Hedrich, Marten, 2011).

Dauguma *TPK* kanalų genų – *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* ir *TPK5* – reiškiami tonoplaste, tačiau tik vieno iš jų – *TPK1* – funkcinis atitikmuo yra žinomas. Šis genas koduoja vakuolinius  $\text{K}^+$  (VK) kanalus, kurių aktyvumas nepriklauso nuo įtampos, citoplazminis  $\text{Ca}^{2+}$  VK kanalus aktyvuoja (Voelker *et al.*, 2010).

Greituosius vakuolinius kanalus FV (*fast vacuolar channels*) tikriausiai atitinka *KCO3* (*K<sup>+</sup> channel 3, Ca<sup>2+</sup> activated, outward rectifying* –  $\text{Ca}^{2+}$  aktyvuojamas  $\text{K}_{\text{out}}$  kanalas 3) genas, giminiškas *TPK* genams. Šie kanalai katijonams neselektyvūs, blokuojami citoplazminio  $\text{Ca}^{2+}$  (Pantoja, 2021).

Kai kurie chlorido kanalų CLC (*chloride channel*) grupės nariai gali funkcionuoti kaip jonų kanalai, kai kurie – kaip anijonų / protonų antiporteriai. Iš 7 baltažiedžio vairo CLC transporterių tonoplaste randami 4 – CLCa, CLCb, CLCc ir CLCg. Pirmieji trys, spėjama, atsakingi už  $\text{NO}_3^- / \text{H}^+$  keitimą, o CLCg veikia kaip tradicinis anijonų kanalas. CLC funkcijos siejamos su  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , kartais ir organinių anijonų homeostaze, MP formavimu, atsaku į padidėjusio aplinkos druskingumo stresą (Nedelyaeva *et al.*, 2020).

Taip pat tonoplaste randamas kanalas ALMT6 (Pantoja, 2021).

Vakuolės jonų kanalai apžvelgti (Isayenkov *et al.*, 2010; Dreyer, Uozumi, 2011; Hedrich, 2012; Sharma *et al.*, 2013; Pantoja, 2021).

#### 2.1.5. Augalų elektrogeninės pompos

Daugeliui fiziologinių procesų pritaikomi transmembraniniai protonų gradientai, elektrofiziologiniame kontekste tai leidžia sukurti ir kitų jonų

gradientus, taip įgalinant ir jonų kanalų veiklą. Plazminėje membranoje esama P-tipo  $H^+$ -ATPazių, tonoplaste – V-tipo  $H^+$ -ATPazių, taip pat aptinkama ir vakuolinių  $H^+$ -pirofosfatazių (V-PPazių). Šie baltymai perkelia protonus iš citoplazmos į atitinkamai ekstraląstelinę erdvę ir vakuolę (Hedrich, 2012). Autoinhibicinio tipo  $H^+$ -ATPazės AHA (*Autoinhibited  $H^+$ -ATPase*) hiperpoliarizuoja MP ir taip skatina  $K^+$  pasisavinimą iš aplinkos per  $K_{in}$  kanalus (Wang *et al.*, 2022), dalyvauja nuo ABA priklausomame žiotelių užsivėrime, sukeldamos  $K^+$  įtekėjimą (Pei *et al.*, 2022), padeda atsilaikyti prieš druskingumo stresą, kurdamos protonų gradientus, kurie gali būti panaudojami nepageidaujamų jonų pašalinimui iš ląstelės (Vitart *et al.*, 2001). Šios protonų pompos gali būti aktyvuojamos MP depoliarizacijos (Reyer *et al.*, 2020).

Žemas  $Ca^{2+}$  koncentracijas citoplazmoje palaiko P-tipo  $Ca^{2+}$ -ATPazės – autoinhibicinio tipo (ACA) ir endoplazminio tinklo tipo (ECA) (Demidchik *et al.*, 2018). Išveiklinus šias pompas sutrinka viduląstelinė  $Ca^{2+}$  homeostazė, augalai tampa pažeidžiamesni išoriniams stresoriams (Hilleary *et al.*, 2020; Fotouhi *et al.*, 2022). ECA transporteriai taip pat atsakingi ir už kitų divalenčių jonų –  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  – pernešimą (Wu *et al.*, 2002; Mills *et al.*, 2008).

Augalų eletrogeninės pompos plačiau apžvelgtos (Fuglsang *et al.*, 2011; García Bossi *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022).

## 2.2. Augalų elektriniai signalai

Elektrinių signalų – trumpalaikių MP poliarizacijos įvykių – augaluose funkcija – pajutus vietinį poveikį, sukeltą greito temperatūros ar apšvietimo pokyčio; patyrus mechaninę ar cheminę stimuliaciją, „pranešti“ apie tai toliau nuo poveikio vietos esančioms augalo dalims ir įjungti sisteminius atsako mechanizmus (Król *et al.*, 2010; Kiszneriene *et al.*, 2022).

Augaluose aprašyti keli elektrinių signalų tipai – nežeidžiančių stimulų sukelti veikimo potencialai (VP); žeidžiančių stimulų sukelti slopstančios amplitudės variabilūs potencialai, taip pat sklindantys MP hiperpoliarizuojantys sisteminiai potencialai (Sukhov *et al.*, 2019).

### 2.2.1. Augalų veikimo potencialai

VP augaluose pasižymi visais gyvūnų veikimo potencialams būdingais požymiais: jie generuojami viršijus tam tikrą MP vertę – sužadavimo slenkstį,– pasižymi „viskas arba nieko“ generavimo principu, turi



refrakterinį periodą, geba sklisti ląstele pastoviu greičiu neprarasdami formos (Beilby, 2007).

Nusklidęs veikimo potencialas sukelia sisteminių atsaką, keisdamas augalo fiziologinę būseną – aktyvuoja ląstelinį kvėpavimą, inhibuoja fotosintetinį aktyvumą, skatina streso hormonų sintezę, veikia tam tikrų genų raišką (Pyatygin *et al.*, 2008; Sukhov *et al.*, 2019).

Istoriškai, greitas elektrinių signalų perdavimas augaluose aprašytas, pradėjus stebėti jautriuosius musėkautus (*Dionaea muscipula*), jautriąsias mimozas (*Mimosa pudica*) ir panašius augalus, kurių organų greitus judesius galima stebėti plika akimi (Burdon-Sanderson, 1873; Darwin, 1888; Bose, 1913). Siekiant nustatyti veikimo potencialų generavimo mechanizmą, pirmieji elektrofiziologiniai matavimai viduląsteliniais mikroelektrodais atlikti pasitelkiant daug patogesnę modelinę sistemą – Characeae šeimos dumbliaus (Umrath, 1930; Fromm, Lautner, 2007).

### 2.2.2. Augalų veikimo potencialų molekulinis mechanizmas

VP generavimo molekulinį principų perpratimą ilgą laiką stabdė tai, kad gerai funkciškai ištirtų rūšių genomai pradėti sekvenuoti palyginus neseniai (Beilby, 2019), o augalų, kurių genomai žinomi, elektrofiziologinių tyrimų, ypač pasitelkiant genomo redagavimo priemones, dar nėra daug (Cuin *et al.*, 2018).

Šiuo metu daugiausiai žinių sukaupta apie jautriojo musėkauto (*Dionaea muscipula*) VP generavimo molekulinį mechanizmą.

Lyginant jautriojo musėkauto jautriųjų plaukelių ir likusių augalo dalių transkriptomus, aptikta, kad tarp ryškiausių skirtumų stebima ir intensyvesnė tam tikrų jonų kanalų raiška elektriškai sužadintuose ląstelėse:

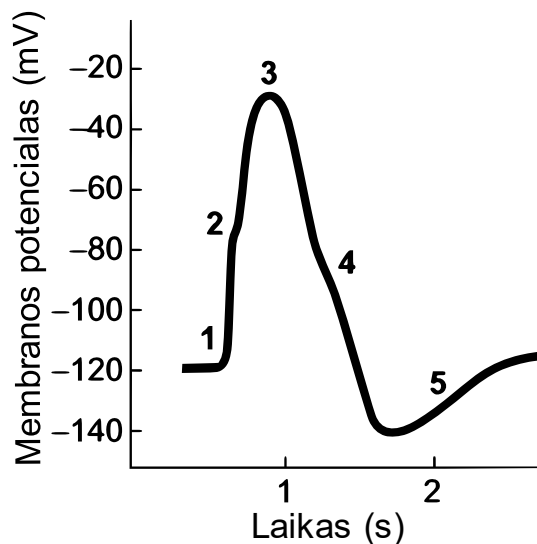
- *DmGLR3.6* – neselektyvus glutamato tipo kanalas;
- *DmOSCA1.7*, *DmOSCA1.2*, *DmOSCA4.1* – neselektyvūs membranos tempimo aktyvuojami katijonų kanalai;
- *DmMSL10* – tempimo aktyvuojamas neselektyvus anijonų kanalas;
- *KDM1* (*K<sup>+</sup> channel Dionaea muscipula 1*) –  $K_{in}$  tipo nuo įtampos priklausomas rektifikuojantis  $K^+$  kanalas, ortologas baltažiedžio vairo KAT1;
- *DmSKOR* –  $K_{out}$  tipo nuo įtampos priklausomas rektifikuojantis  $K^+$  kanalas, ortologas baltažiedžio vairo SKOR (Iosip *et al.*, 2020).

Formuojantis jautriojo musėkauto gaudyklei, jautrieji plaukeliai tampa mechaniškai sužadunami tik po tam tikros vystymosi stadijos. Lyginant genų raiškos skirtumus tarp dar nesužadintų ir sužadintų morfogenezės eigoje įgijusių plaukelių, aptikta, kad vėlesnėje stadijoje daugiau reiškiami:

- *DmGLR3.6* ir *DmGLR3.4* – neselektyvūs glutamato tipo kanalai;
- *DmALTM9* – malato transporteris, laidus anijonams;
- *DmSKOR* –  $K_{out}$  tipo kanalas;
- *DmAHA4*, *DmAHA3* ir *DmAHA5* – plazminės membranos  $H^+$ -ATPazės;
- *DmNPF6.2* – nitrato transporteris (Scherzer, Böhm, *et al.*, 2022).

Manoma, kad, suskirsčius VP į penkias fazes, šių elektrinių signalų generavimo mechanizmas jautriajame musėkaute galėtų būti toks (**2.1 pav.**):

- 1)  $Ca^{2+}$  įtekėjimas į citoplazmą iš išorės per *DmGLR3.6* kanalus.  $Ca^{2+}$  signalą sustiprina  $Ca^{2+}$  aktyvuotas  $Ca^{2+}$  išleidimas iš endoplazminio tinklo per dar nežinomus kanalus. Spėjama, kad signalo stiprinimo funkciją atlieka ir plazminės membranos *DmOSCA1.7* kanalai.
- 2) Depoliarizuojantis anijonų srautas iš ląstelės per  $Ca^{2+}$  aktyvuotus *DmALMT9/12* kanalus ir galbūt membranos tempimo aktyvuojamus *DmMSL10* kanalus.
- 3) Depoliarizacijos aktyvuojamas  $K^+$  jonų srautas iš ląstelės per *DmSKOR* kanalus.
- 4) Depoliarizacija taip pat aktyvuoja *DmAHA4*  $H^+$ -ATPazę, leidžiančią membranai toliau repoliarizuotis ir net hiperpolarizuotis.
- 5) Membranos ramybės potencialą atstato *DmHAK5* ir *DmNRT* transporteriai, atstatantys  $K^+$  ir anijonų koncentracijas (Iosip *et al.*, 2020; Hedrich, Fukushima, 2021; Scherzer, Böhm, *et al.*, 2022; Hedrich, Kreuzer, 2023). Su  $Ca^{2+}$  pašalinimu iš citoplazmos siejamos  $Ca^{2+}$ -ATPazės plazminėje membranoje *DmACA2* ir *DmACA10* bei endoplazminiame tinkle *DmECA1* (Scherzer, Huang, *et al.*, 2022).



**2.1 pav.** Jautriojo musėkauto veikimo potencialo generavimo mechanizmas. Skaičiais pažymėtos atskiros fazės paaiškintos tekste. Adaptuota pagal (Hedrich, Kreuzer, 2023).

Sutariama, kad šie bendrieji veikimo potencialų generavimo bruožai turėtų galioti daugumai aukštesniųjų augalų, tačiau konkrečių kanalų vaidmuo kitose rūšyse dažnai nėra žinomas (Novikova *et al.*, 2017). Kol kas įrodyta, kad baltažiedžio vairo *AtGLR3.1-3*, *AtGLR3.5* ir *AtGLR3.6* kanalai atsakingi už depolarizacijos fazės  $\text{Ca}^{2+}$  srautą (Mousavi *et al.*, 2013; Salvador-Recatalà, 2016). Galbūt su  $\text{Ca}^{2+}$  įtekėjimu susiję ir CNGC kanalai (Johns *et al.*, 2021). Baltažiedžio vairo MSL10 kanalų mutantai, paveikti žeidžiančio stimulo, generuoja trumpesnės trukmės variabilius potencialus, sumažėja jų generuojamų  $\text{Ca}^{2+}$  bangų amplitudės, šie signalai generuojami su didesniu užvėlinimu nuo stimulo pradžios. Šiuose augaluose taip pat stebėta sumažėjusi gynybinio hormono jazminų rūgšties produkcija. MSL10 aminorūgščių sekoje identifikuota „EF rankos“ struktūra, rodanti, kad šio kanalo aktyvumą galėtų reguliuoti  $\text{Ca}^{2+}$  jonai. Per MSL10 tekanti anijoninė srovė depolarizuoja MP, taip prisidedama prie GLR kanalų aktyvacijos ir stiprindama elektrinį signalą (Moe-Lange *et al.*, 2021).

Remiantis genų išveiklinimu paremtais tyrimais, baltažiedžio vairo *AtGORK* kanalai atsakingi už  $\text{K}^{+}$  srautą membranos repolarizacijos metu (Cuin *et al.*, 2018).

Diskutuojama dėl tonoplasto TPC/SV kanalų (Peiter *et al.*, 2005) įtakos elektrinių signalų generavimui. Esant ramybės būsenai, šie kanalai daugiausiai laidūs  $\text{K}^{+}$  jonams, tačiau tam tikromis sąlygomis gali sudaryti

sąlygas  $\text{Ca}^{2+}$  srovėms pagal koncentracijos gradientą tekėti iš vakuolės į citoplazmą. Kanalus aktyvuoja iš pažiūros nefiziologinės  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracijos citoplazminėje tonoplasto pusėje, tad tebevyksta diskusijos, ar lokaliai tokios aukštos koncentracijos gali būti pasiekiamos. Tokiu atveju TPC kanalai galėtų sustiprinti  $\text{Ca}^{2+}$  signalus, nulemtus  $\text{Ca}^{2+}$  jonų įtekėjimo į citoplazmą per kitus plazminės membranos kanalus (CICR – *Calcium-Induced Calcium Release* –  $\text{Ca}^{2+}$  indukuotas  $\text{Ca}^{2+}$  išleidimas) (Ward, Schroeder, 1994). Viena vertus, esama tyrimų, rodančių, kad, išveiklinus TPC kanalus arba padidinus jų raišką, ląstelėse  $\text{Ca}^{2+}$  bangų dinamika nepasikeičia (Ranf *et al.*, 2008). Kita vertus, tiriant tokius mutantus pastebėta, kad daugiau nei eile sumažėja  $\text{Ca}^{2+}$  bangų sklidimo greitis ilgais atstumais (Choi *et al.*, 2014; Kiep *et al.*, 2015).

Tiriant tonoplasto sužadinamumą baltažiedžio vairo vakuolėse, aptikta, kad šios membranos potencialą daugiausia depoliarizuoja  $\text{K}^+$  srovė, tekanti per TPC kanalus. Charakteringą formą vakuolės veikimo potencialams taip pat suteikia trumpalaikės  $\text{K}^+$  srovės per TPK1 ir TPK3 kanalus. Matematinis modeliavimas parodė, kad repoliarizacija vyksta dėl  $\text{H}^+$ -ATPazių aktyvumo. Spėjama, kad vakuolių veikimo potencialai galėtų atlikti plazminės membranos veikimo potencialų stiprinimo funkciją (Jašlan *et al.*, 2019).

### 2.3. Characeae šeimos menturdumbliai

Evoliuciškai senos Characeae šeimos dumbliai – vieni iš filogenetiškai artimiausių aukštesniesiems augalams (Karol *et al.*, 2001). Šie įvairaus druskingumo vandeninėje aplinkoje gyvenantys menturdumbliai pasižymi savita morfologija: jų talomas sudarytas iš ilgų (iki 30 cm ilgio) tarpubamblinių ląstelių, atskirtų bambliais. Substrate menturdumbliai įsitvirtina į tarpubamblines ląsteles panašiais, tik plastidžių neturinčiais rizoidais (Shimmen *et al.*, 1994; Beilby, Casanova, 2014; Larkin *et al.*, 2018).

Iš talomo iškirpta nepažeista pavienė tarpubamblinė ląstelė gali egzistuoti kaip atskiras organizmas, patogi modelinė sistema biofizikos, mechanobiologijos, ekologijos, ląstelės biologijos ir kituose tyrimuose (Bulychev, Kamzolnikina, 2006; Shimmen, 2007; Foissner, Wasteneys, 2014; Larkin *et al.*, 2018).

Menturdumblių ląstelės, kartais vadinamos žaliaisiais aksonais (Andjus, 1998), plačiausiai taikomos augalų elektrofiziologijos tyrimuose (Beilby, Casanova, 2014). Dėl savo matmenų tokios ląstelės tinkamos registruoti elektrinius signalus viduląsteliniiais elektrodais, taikant tiek

fiksuotos srovės, tik ir fiksuotos įtampos metodus (Lunevsky *et al.*, 1983). Pritaikius citoplazminių lašų metodiką, patogų tirti tonoplasto jonų kanalų aktyvumą (Lühring, 1986).

#### 2.4. Characeae šeimos dumblių jonų pernašos sistemos

Nusekvenavus Characeae šeimos atstovo *Chara braunii* genomą (Nishiyama *et al.*, 2018), paaiškėjo, kokių membranos pernašos sistemų esama šiuose menturdumbliuose. Taip pat atlikta transkriptomo tyrimų (Pertl-Obermeyer *et al.*, 2018; Phipps, Goodman, *et al.*, 2021; Phipps, Delwiche, *et al.*, 2021; Heß, Heise, *et al.*, 2023; Heß, Holzhausen, *et al.*, 2023).

##### 2.4.1. Characeae šeimos dumblių K<sup>+</sup> kanalai ir transporteriai

Remiantis nusekvenuoto *Chara braunii* genomo ir *Chara australis* transkriptomo duomenimis, menturdumbliuose K<sup>+</sup> kanalų įvairovė ne tokia didelė, kaip aukštesniuosisuo augaluose (Pertl-Obermeyer *et al.*, 2018; Phipps, Goodman, *et al.*, 2021; Phipps, Delwiche, *et al.*, 2021; Heß, Heise, *et al.*, 2023; Heß, Holzhausen, *et al.*, 2023).

*Chara braunii* KT5 kanalas giminiškiausias baltažiedžio vairočio kanalui AKT5 (Nishiyama *et al.*, 2018). Žinoma, kad šis kanalas yra K<sub>in</sub> srovės praleidžiantis, tačiau funkciškai necharakterizuotas (Pantoja, 2021).

*Chara braunii* turi vieną GORK/SKOR šeimai priskiriamą kanalą KOR, potencialiai veikiančią kaip K<sub>out</sub> kanalas (Nishiyama *et al.*, 2018).

Characeae šeimos dumbliuose aptinkama ir nuo įtampos nepriklausomų TPK šeimos kanalų. Tikėtina, kad *Chara braunii* kanalas SLO1 (*slowpoke* 1 – drozofilų *slowpoke* mutacijos K<sup>+</sup> kanalas 1) veikia plazminėje membranoje, nes yra giminingiausias baltažiedžio vairočio TPK4 kanalams. Tikėta, kad tonoplaste lokalizuoti kiti šios šeimos K<sup>+</sup> kanalai – *Chara braunii* TPK1 giminingiausias baltažiedžio vairočio TPK5, o *Chara australis* TPK5 – *AtTPK3* (Nishiyama *et al.*, 2018; Pertl-Obermeyer *et al.*, 2018).

*Chara corallina* turi 3 HKT1 (*High-affinity K<sup>+</sup> Transporter 1* – didelio giminingumo K<sup>+</sup> transporteris 1) šeimos transporterius. HKT1 gali veikti kaip selektyvūs Na<sup>+</sup> transporteriai, arba Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> simporteriai, kurių funkcija – apsaugoti ląsteles nuo per didelės Na<sup>+</sup> koncentracijos (Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> santykio) padidėjusio aplinkos druskingumo streso metu (Ali *et al.*, 2019). *Chara australis* turi 1 šio transporterio kopiją, *Chara longifolia* – 5 (Phipps, Goodman, *et al.*, 2021).

*Chara braunii* aptikta CHX17, CHX18, CHX19 ir CHX20 katijonų-protonų antiporterių (*Cation / H<sup>+</sup> Exchanger*) kopijų (Nishiyama *et al.*, 2018). *Chara australis* – CHX17 ir CHX19 (Pertl-Obermeyer *et al.*, 2018). CHX17, CHX18 ir CHX19 aptinkami plazminėje membranoje ir endosomose (Chanroj *et al.*, 2013), CHX20 – endomembranose (Padmanaban *et al.*, 2007).

CPA (*Cation Proton Antiporter* – katijonų-protonų antiporterių) superšeimai priklauso *Chara braunii* NHX2 ir NHX6 genai, kurių produktai augaluose reiškiami atitinkamai tonoplate ir endosomose (Nishiyama *et al.*, 2018). 2 NHX transporterius, giminingus NHX2 ir NHX6, turi *Chara australis*; druskingesnė aplinkose galinti išgyventi *Chara longifolia* turi vieną NHX6 giminingą kopiją, spėjama, reiskiamą plazminėje membranoje (Pertl-Obermeyer *et al.*, 2018; Phipps, Goodman, *et al.*, 2021). Ši transporterių šeima atsakinga už Na<sup>+</sup> arba K<sup>+</sup> perkėlimą iš citoplazmos, naudojant protonų gradientą (Bassil *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2018).

#### 2.4.2. Characeae šeimos dumblių anijonų kanalai

*Chara braunii* genomo tyrimas atskleidė, kad anijonų kanalų tipų menturdumbliuose taip pat nėra gausu (Nishiyama *et al.*, 2018).

Characeae šeimos dumbliuose neaptikta SLAC / SLAH anijonų kanalų, kurie plačiai paplitę kitose augalų rūšyse (Nishiyama *et al.*, 2018).

Daugiausia anijonų tikriausiai transportuojama per vieną kopiją malato transporterio, giminingiausio baltažiedžio vairo kanalui ALMT13. Šie kanalai ekspresuojami žiotelių varstomųjų ląstelių plazminėje membranoje, tačiau nėra atsakingi už R-tipo anijonų sroves sužadavimo metu. Sprendžiant pagal ALMT13 kanalo aminorūgščių seką, šiame baltyme yra „EF rankų“ tipo motyvas, prie kurio galėtų jungtis Ca<sup>2+</sup> jonai, moduliudami kanalo aktyvumą (Jašlan, 2019; Jašlan *et al.*, 2023).

CLC transporteriai CLCc, CLCd, CLCe ir CLCf atitinka homologus baltažiedžiame vairyneje, yra išsidėję viduląstelinėse membranose. *Chara australis* traskriptomas tai patvirtina: reiskiami CLCd arba CLCc ir CLCe arba CLCf baltymai (Pertl-Obermeyer *et al.*, 2018).

MSL10 neselektivūs membranos įtempimo aktyvuojami kanalai praleidžia anijonines sroves, yra siejami su elektrinių signalų generavimu (Hedrich, 2012; Moe-Lange *et al.*, 2021).

Baltažiedžiame vairyneje neaptikti ANO1 baltymai gyvūnuose atitinka Ca<sup>2+</sup> aktyvuojamus Cl<sup>-</sup> kanalus, kai kurie šio anoktaminų šeimos nariai veikia kaip lipidų skramblazės (Tian *et al.*, 2012).

### 2.4.3. Characeae šeimos dumblių $\text{Ca}^{2+}$ laidūs kanalai

Kaip ir aukštesniuose augaluose, menturdumbliuose  $\text{Ca}^{2+}$  kanalai atsakingi už tokias svarbias funkcijas kaip  $\text{Ca}^{2+}$  bangų kūrimas ir elektrinių signalų iniciavimas (Williamson, Ashley, 1982), tačiau, nepaisant to, šiuos kanalus koduojantys genai dar nėra nustatyti, nors galimų kandidatų yra nemažai (Nishiyama *et al.*, 2018).

Characeae šeima skiriasi iš kitų augalų grupių, nes juose nerasta GLR kanalų genų (Nishiyama *et al.*, 2018).

*Chara braunii* genomus koduoja CNGC1, CNGC2 (atitinka *AtCNGC1*) (abu priklauso CNGC I grupei), CNGC5a, CNGC5b (atitinka *AtCNGC7*), CNGC6, CNGC8 (II grupė) ir CNGC15 (III grupė) kanalus, visų šių kanalų elektrofiziologinės charakteristikos ir funkcijos nėra gerai ištytos dėl funkcinio persidengimo. *AtCNGC1* ir homologas tabake *NtCBP4* (*Calmodulin binding protein 4* – kalmoduliną prisijungiantis baltymas 4), randami plazminėje membranoje ir yra susiję su  $\text{Pb}^{2+}$  ir kitų sunkiųjų metalų kaupimusi augale (Arazi *et al.*, 1999). CNGC5 ir CNGC6 žiotelių varstomosiose ląstelėse atsakingi už divalenčių katijonų sroves per plazminę membraną, taip pat laidūs  $\text{Na}^+$  (Wang *et al.*, 2013). Šakniaplaukiuose abu šie kanalai taip pat atsakingi už  $\text{Ca}^{2+}$  įtekėjimą į ląstelę reguliuojant tįsimą. Manoma, kad CNGC5, CNGC6, CNGC9 ir CNGC12 gali vienas kitą pavaduoti augalų hormono abscizinės rūgšties valdomame žiotelių užsivėrimo signaliniame kelyje (Tan *et al.*, 2023). CNGC15 plazminėje membranoje sudaro kompleksus su nitrato transporteriu NTR1.1, kuris moduliuoja nitrato sukeltas  $\text{Ca}^{2+}$  bangas (Wang *et al.*, 2021).

Taip pat žinoma *Chara braunii* genome esant 5 osmolingumo pokyčių aktyvuojamų OSCA kanalų kopijų, atitinkančių *AtOSCA1.3*, *AtOSCA2.3* ir *AtOSCA3.1* (Nishiyama *et al.*, 2018).

*Chara braunii* turi dvi ORAI kanalų kopijas (Nishiyama *et al.*, 2018). Gyvūnuose ORAI baltymai formuoja CRAC (*Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup>* –  $\text{Ca}^{2+}$  aktyvuojamus  $\text{Ca}^{2+}$ ) kanalus, selektyviai laidžius  $\text{Ca}^{2+}$ . Šie kanalai aktyvuojami specialių STIM (*stromal interaction molecules* – sąveikos stromoje molekulės) molekulių, veikiančių kaip  $\text{Ca}^{2+}$  sensoriai endoplazminiame tinkle. ORAI baltymus koduojančių genų aptikta daugelio augalų (bet ne magnolijūnų) genomuose. Vis dėlto, nė vienoje iš tirtų rūšių neaptikta STIM molekulių. Lieka neaišku, ar ORAI baltymai formuoja kanalus, o net jei ir taip, ar šie kanalai funkciškai aktyvūs, kokie jų aktyvavimo mechanizmai ir funkcijos. Spėjama, kad juos galėtų aktyvuoti biotiniai veiksniai arba endogeninės aktyvios deguonies formos, kas rodytų

sąsają su gyvūniniais CRAC kanalais, svarbiais formuojant imuninį atsaką (Edel *et al.*, 2017).

*Chara brauni* turi vieną PIEZO kanalo kopiją (Nishiyama *et al.*, 2018). *Physcomitrella patens* mutantų be mechaniniam poveikiui jautrių PIEZO kanalų fenotipai auga lėčiau, keičiasi  $Ca^{2+}$  bangų dinamika. Priešingai, nei gyvūnuose, PIEZO kanalai aptikti tonoplaste, jų orientacija įgalina išleisti  $Ca^{2+}$  iš vakuolės į citoplazmą. Kanalų veikla siejama su turgoro jutimu, vakuolės morfologijos palaikymu (Radin *et al.*, 2021).

*Chara braunii* genome aptiktas TPC genas (Nishiyama *et al.*, 2018; Dreyer *et al.*, 2021), *Chara australis* jis yra ekspresuojamas (Pertl-Obermeyer *et al.*, 2018), tačiau tos pačios šeimos atstovo *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinių ląstelių tonoplastuose SV tipo srovių neaptikta (Koselski *et al.*, 2021), tad nėra aišku, ar šioje rūšyje kanalai reiškiami, o jei taip, ar jie yra funkciškai aktyvūs.

#### 2.4.4. Characeae šeimos dumblių elektrogeniniai transporteriai

*Chara braunii* genome esama trijų  $H^+$ -ATPazių AHA kopijų, homologiškų baltažiedžio vairo AHA2, AHA4 ir AHA9 (Nishiyama *et al.*, 2018). Spėjama, kad *Chara braunii* AHA2 šis genas gali būti nefunkcionalus, nes neturi specifinės konservatyvios aminorūgščių sekos, būtinos visoms P-tipo ATPazėms (Phipps, Goodman, *et al.*, 2021). *Chara australis* ekspresuojamos dvi AHA izoformos, homologiškos *AtAHA2* ir *AtAHA11* (Pertl-Obermeyer *et al.*, 2018), *Chara longifolia* – viena izoforma (Phipps, Goodman, *et al.*, 2021). Iš *Chara australis* išskirta  $H^+$ -ATPazė CHA1 (*Chara H<sup>+</sup>-ATPase 1*), kurios aminorūgščių seka artima *Chara braunii* AHA4 ir AHA2 (Zhang *et al.*, 2020).

*Chara australis* transkriptome aptikta vakuolinės  $H^+$ -ATPazės VHA (Sze *et al.*, 2002) subvienetų genų (Pertl-Obermeyer *et al.*, 2018).

Druskingoje aplinkoje auganti *Chara longifolia* turi 4  $Na^+$ -ATPazės ENA formas, nerandamas induočiuose augaluose (Phipps, Goodman, *et al.*, 2021), kurių raiška išauga kartais, sukėlus druskingumo stresą (Phipps, Delwiche, *et al.*, 2021).

*Chara braunii* genome esama ACA ir ECA tipų  $Ca^{2+}$ -ATPazių genų (Nishiyama *et al.*, 2018). Remiantis žiniomis apie analogiškus transporterius baltažiedžiame vairyje, ACA9 turėtų būti reiškiami plazminėje membranoje, ACA4 ir ACA11 – tonoplaste (Schjøtt *et al.*, 2004; Hilleary *et al.*, 2020). *Chara longifolia* turi dvi ACA izoformas, *Chara australis* – tris (Phipps, Goodman, *et al.*, 2021). ECA tipo pompos turėtų būti lokalizuotos



endoplazminiame tinkle, Goldžio komplekse (Wu *et al.*, 2002; Mills *et al.*, 2008; García Bossi *et al.*, 2020).

*Chara braunii* taip pat turi aukštesniuosiuose augaluose nepatinkamos  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ATPazės geno kopiją (Nishiyama *et al.*, 2018).

## 2.5. Characeae šeimos dumblių veikimo potencialai

Veikimo potencialai Characeae šeimos dumbliuose viduląstelinias elektrodais pirmąkart užregistruoti beveik prieš šimtmetį (Umrath, 1930).

VP generavimo mechanizmas iš esmės yra suprastas, nors molekuliniai komponentai dar nėra išaiškinti (Beilby, 2019). Šiomis žiniomis remtasi analizuojant ir aukštesniųjų augalų VP (Jašlan *et al.*, 2019). Visuotinai priimta, kad pirminė plazminės membranos depoliarizacija prasideda dėl  $\text{Ca}^{2+}$  jonų įtekėjimo į citoplazmą. Diskutuojama, kas galėtų būti  $\text{Ca}^{2+}$  jonų šaltinis – ląstelės išorė (Lunevsky *et al.*, 1983; Berestovsky, Kataev, 2005) ar vidinės saugyklos (Lunevsky *et al.*, 1983; Kikuyama *et al.*, 1993).  $\text{Ca}^{2+}$  jonai aktyvuoja  $\text{Cl}^-$  kanalus – šios dvi įtekančios srovės membraną depoliarizuoja. Repoliarizaciją užtikrina nuo įtampos priklausomų  $\text{K}^+$  kanalų bei  $\text{H}^+$ -ATPazių aktyvavimasis (Thiel *et al.*, 1997; Kisnierienė *et al.*, 2012), svarbios ir  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazės (Kisnieriene *et al.*, 2019).

„Patch clamp“ metodu *Chara corallina* plazminėje membranoje aptikta  $\text{K}^+$  ir  $\text{Cl}^-$  kanalų, tačiau, nėra aišku, ar jie atsakingi už VP generavimą (Okihara *et al.*, 1991; Homann, Thiel, 1994).

Vakuolės membrana – tonoplastas – taip pat sužadinama (Kikuyama, 1986). Manoma, kad tonoplasto VP mechanizmas yra analogiškas procesams, vykstantiems plazminėje membranoje – membraną depoliarizuoja  $\text{Ca}^{2+}$  ir  $\text{Cl}^-$  srovės, o repoliarizuoja  $\text{K}^+$  kanalų ir  $\text{H}^+$ -ATPazių aktyvumas (Lunevsky *et al.*, 1983). „Patch clamp“ metodu vakuolės membranoje aptikta įvairaus laidumo  $\text{K}^+$  ir  $\text{Cl}^-$  kanalų, tačiau jų molekulinė tapatybė nežinoma (Lühring, 1986; Tyerman, Findlay, 1989; Laver, Walker, 1991).

### 2.5.1. Thielio-Beilby modelis

Thielio-Beilby matematinis modelis aprašo VP generavimą Characeae šeimos dumbliuose, laike simuliudamas MP kitimą, nulemtą tam tikrų joninių srovių tekėjimo (Biskup *et al.*, 1999; Wacke, Thiel, 2001; Wacke *et al.*, 2003; Beilby, Al Khazaaly, 2016, 2017; Kisnieriene *et al.*, 2019).

Modelio pagrindas pasiskolintas iš gyvūninio  $\text{Ca}^{2+}$  bangų gyvūnų sužadinamose ląstelėse matematinio modelio (Othmer, 1997). Pagal ši

modelį,  $\text{Ca}^{2+}$  bangų dinamiką gali paaiškinti bent 4 būsenų  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų endoplazminiame tinkle aktyvumas. Nurodomos tokios kanalų būsenos:

- R – būseną, kai prie kanalo neprisijungusi jokia molekulė, kanalas neaktyvus;
- IR – būseną, kai prie kanalo prisijungusi inozitolio trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ) molekulė, kanalas neaktyvus;
- $\text{IRC}_+$  – būseną, kai prie kanalo prisijungusi ir  $\text{IP}_3$  molekulė, ir  $\text{Ca}^{2+}$  jonas, kanalas aktyvus;
- $\text{IRC}_+\text{C}_-$  – būseną, kai prie kanalo prisijungusi  $\text{IP}_3$  molekulė ir du  $\text{Ca}^{2+}$  jonai, kanalas neaktyvus.

Ląstelės membrana sužadinama staigiai padidinant citoplazmoje  $\text{IP}_3$  koncentraciją, kuri gęsta eksperimentiškai nustatyta laiko konstanta  $\tau \approx 5 \text{ s}^{-1}$  (Wacke, Thiel, 2001). Nustatyta, kad  $\text{IP}_3$  (ar panašaus metabolizmo molekulė) kaip antrinė signalinė molekulė yra integrali modelio dalis. Antrinės signalinės molekulės koncentracija į MP pokyčius nėra perkoduojama tiesiškai, iš čia kyla modelio privalumas paaiškinti VP sužadinimo slenksčio egzistavimą. Modelio kinetinių parametrų sąveika lemia, kad, tik pasiekus tam tikrą  $\text{IP}_3$  koncentraciją, MP pradeda depoliarizuotis griūtiškai (Wacke *et al.*, 2003).

Modelio pagrindą sudaro penkios diferencialinės lygtys – keturios iš jų apibūdina, kaip keičiasi kanalų, esančių kiekvienoje iš aukščiau minėtų keturių būsenų, populiacijos. Penktoji diferencialinė lygtis aprašo  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracijos kitimą citoplazmoje. Kinetinės konstantos ir kiti parametrai paimti iš originalaus modelio, aprašančio  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracijos citoplazmoje kitimus gyvūnuose (Othmer, 1997), nustatyti eksperimentiškai, arba pritaikyti siekiant kuo geriau atkartoti eksperimentinius duomenis.

Membranos potencialo  $V$  kitimai apibūdinami lygtimi  $\frac{dV}{dt} = -\frac{1}{C_m} \sum I_n$ , kur  $C_m$  yra nekintanti membranos talpa, o  $I_n$  – membranos sužadinimo metu per ją tekančios srovės:

- $\text{Cl}^-$  srovė, aktyvuojama  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracijos citoplazmoje padidėjimo;
- protonų pompos srovė;
- neselektyvi nuotėkio srovė;
- $K_{\text{out}}$  srovė.

Į modelį taip pat įtrauktas trumpalaikis stačiakampis  $\text{Ca}^{2+}$  srovės per plazminę membraną impulsas, papildomai aktyvuojantis  $\text{Ca}^{2+}$  kanalus endoplazminiame tinkle (Beilby, Al Khazaaly, 2016, 2017).

Modelis geba aprašyti ne tik MP kitimą veikimo potencialo metu kontrolinėmis sąlygomis, bet ir padidėjusio osmolingumo ir / ar druskingumo sąlygomis (Beilby, Al Khazaaly, 2016, 2017; Kisnieriene *et al.*, 2019). Veikimo potencialo formą apibrėžus tam tikromis modelio parametru vertėmis, galima gauti žinių apie atskirų jonų pernašos sistemų savybes, kinetinius parametrus. Pavyzdžiui, nustatyta, kad *Chara corallina*  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazių kinetinis ciklas greitesnis nei homologiškų *Nitellopsis obtusa* pompų (Kisnieriene *et al.*, 2019).

## 2.6. Potencialus Characeae šeimos dumblių veikimo potencialų molekulinis mechanizmas

Pagrindinės Characeae šeimos dumblių VP joninės komponentės nustatytos ir pagrįstos (Lunevsky *et al.*, 1983; Shiina, Tazawa, 1988; Kisnieriene *et al.*, 2019), tačiau kokios šių jonų pernašos sistemų molekulinės tapatybės, dar nėra žinoma (Beilby, 2019). Nors augalų genomai pradėti sekvenuoti jau prieš kelis dešimtmečius (Kaul *et al.*, 2000), tik palyginus neseniai žinios apie elektrinių signalų generavime dalyvaujančių atskirų jonų pernašos sistemų genus pradėtos integruoti (Hedrich, Fukushima, 2021; Scherzer, Böhm, *et al.*, 2022; Hedrich, Kreuzer, 2023).

Remiantis funkciniais Characeae šeimos dumblių elektrinio sužadavimo duomenimis bei atsižvelgiant į šių dumblių evoliucinius ryšius su aukštesniaisiais augalais, galima mėginti atsekti už Characeae šeimos dumblių elektrinį sužadinamumą atsakingų jonų pernašos sistemų molekulinę tapatybę. Vis dėlto, dera nepamiršti, kad kanalų ir transporterių genų priskyrimas signalinei funkcijai yra spekuliatyvus, nes nežinoma jų lokalizacija Characeae šeimos dumbliuose, nei ląstelės, nei organizmo lygmeniu. Nors šie dumbliai neturi diferencijuotų audinių, skirtingų ląstelių tipų (tarpubamblinės, bamblių, lytinės ląstelės, rizoidai) morfologija ir funkcijos ženkliai skiriasi. Dėl to galima spėti, kad skiriasi ne tik atskirų membraninių pernašos sistemų raiškos intensyvumo ypatumai, bet ir tai, ar tam tikrose ląstelėse tam tikri genai reiškiami iš viso.

### 2.6.1. Characeae šeimos dumblių $\text{K}^+$ kanalų molekulinė tapatybė

Augalai turi daug tipų  $\text{K}^+$  kanalų, atliekančių įvairias funkcijas, ne tik atsakingų už membranos repoliarizaciją sužadavimo metu (Dreyer, Uozumi, 2011; Pantoja, 2021).

Aukštesniuose augaluose už  $\text{K}^+$  srovės elektrinių signalų generavimo metu greičiausiai atsakingi depoliarizacijos aktyvuojami GORK / SKOR kanalai (Cuin *et al.*, 2018; Iosip *et al.*, 2020). *Chara braunii* genome taip pat aptiktas vienas šiems genams homologiškas *KOR* genas (Nishiyama

*et al.*, 2018), tad tikėtina, kad per šį kanalą ir teka  $K^+$  srovės, repoliarizuojančios MP sužadavimo metu.

Sunkiau atsekti Characeae šeimos tonoplasto  $K^+$  kanalų tapatybę. Aukštesniuosiuose augaluose vakuolės membranoje stebimas katijonams laidžių TPC/SV, FV ir TPK/VK kanalų aktyvumas (Isayenkov *et al.*, 2010), už elektrinį sužadimą atsakingi daugiausiai TPC ir TPK kanalai (Jašlan *et al.*, 2019). Vis dėlto, *Nitellopsis obtusa* tonoplaste stebimų apie ~70 pS laidumo  $K^+$  kanalų charakteristikos neprimena nei TPC, nei FV kanalų savybių (Gobert *et al.*, 2007; Hedrich, Marten, 2011). Kaip minėta aukščiau, neselektyvūs TPC kanalai pasižymi rektifikacija, FV, kurie taip pat yra rektifikuojantys, taip pat yra blokuojami  $Ca^{2+}$  (Pottosin, Dobrovinskaya, 2014). TPK / VK kanalai yra selektyvūs  $K^+$ , o  $Cs^+$  nepraleidžia (Gobert *et al.*, 2007). Preliminarūs dar nepublikuoti duomenys rodo, kad *Nitellopsis obtusa* tonoplasto  $K^+$  kanalai laidūs ir  $Na^+$ , o  $Cs^+$  juos blokuoja. Tikėtina, kad šiuos kanalus ir atitiks *Chara braunii* TPK1 genas, kitu atveju Characeae šeimos dumblių tonoplasto kanalų spektras ženkliai skiriasi nuo aukštesniųjų augalų.

Apibendrinant, sužadavimo metu per Characeae šeimos dumblių plazminę membraną  $K^+$  srovėms leidžia tekėti, tikėtina, KOR kanalai, per tonoplastą – TPK kanalai.

#### 2.6.2. Characeae šeimos dumblių $Cl^-$ kanalų molekulinė tapatybė

Pagrindinė augalų elektrinio sužadavimo metu per membraną tekančios srovės komponentė – įtekantis  $Cl^-$  jonų srautas (Beilby, Coster, 1979; Lunevsky *et al.*, 1983). Aukštesniuosiuose augaluose šį srautą gali praleisti mechaninio įtempimo aktyvuojami neselektyvūs ir nuo įtampos nepriklausomi anijonams laidūs MSL10 kanalai (Maksaev, Haswell, 2012). Žinant, kad ir neselektyvūs katijonų kanalai OSCA yra aktyvuojami membranos įtempimo, galima spėti, kad mechaninis poveikis sukelia tiek MSL10, tiek ir OSCA kanalų aktyvaciją, kurios užtektų sugeneruoti elektrinį signalą. MSL10 funkcija siejama su variabilių potencialų – elektrinių signalų, sukeltų žeidžiančių stimulų – generavimu (Moe-Lange *et al.*, 2021). Taip pat žinoma, kad augalų pažeidus, gali būti sugeneruojamas ne tik variabilus potencialas, bet ir kartu ksilema sklindanti hidraulinė banga, lemianti lokalius turgoro pokyčius (Vodeneev *et al.*, 2016). Keičiantis ląstelių turgorui, keičiasi ir membranos įtempimas, o tai gali aktyvuoti MSL10 (bei OSCA) kanalus ir taip sudaryti sąlygas elektriniam signalui sklirti augalu. *Chara braunii* genome taip pat aptiktas MSL10 genas (Nishiyama *et al.*, 2018), taigi galima spėti, kad ir Characeae šeimos dumblis stimuliuojant mechaniškai, šie kanalai taip pat aktyvuojasi.

Anksčiau aukštensiuosiuose augaluose sužadavimo metu tekančios anijonų srovės sietos su SLAC / SLAH kanalais (Hedrich, 2012), bet pastarųjų metų tyrimuose jiems priskiriama osmoreguliacijos funkcija (Hedrich, Kreuzer, 2023), o veikimo potencialo metu, manoma, aktyvuojami nuo  $\text{Ca}^{2+}$  priklausomi ALMT9/12 kanalai (Scherzer, Böhm, *et al.*, 2022). *Chara braunii* genome nerasta SLAC / SLAH kanalų genų, bet aptikta viena ALMT kanalo geno kopija (Nishiyama *et al.*, 2018). Tikėtina, kad ALMT kanalai ir yra atsakingi už didžiąją dalį depoliarizuojančios  $\text{Cl}^-$  srovės sužadavimo metu.

Remiantis Thielio-Beilby modeliu, elektrinio sužadavimo metu Characeae šeimos dumblių  $\text{Cl}^-$  kanalų aktyvumas nebūtinai turi priklausyti nuo įtampos, užtenka, kad šiuos kanalus aktyvuotų besikeičianti  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracija (Biskup *et al.*, 1999; Beilby, Al Khazaaly, 2016, 2017; Kisnieriene *et al.*, 2019). MSL10 aktyvumas nepriklauso nuo įtampos, ALMT – priklausoma, tačiau svarbiausia, kad abiejų tipų kanalų struktūrose galima aptikti „EF rankų“ motyvą, prie kurio gali prisijungti  $\text{Ca}^{2+}$  ir taip valdyti kanalų aktyvumą (Jašlan, 2019; Moe-Lange *et al.*, 2021; Jašlan *et al.*, 2023).

Kokie kanalai atsakingi už  $\text{Cl}^-$  srautus tonoplaste nėra žinoma. „Patch clamp“ metodu užregistruotų  $\text{Cl}^-$  kanalų laidumas siekė iki 50 pS (Tyerman, Findlay, 1989; Katsuhara *et al.*, 1991; Berecki *et al.*, 1999). Galbūt šiuos kanalus galima sieti su CLC kanalais, nes kai kurie iš jų, pavyzdžiui, CLCc, randami tonoplaste (Nedelyaeva *et al.*, 2020).

Apibendrinant, už  $\text{Cl}^-$  srovės elektrinio Characeae šeimos dumblių sužadavimo metu tikriausiai atsakingi ALMT kanalai, galbūt tam tikrą vaidmenį atlieka ir mechaniniam poveikiui jautrūs MSL10 kanalai.

### 2.6.3. Characeae šeimos dumblių $\text{Ca}^{2+}$ kanalų molekulinė tapatybė

Pradinė augalų membranos depoliarizacija sužadavimo metu sukeliama įtekančios  $\text{Ca}^{2+}$  jonų srovės. Vis dar neatsakyta į klausimą, kas yra pagrindinis  $\text{Ca}^{2+}$  šaltinis – ląstelės išorė, įskaitant dažnai kalcifikuotą sienelę (Schöler *et al.*, 2014), ar vidinės saugyklos; svarių argumentų turi abu pasiūlymai (Lunevsky *et al.*, 1983; Kikuyama *et al.*, 1993; Plieth *et al.*, 1998; Berestovsky, Kataev, 2005). Matematinis Thielio-Beilby modelis, aprašantis MP kitimą laike, generuojant veikimo potencialus, teigia, kad abi teorijas galima suderinti – empirinius duomenis geriausiai atitinka simuliacijos, kai  $\text{Ca}^{2+}$  jonai į citoplazmą įteka tiek iš endoplazminio tinklo, tiek ir iš ląstelės išorės – tik tokiu būdu pavyksta užtikrinti realybėje stebimos MP depoliarizacijos staigumą (Beilby, Al Khazaaly, 2016, 2017; Kisnieriene *et al.*, 2019). Taigi, galima tikėtis atskirų  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų populiacijų

plazminėje membranoje bei vidinių saugyklų – endoplazminio tinklo ir / ar vakuolės membranose.

Aukštesniuosiuose augaluose pradinę depoliarizaciją daugiausiai sukelia  $Ca^{2+}$  jonų srovės per neselektyvius aminorūgščių aktyvuojamus plazminės membranos GLR kanalus (Mousavi *et al.*, 2013; Salvador-Recatalà, 2016; Scherzer, Böhm, *et al.*, 2022). Stebėtina, bet *Chara braunii* genome nerasta GLR kanalų genų (Nishiyama *et al.*, 2018), o šios šeimos atstovų transkriptomų tyrimai ši faktą patvirtina (Pertl-Obermeyer *et al.*, 2018; Heß, Heise, *et al.*, 2023; Heß, Holzhausen, *et al.*, 2023). Vis dėlto, Characeae šeimos dumblių elektriniai signalai yra moduluojami aminorūgščių: asparaginas ir glutamatas, taip pat sintetinis gyvūnų jonotropinių glutamato receptorių (iGluR) agonistas NMDA hiperpoliarizuoja *Nitellopsis obtusa* VP sužadavimo slenkstį, ilgina VP trukmę (Lapeikaitė *et al.*, 2019, 2020). Šiuos iš pažiūros nesuderinamus faktus galima paaiškinti keliais būdais. Viena vertus, *Chara braunii* genome GLR genų ieškota remiantis homologija aukštesniųjų augalų GLR genams, tačiau yra tikimybė, kad, net jei Characeae šeimos dumbliai turi aukštesniųjų augalų GLR genams evoliuciškai giminingų genų, jų homologija yra per menka. Kita vertus, Characeae šeimos aminorūgštims jautrūs kanalai gali būti negiminingi GLR kanalams, tačiau evoliucijos eigoje įvyko konvergencija.

Nors aukštesnieji augalai neturi genų, koduojančių Cys-loop (cisteino kilpos) šeimos receptorių, *Chara braunii* genome yra *LIC1* ir *LIC2* (*Ligand-gated Ion Channel* – ligandų valdomi jonų kanalai) genai, aptikti pagal homologiją *Chlorella vulgaris* genams (Nishiyama *et al.*, 2018). Gyvūnuose šią šeimą sudaro nikotininiai acililcholino receptoriai (nAChR), serotonino trečiojo tipo receptoriai (5-HT<sub>3</sub>R), cinko aktyvuojami kanalai (ZAC) (visi trys tipai laidūs katijonams), A tipo  $\gamma$ -aminosviesto rūgšties receptoriai (GABA<sub>A</sub>R) ir glicino receptoriai (GlyR) (abu tipai laidūs anijonams) (Mukherjee, 2015). Be to, kad žinomas aminorūgščių sukeltas *Nitellopsis obtusa* elektrinių signalų parametų moduliavimas, žinoma, kad Characeae šeimos dumblių jonų kanalai gali būti jautrūs ir acetilcholinui (Gong, Bisson, 2002; Kisnierienė *et al.*, 2012), tad *Chara braunii* *LIC1* ir *LIC2* kanalų charakterizavimas būtinas siekiant nustatyti molekulinį elektrinių signalų generavimo mechanizmą.

Žinoma, kad kerpsamanės *Marchantia polymorpha* elektrinių signalų sklidimui būtini GLR kanalai, tačiau net ir išveiklinus vienintelį turėtą *MpGLR* geną, lokalis  $Ca^{2+}$  bangos buvo stebėtos, vadinasi, kerpsamanėse  $Ca^{2+}$  srautai gali tekėti ir per kitus kanalus (Watanabe *et al.*, 2024). Aukštesniuosiuose augaluose taip pat spėjama esant kitų  $Ca^{2+}$  laidžių kanalų, prisidedančių prie elektrinių signalų generavimo.

Tvirtą pagrindą turi prielaida apie mechaniniam poveikiui jautrių neselektyvių katijonų kanalų vaidmenį elektrinių signalų generavime: jonų kanalų atsiradimas siejamas su tikslu aptikti membranos įtempimo pokyčius praleidžiant katijonus į citoplazmą ir aktyvinant membranos reparacijos mechanizmus dar prieš mechaniniam poveikiui pažeidžiant ląstelės membraną (Brunet, Arendt, 2016). Aukštesniuosiuose augaluose tokie su elektrinių signalų generavimu susiję galėtų būti OSCA kanalai (Iosip *et al.*, 2020), kurių genai aptinkami ir *Chara braunii* genome (Nishiyama *et al.*, 2018).

Characeae šeimos dumbliuose ir aukštesniuosiuose augaluose per plazminės membranos, ir / arba per vidinių saugyklų membranas  $Ca^{2+}$  sroves taip pat galėtų praleisti CNGC kanalai, tačiau, nepaisant jų genų gausos, šių kanalų vaidmuo, ypač analizuojant elektrinių signalų generavimą, sistemiškai dar nėra nagrinėtas.

Literatūroje aprašytas su  $Ca^{2+}$  koncentracijos citoplazmoje išaugimu siejamas  $IP_3$  poveikis (Krinke *et al.*, 2007), nors  $IP_3$  receptorių genų augaluose ir nėra rasta (Edel, Kudla, 2015). Žinoma, kad  $IP_6$  pasižymi analogišku, netgi stipresniu poveikiu (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2000, 2003). Kadangi elektrofiziologinis  $IP_6$  poveikis aprašytas vos keliuose augalinių sistemų tyrimuose, o gyvūninėse sistemose apskritai netirtas, visiškai nesama žinių, kokie jonų kanalai galėtų veikti kaip  $IP_6$  receptoriai. Tiek elektrofiziologiniai, tiek modeliavimo tyrimai leidžia spėti, kad  $IP_3$  (ir / ar  $IP_6$ ) jautrūs kanalai turėtų būti lokalizuoti ląstelės vidinių saugyklų, greičiausiai, endoplazminio tinklo, membranoje (Alexandre *et al.*, 1990; Kikuyama *et al.*, 1993; Bishop *et al.*, 1999; Wacke, Thiel, 2001; Wacke *et al.*, 2003). Galima spėti, kad šie receptoriai arba yra per mažai homologiški gyvūnų  $IP_3$  receptoriams, arba žinomi kanalai turi dar neaprašytą domeną, jautrų  $IP_3$  (ir / ar  $IP_6$ ). Pavyzdžiui, aprašyta, kaip  $IP_6$  aktyvuoja tonoplasto FV ir VK kanalus (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2003).

Nė viename iš žinomų augalų genomų nerasta nuo įtampos priklausomų  $Ca^{2+}$  kanalų genų (atitinkančių gyvūnų  $Ca_v$  kanalų genus) (Edel, Kudla, 2015), nors spėjama, kad augalai turėtų turėti  $Ca^{2+}$  laidžių kanalų, kurių aktyvumas priklauso nuo įtampos (Lunevsky *et al.*, 1983; Hedrich, Fukushima, 2021). Esama tyrimų, rodančių  $Ca^{2+}$  sroves aktyvuojantį ciklinės ADP-ribozės poveikį (Allen *et al.*, 1995), tačiau kitų tyrimų rezultatai šiai minčiai prieštarauja (Pottosin *et al.*, 2009), taigi, šio potencialaus agonisto taikiniai nėra žinomi.

Veikimo potencialus augaluose gali sužadinti ir staigus temperatūros pokytis (Opritov *et al.*, 2005; Beilby, Casanova, 2014) – membranos depoliarizaciją tuomet turėtų inicijuoti nebūtinai nuo įtampos tiesiogiai ar

netiesiogiai priklausomi jonų kanalai. Gyvūnuose tokie kanalai priskiriami TRP (*Transient receptor potential*) kanalų grupei (Patapoutian, 2005), tačiau augaluose šiuos kanalus koduojančių genų nerasta (Edel, Kudla, 2015). Vis dėlto, esama duomenų, kad, pavyzdžiui, mentolis, kuris yra TRPM8 kanalų agonistas, gali sužadinti elektrinius signalus kerpsamanėje *Physcomitrella patens* (Koselski *et al.*, 2019).

Characeae šeimos dumblius galima sužadinti ir hiperpolarizavus jų MP iki  $\sim -300$  mV. Šiame procese taip pat turėtų būti svarbūs hiperpolarizacijos aktyvuojami  $\text{Ca}^{2+}$  kanalai, apie kuriuos nieko daugiau nežinoma (Gyenes *et al.*, 1980).

Characeae šeimos dumblių tonoplastas taip pat yra sužadinamas, spėjama, kad jo sužadinimo mechanizmas analogiškas plazminės membranos sužadinimo mechanizmui (Lunevsky *et al.*, 1983; Kikuyama, 1986; Kisnieriene *et al.*, 2019).  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų vaidmenį tonoplaste galėtų atlikti mechaniniam poveikiui jautrūs PIEZO kanalai. Aukštesniuose augaluose tonoplasto sužadinimui užtenka TPC ir TPK kanalų (per kuriuos daugiausiai teka katijonų srovės) bei AHA  $\text{H}^+$ -ATPazės aktyvumo (Jašlan *et al.*, 2019).

Su elektrinių signalų generavimu ir sklidimu kartais siejami tonoplasto TPC kanalai, kurie yra laidūs  $\text{Ca}^{2+}$ , tačiau jų aktyvacijai reikalinga nefiziologiškai aukšta  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracija citoplazmoje (Pottosin *et al.*, 1997). Esama tyrimų, tiek patvirtinančių, tiek paneigiančių TPC kanalų vaidmenį kuriant ar stiprinant  $\text{Ca}^{2+}$  srautus sužadinimo metu (Ranf *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2014; Kiep *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2024).

Siekiant įvertinti, kurie  $\text{Ca}^{2+}$  kanalai yra atsakingi už elektrinį sužadinamumą, galima ląsteles veikti specifiniais jonų kanalų blokatoriais, selektyviai blokuojančiais tam tikro tipo kanalus. Vis dėlto, ši strategija ne visada veiksminga tiriant augalų  $\text{Ca}^{2+}$  kanalus, nes daugelis gyvūninėse sistemose taikomų blokatorių ne taip specifiskai jungiasi prie analogiškų taikinių augaluose, be to, nėra atrasta augalų jonų kanalams specifinių blokatorių (De Vriese *et al.*, 2018). Gyvūnų modelinėse sistemose verapamilas blokuoja L-tipo nuo įtampos priklausomus  $\text{Ca}^{2+}$  kanalus (Li, Shi, 2019). Tiriant augalines sistemas nustatyta, kad verapamilas gali prisijungti prie kviečių (*Triticum aestivum*) šaknų plazminės membranos  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų, šio proceso disociacijos konstanta yra mikromoliarinė (Piñeros, Tester, 1997). Blokatorius pritaikomas siekiant įvertinti  $\text{Ca}^{2+}$  srautų įtaką įvairiems augalų fiziologiniams procesams, pavyzdžiui, obels (*Malus domestica*) žiedadulkių dygimą. (Zhang *et al.*, 2022). Apie šio blokatoriaus specifiskumą augalų  $\text{Ca}^{2+}$  kanalams nėra daug žinoma, tačiau kompiuterinės simuliacijos leidžia teigti, kad verapamilas gali prisijungti prie neselektyvių



Ca<sup>2+</sup> laidžių TPC kanalų poros ir taip juos blokuoti (Benkerrou *et al.*, 2019). Šią hipotezę patvirtino eksperimentai su ryžių (*Oryza sativa*) OsTPC kanalais, kurie, spėta, gali būti valdomi įtampos (Hashimoto *et al.*, 2004). Kitas blokatorius tetrandrinas blokuoja gyvūnų N- ir T-tipo Ca<sup>2+</sup> kanalus, kuriems yra specifiskesnis nei L-tipo Ca<sup>2+</sup> kanalams (Wiegand *et al.*, 1990; Rossier *et al.*, 1993). Taip pat nustatytas inhibicinis poveikis žinduolių TPC kanalams (Sakurai *et al.*, 2015), tačiau šio alkaloido sąveika su augalų Ca<sup>2+</sup> kanalais kol kas dar netirta. Policiklinis blokatorius NED-19 blokuoja baltažiedžio vairo TPC kanalus, sąveikaudamas su aminorūgštimis kanalo poroje (Kintzer, Stroud, 2016). Gyvūninėse sistemose šis blokatorius specifiskai blokuoja homologiškus TPC1 kanalus endolizosomose (Naylor *et al.*, 2009; Sakurai *et al.*, 2015). Taigi, lyginant įvairių potencialiai specifinių Ca<sup>2+</sup> kanalų blokatorių poveikį su poveikiu nespecifinių, tokių, kaip La<sup>3+</sup>, poveikiu (Koselski *et al.*, 2023), galima tikėtis atpažinti, kuriems kanalų tipams tyrimo metu blokuojami kanalai yra homologiškiausi.

Apibendrinant, už Ca<sup>2+</sup> srautus Characeae šeimos dumblių plazminės ir vakuolės membranų elektrinio sužadavimo metu atsakingų jonų kanalų molekulinė tapatybė lieka neaiški. Nors žinoma apie Ca<sup>2+</sup> srautus aktyvuojančias molekules (aminorūgštys, IP<sub>6</sub>), nežinoma, kurių genų produktai už juos atsakingi. Tikėtina, kad tam tikrą vaidmenį turi mechaniniam poveikiui jautrūs jonų kanalai OSCA, galbūt ir CNGC ar PIEZO kanalai.

#### 2.6.4. Kitų Characeae šeimos dumblių transporterių molekulinė tapatybė

Augalų ląstelių plazminės membranos paprastai būna labiau hiperpolarizuotos už gyvūnų ląstelių membranas dėl ryškaus H<sup>+</sup>-ATPazių aktyvumo. Elektrinių signalų generavimo metu padidėjusi Ca<sup>2+</sup> koncentracija citoplazmoje sumažina H<sup>+</sup>-ATPazių aktyvumą. Sumažėjus Ca<sup>2+</sup> koncentracijai, H<sup>+</sup>-ATPazių aktyvumas išauga, taip padedant membranai repolarizuotis (Kishimoto *et al.*, 1985; Sukhov *et al.*, 2019). Aukštesniuose augaluose ši vaidmenį atitinka AHA šeimos H<sup>+</sup>-ATPazės: AHA3, AHA4, AHA5 (Scherzer, Böhm, *et al.*, 2022).

Characeae šeimos dumbliuose taip pat esama bent kelių AHA šeimos H<sup>+</sup>-ATPazių, giminių aukštesniųjų augalų AHA2 ir AHA4 (Nishiyama *et al.*, 2018; Pertl-Obermeyer *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020; Phipps, Goodman, *et al.*, 2021).

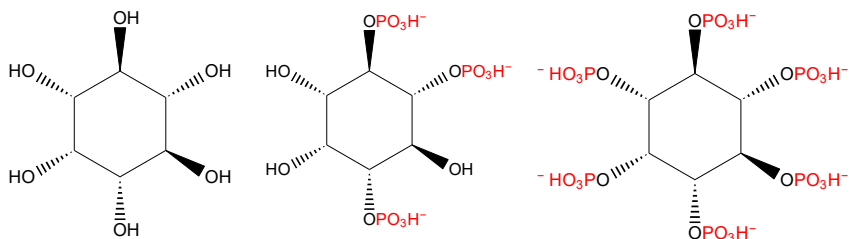
VP generavimo metu citoplazmoje pasyviai išauga Ca<sup>2+</sup> koncentracija, iš ląstelės išleidžiami K<sup>+</sup> ir Cl<sup>-</sup> jonai. Kad ląstelė, sugrįžusi į ramybės būseną, dar kartą galėtų sugeneruoti VP, šių jonų koncentracijas reikia atstatyti, tam

naudojant aktyvią pernašą. Jautriajame musėkautė su  $\text{Ca}^{2+}$  pašalinimu iš citoplazmos siejamos  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazės plazminėje membranoje *DmACA2* ir *DmACA10* bei endoplazminiame tinkle *DmECA1* (Scherzer, Huang, *et al.*, 2022). Characeae šeimos dumbliai taip pat turi tiek ACA, tiek ir ECA tipo  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazių, homologiškų aukštesniųjų augalų ACA9, ACA11, ECA3 ir ECA4 ATPazėms, kurios, tikėtina, yra lokalizuotos plazminėje membranoje ir vidinių saugyklų membranose (Nishiyama *et al.*, 2018; Phipps, Goodman, *et al.*, 2021).

Aukštesniuosiuose augaluose  $\text{K}^+$  koncentracija citoplazmoje greičiausiai atstatoma HAK5 transporterių (Iosip *et al.*, 2020), kurių genų *Chara braunii* genome nebuvo rasta (Nishiyama *et al.*, 2018). Tikėtina, kad Characeae šeimos dumbliai šiam tikslui pritaiko kito tipo aktyvius transporterius, tam tikromis sąlygomis  $\text{K}^+$  jonai gali tekėti ir per  $\text{K}_{\text{in}}$  kanalus. *Chara braunii* turi  $\text{K}^+/\text{H}^+$  antiporterių, priklausančių KEA ( $\text{K}^+$  efflux antiporter – ištekančios  $\text{K}^+$  srovės antiporteris) šeimai KEA1 ir KEA4 genus (Nishiyama *et al.*, 2018), *Chara australis* ekspresuoja KEA2 baltymą (Pertl-Obermeyer *et al.*, 2018). Aukštesniuosiuose augaluose KEA1 ir KEA2 antiporteriai aptinkami chloroplastų vidinėje membranoje (Kunz *et al.*, 2014), KEA4 – Goldžio aparate ir kitose endomembranose (Zhu *et al.*, 2018). Galbūt, prie aktyvaus  $\text{K}^+$  jonų transporto galėtų prisidėti ir HKT (*High affinity K<sup>+</sup> Transporter* – aukšto afiniškumo  $\text{K}^+$  transporteris) ir NHX (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger* –  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  keitiklis) transporteriai, labiau siejami su atsaku į druskingumo stresą (Phipps, Goodman, *et al.*, 2021).  $\text{K}_{\text{in}}$  kanalų funkciją Characeae šeimos dumbliuose galėtų atlikti KT5 kanalas, homologiškas baltažiedžio vairoio kanalui AKT5 (Nishiyama *et al.*, 2018).

Su  $\text{Cl}^-$  koncentracijos atstatymu po sužadavimo siejami aukštesniųjų augalų NRT (*Nitrate Transporter* – nitratų transporteris) anijonų transporteriai (Hedrich, Kreuzer, 2023), kurių Characeae šeima neturi. Galbūt analogišką funkciją dumbliuose galėtų atlikti  $\text{Cl}^-$ -katijonų ( $\text{Na}^+$  ir / arba  $\text{K}^+$ ) kotransporteris CCC1 (*Chloride cation cotransporter*), aptiktas *Chara corallina* (Pertl-Obermeyer *et al.*, 2018), baltažiedžiame vairyje randamas Goldžio komplekso membranose (Han *et al.*, 2020).

## 2.7. Inozitolio fosfatai augaluose



**2.2 pav.** Inozitolis (kairėje) ir fosforilinti jo dariniai – inozitolio 1,4,5-trisfosfatas (IP<sub>3</sub>) (viduryje) ir inozitolio heksakisfosfatas (IP<sub>6</sub>) (dešinėje).

Iš devynių cikloheksano heksolio izoformų *myo*-inozitolis (**2.2 pav.**) gamtoje paplitęs labiausiai. Šis angliavandenis sintetinamas iš gliukozės 6-fosfato, junginį pirmiausia ciklizuojant iki inozitolio 3-fosfato ir tada defosforilinant (Michell, 2008).

Inozitolis ir jo dariniai (ištirpę citoplazmoje, membraninių lipidų komponentai) plačiai naudojami archėjų ir eukariotų, daug rečiau – bakterijų karalysčių atstovų. Inozitolis ir jo dariniai gali būti kaupiami ląstelėse kaip osmolitai, taip pat gebantys stabilizuoti baltymus stresinėmis (per aukštos / žemos temperatūros, išdžiūvimo, padidėjusio druskingumo) sąlygomis (Michell, 2008). Pavyzdžiui, persodinus laukinių halofitinių ryžių *Porteresia coarctata myo*-inozitolio 1-fosfato sintazės (MIPS) geną į kitus augalus (ryžius *Oryza sativa*, garstyčias *Brassica juncea*), šie tapo atsparesni druskingumo stresui. Stresas ne taip intensyviai sumažino modifikuotų augalų biomasės augimą ir fotosintezės efektyvumą, šie pokyčiai sieti su viduląstelinės inozitolio koncentracijos padidėjimu (Das-Chatterjee *et al.*, 2006).

Inozitolį sujungus su citidino difosfato diacilgliceroliu, gaunamas lipidus fosfatidilinozitolis. Jis ir fosforilinti jo dariniai fosfatidilinozitidai (PIP) sudaro iki 30 % membraninių lipidų (Michell, 2008). Augaluose aptinkama fosfatidilinozitudų, kurių inozitolio liekana fosforilinta ties 3 (PI 3-P); 4 (PI 4-P); 5 (PI 5-P); 3 ir 5 (PI 3,5-P<sub>2</sub>); 4 ir 5 (PI 4,5-P<sub>2</sub>) anglies atomais. PIP funkcijos siejamos su signalinimu, formuojant ir pernešant membranines pūsles, sąveikaujant su citoskeletu, reguliuojant ląstelių poliškumą, reaguojant į osmotinį stresą (Munnik, Vermeer, 2010; Boss, Im, 2012).

### 2.7.1. Inozitolio 1,4,5-trisfosfatas (IP<sub>3</sub>) ir jo vaidmuo

Iš visų inozitolio fosfatų daugiausiai dėmesio sulaukia inozitolio 1,4,5-trisfosfatas (IP<sub>3</sub>) dėl savo potencialaus vaidmens su augalų atsaku į stresą susijusiuose signaliniuose keliuose.

Analogiškai gyvūnams, inozitolio 1,4,5-trisfosfatas sintetinamas fosfolipazei C (PLC) skeliant PI 4,5-P<sub>2</sub> į IP<sub>3</sub> ir diacilglicerolį DAG. Augaluose randama tik vieno tipo – ζ – PLC, neturinti kitoms fosfolipazėms įprastų reguliavimo domenų. Žinoma, kad ši fosfolipazė jautri Ca<sup>2+</sup> (Munnik, Vermeer, 2010). Tai labai apsunkina inozitolio fosfatų ir ypač IP<sub>3</sub> signalinių kelių tyrimus, nes Ca<sup>2+</sup> koncentracijos svyravimus gali lemti įvairūs išoriniai stresoriai, pavyzdžiui, net ir augalinės medžiagos paruošimas tyrimams (Boss, Im, 2012).

IP<sub>3</sub> koncentracijų svyravimai ląstelėse gali būti tiriami naudojant radioaktyviais žymenimis (<sup>3</sup>H) žymėtą IP<sub>3</sub> arba pritaikant IP<sub>3</sub> prisijungiančius baltymus. Nors šios strategijos veiksmingai taikomos gyvūniniuose tyrimuose, augaluose IP<sub>3</sub> koncentracija yra santykinai maža palyginus su kitais inozitolio fosfatais, todėl dėl santykinai žemo specifiškumo minėti metodai teikia riboto patikimumo žinias (Munnik, Vermeer, 2010).

Tyrimus taip pat apsunkina inozitolio fosfatų metabolizmą reguliuojančių fermentų gausa ir nespecifiškumas: pavyzdžiui, vienas fermentas gali fosforilinti keletą skirtingų fosfoinozitudų, tą pačią reakciją gali vykdyti keletas fermentų (Heilmann, 2016). Dėl šios priežasties sunku įvertinti, kiek vieno ar kito fermento geno išveiklinimas padidina ar sumažina konkretaus junginio koncentraciją, tiesiogiai jos nesekant.

Žinoma, kad baltažiedžio vairo genas FIERY1 – inozitolio polifosfatų 1-fosfatazė. Išveiklinti šio geno *fiery1* mutantai tampa ne tokie atsparūs šalčiui, sausrai, padidėjusiam druskingumui ar osmotiniam stresui. Mutantiniuose daiguose stebėta didesnė viduląstelinė IP<sub>3</sub> koncentracija (Xiong *et al.*, 2001). Vis dėlto, FIERY1 pasižymi ne tik inozitolio polifosfatų 1-fosfatazės aktyvumu, bet geba ir defosforilinti nukleotidų 3',(2'),5'-bisfosfatus. *fiery1* mutantuose reiškiant pastarąjį fermento aktyvumą kompensuojančius baltymus, galima atstatyti kai kuriuos fenotipo požymius, sietus ir su inozitolio polifosfatų 1-fosfatazės aktyvumu, pavyzdžiui, išaugusį atsparumą sausrai (Hirsch *et al.*, 2011).

Į baltažiedžio vairo geną įterpus žmogaus I tipo inozitolio polifosfatų 5-fosfatazę, specifiškai hidrolizuojančią IP<sub>3</sub>, pastebėta, kad viduląstelinė IP<sub>3</sub> koncentracija sumažėja daugiau nei 10 kartų. Tokie augalai gravistimuliuoti: vazonas su augalu paverstas į horizontalią padėtį ir stebėta,

kaip greitai žiedynai atsilenkia iki pirmąsios vertikalios padėties. Priešingai laukinio tipo augalams, gravistimuliacija mutantuose nebelemia viduląstelių  $IP_3$  bangų, žiedynai atsilenkia lėčiau. Taip pat aptikta, kad sulėtėja augsino pernaša (Perera *et al.*, 2006).

Per didelę PIN baltymų, atsakingų už augsino transportą, raišką šaknyse lemia išaugusią augsino koncentraciją, slopinančią šaknų augimą. Ieškant dvigubų baltažiedžio vairo mutančių, kuriuose PIN transporteriai reiškiami per intensyviai, bet augalo fenotipas vis tiek artimas laukinio tipo fenotipui, aptiktas SUPO1 (*Suppressor of PIN1 Overexpression*) baltymas, turintis inozitolio polifosfatų 1-fosfatazės funkciją. Išveiklinus SUPO1, šaknų ląstelėse išauga  $IP_3$  ir  $Ca^{2+}$  koncentracijos. Padaryta prielaida, kad viduląstelių  $IP_3$  koncentracijos pokyčiai lemia  $Ca^{2+}$  koncentracijos pokyčius, kurie gali moduluoti aktyvumą tam tikrų kinazių ir fosfatazių, sąveikaujančių su augsino transporteriais PIN, lemiančiais augsino pasiskirstymą šaknyse (Zhang *et al.*, 2011).

$IP_3$  taip pat susijęs su augalų atsaku į šviesą. Žinoma, kad mėlyna šviesa stabdo hipokotilių tįsimą, už tai atsakingas fotoreceptorius fototropinas 1 (PHOT1), tad baltažiedžiame vairyje išveiklinus šį baltymą koduojantį geną, hipokotiliai auga ilgesni. Šį mutantinį fenotipą anuliuoja papildomai išveiklinta inozitolio polifosfatų 5-fosfatazė 13 (5PT13), kurios raišką natūraliomis sąlygomis mėlyna šviesa inhibuoja. 5PT13 išveiklinimas taip pat lemia didesnę viduląstelinę  $IP_3$  ir  $Ca^{2+}$  koncentraciją (Chen *et al.*, 2008).

Augalų streso hormonas abscizinė rūgštis (ABA) baltažiedžio vairo epidermio ląstelėse sukelia  $Ca^{2+}$  bangas. Fosfolipazės C (PLC) inhibitorius U73122 šias bangas slopina. Šis inhibitorius taip pat neleidžia pasireikšti kontrolinėmis sąlygomis stebimai ABA sukeltai ląstelių membranos depoliarizacijai dėl išaugusių transmembraninių anijoninių srovių (Meimoun *et al.*, 2009).

Į žiotelių varstomąsias ląsteles injekavus  $IP_3$ , stebėta išaugusi  $Ca^{2+}$  koncentracija, lėmusi žiotelių užsivėrimą (Gilroy *et al.*, 1990).

Nors tiriami nesusiję procesai – gravitropiniai, fototropiniai atsakai, žiotelių varstymasis, atsakas į stresorius, fiziologinė funkcija dažnai siejama su viduląstelinės  $Ca^{2+}$  koncentracijos išaugimu. Pavyzdžiui, viename iš pirmųjų šių sąsają pasiūliusių tyrimų stebėta, kaip  $IP_3$  injekcija į avižų (*Avena sativa*) vakuolinės kilmės pūsleles lemia  $Ca^{2+}$  išskyrimą į išorinį tirpalą (Schumaker, Sze, 1987). Vis dėlto, iki šiol neaišku, kokie baltymai  $IP_3$  koncentracijos svyravimus verčia į  $Ca^{2+}$  bangas (Krinke *et al.*, 2007).

Keliuose tyrimuose, atliktų dviejose bendradarbiaujančiose laboratorijose, „patch clamp“ metodu nustatyta, kad mikromoliarinės  $IP_3$  koncentracijos gali išleisti  $Ca^{2+}$  iš burokų (*Beta vulgaris*) vakuolių į

citoplazmą (Alexandre *et al.*, 1990; Alexandre, Lassalles, 1992; Allen, Sanders, 1994). Tirti IP<sub>3</sub> receptoriai buvo valdomi įtampos, be Ca<sup>2+</sup> nepraleido kitų katijonų ir anijonų srovių (Alexandre *et al.*, 1990). Kanalai pasižymi sublaidumo būsenomis, stebėti 30 pS ir 50 pS vienetinių kanalų laidumai (Alexandre *et al.*, 1990). Kitame tyrime stebėti 11 pS, 51 pS ir 182 pS laidumai (Allen, Sanders, 1994).

Minėti tyrimai kritikuoti, nes daugiau publikacijų, patvirtinančių šių tyrimų rezultatus, nėra (Krinke *et al.*, 2007). Mikroelektrodine virpančio zondo technika (MIFE) atliktas tyrimas, tyręs potencialius buročių tonoplasto Ca<sup>2+</sup> kanalų aktyvatorius ir blokatorius, IP<sub>3</sub> poveikio neaptiko (Pottosin *et al.*, 2009). Kitų tyrimų metu sukurtas aukštesniųjų augalų veikimo potencialo generavimo modelis, leidžiantis atsižvelgti į galimą IP<sub>3</sub> receptorių įtaką. Vis dėlto, remiantis receptorių parametrais, aprašytais aukščiau minimuose straipsniuose, nepavyko nustatyti reikšmingesnio šių kanalų indėlio generuojant veikimo potencialus. Nors Ca<sup>2+</sup> bangų amplitudė padidėja iki 30 %, leidžiant Ca<sup>2+</sup> per IP<sub>3</sub> receptorius tekėti iš vakuolės į citoplazmą, veikimo potencialų parametrai nekinta (Novikova *et al.*, 2017).

*Chara corallina* ir *Nitella syncarpa* dumbliuose parodyta, kad į citoplazmą injekuotas IP<sub>3</sub> gali padidinti elektrinio sužadavimo metu per membraną tekančios srovės amplitudę, arba sugeneruoti spontaniškus veikimo potencialus (Zherelova, 1989a; Thiel *et al.*, 1990). Parodyta, kad fosfolipazės C, sintetinančios IP<sub>3</sub>, inhibitoriai neomycinas ir U73122 mažina sužadavimo metu tekančios srovės amplitudę, kai kurios ląstelės praranda sužadimumą (Biskup *et al.*, 1999). Vis dėlto, kita tyrėjų grupė nesugebėjo pakartoti šių rezultatų – tiek IP<sub>3</sub> injekcija, tiek panašios ar dar didesnės minėtų blokatorių koncentracijos įtakos ląstelių sužadimumui neturėjo (Tazawa, Kikuyama, 2003).

Tolesnius ir išsamesnius IP<sub>3</sub> poveikio tyrimus, ypač siekiant nustatyti šio poveikio molekulinį mechanizmą, pristabdė faktas, kad augaluose iki šiol nėra aptikta gyvūnų IP<sub>3</sub> receptoriams homologišku baltymų (Edel, Kudla, 2015).

### 2.7.2. Inozitolio heksakisfosfatas (IP<sub>6</sub>) ir jo vaidmuo

Inozitolio heksakisfosfatas (IP<sub>6</sub>) augaluose kaupiamas, siekiant turėti organinio fosforo atsargų – didžioji dalis sėklų fosforo saugoma būtent šio junginio pavidalu (Freed *et al.*, 2020).

IP<sub>6</sub> sintetinamas dviem keliais, nuo lipidų priklausomu ir nuo lipidų nepriklausomu. Pirmojo kelio metu pirmiausia susintetinamas IP<sub>3</sub>, kaip minėta 2.7.1. skyriuje, tuomet IP<sub>3</sub> fosforilinamas iki IP<sub>6</sub>. Sintetinant IP<sub>6</sub> kitu,

rečiau vykstančiu keliu, visiškai fosforilinamas citoplazmoje ištirpęs inozitolis (Freed *et al.*, 2020).

IP<sub>6</sub> gali būti susijęs su hormonų auksino ir jazminų rūgšties signaliniais keliais. Žinoma, kad abiejų šių hormonų kelių aktyvinimui būtina pašalinti tam tikrus genų raiškos slopiklius, tai įgyvendinama juos pažymint ubikvitinu. Kristalografiškai tiriant auksino receptorių aptikta, kad prie ubikvitino ligazės komplekso TIR1 domeno prisijungia ne tik pats auksinas, bet ir IP<sub>6</sub>, didindamas sąveikos stiprumą (Tan *et al.*, 2007). Analogiškai tiriant jazminų rūgšties receptorių, pastebėta, kad prie ubikvitino ligazės komplekso COI1 gali prisijungti ne tik jazminų rūgšties-izoleucino junginys, bet ir ne iki galo fosforilinta inozitolio forma IP<sub>5</sub> (Sheard *et al.*, 2010).

Svarstoma, kad augaluose ne IP<sub>3</sub>, bet IP<sub>6</sub> galėtų būti signalinė molekulė, atsakinga už visą spektrą funkcijų, anksčiau priskirtų IP<sub>3</sub>: tikėtina, kad paveikus augalą IP<sub>3</sub>, vyksta šios molekulės konversija į IP<sub>6</sub>, ir būtent pastaroji ir yra veikli (Munnik, Vermeer, 2010).

Bulvės (*Solanum tuberosum*) žiotelių varstomąsias ląsteles paveikus abscizine rūgštimi (ABA), stebėtas viduląstelinės IP<sub>6</sub>, bet ne IP<sub>3</sub> koncentracijos išaugimas. Aptikta, kad šių ląstelių protoplastus paveikus arba mikromoliarinėmis Ca<sup>2+</sup> koncentracijomis, arba IP<sub>6</sub>, sumažėja įtekančių K<sup>+</sup> srovių amplitudės. Analogiškas efektas stebėtas ir tiriant pupos (*Vicia faba*) protoplastus. Aptikta, kad IP<sub>6</sub> poveikis yra stereo-spezifinis – kiti aktyvaus *myo*-IP<sub>6</sub> stereoizomerai *scyllo*-IP<sub>6</sub> ir *neo*-IP<sub>6</sub> K<sup>+</sup> srovių neblokuoja. IP<sub>3</sub> taip pat blokuoja K<sup>+</sup> sroves, tačiau jo poveikis yra apie 100 kartų silpnesnis (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2000).

Tolesni tyrimai atskleidė, kad IP<sub>6</sub> aktyvuotos Ca<sup>2+</sup> srovės teka ne per pupos protoplastų plazminę membraną: 5 μM IP<sub>6</sub> aktyvuoja tonoplasto FV ir SV kanalus (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2003).

Svarstoma, kad tokie rezultatai pagrindžia IP<sub>6</sub> sąsają su Ca<sup>2+</sup> srovėmis iš vidinių ląstelės saugyklų; taip pat nuo šių srovių priklausomų K<sup>+</sup> kanalų aktyvumo moduliavimą ABA signalų grandinėje (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2000, 2003).

IP<sub>6</sub> taip pat gali būti inozitolio pirofosfatų IP<sub>7</sub> ir IP<sub>8</sub> pirmtakas. Šios molekulės yra susijusios su neorganinio fosforo jutimu augaluose: ryžiuose (*Oryza sativa*) esant užtekčiai didelei IP<sub>7</sub> ir IP<sub>8</sub> koncentracijai, inozitolio fosfatai padidina tikimybę SPX1 domeną turintiems baltymams inhibuoti PHT1 ir PHR1 transkripcijos veiksnius, taip stabdant nurašymą genų, atsakingų už fosfatų pasisavinimo sustiprinimą (Puga *et al.*, 2014). Išveiklinus inozitolio kinazę IPK1, baltažiedis vairėnis nebesugeba susisintetinti IP<sub>6</sub>, taip pat sutrinka fosfatų pasisavinimo valdymas, augalas

nesustoja kaupti fosfatų net ir turėdamas jų užtekinai (Stevenson-Paulik *et al.*, 2005).



### 3. METODAI

#### 3.1. Tiriamieji menturdumbliai *Nitellopsis obtusa*

*Nitellopsis obtusa* (N.A. Desvieux) J. Groves subrendę makrodumbliai rinkti rudens mėnesiais Stankos ežere (Trakų raj.). Dumblių talomai laikyti stikliniuose akvariumuose kontroliuojamomis pastoviomis sąlygomis ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$  temperatūra,  $9,5 \pm 0,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intensyvumo baltos šviesos apšvietimas, 12 /12 val. šviesos / tamsos režimas).

Prieš vykdant eksperimentus, tarpubamblinės *N. obtusa* ląstelės buvo mechaniškai kerpančios atskiriamos nuo talomo paliekant bamblius ir laikomos per naktį kontroliniame APW tirpale  $9,5 \pm 0,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intensyvumo apšvietime balta šviesa.

#### 3.2. Naudoti tirpalai

Viduląsteliniais miroelektrodiniais tyrimams, ląstelių gyvybingumo tyrimui ir ciklozės greičio tyrimui naudotas kontrolinis APW (*artificial pond water* – dirbtinio tvenkinio vandens) tirpalas, kurį sudarė 0,1 mM KCl, 1 mM NaCl, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,2 palaikyta buferių sistema iš 3 mM HEPES ir 1,5 mM TRIS.

Tiriant citoplazminių lašų jonų kanalus „patch clamp“ metodu, naudotas kontrolinis ACS (*artificial cell sap* – dirbtinės ląstelės sultys) tirpalas, sudarytas iš 100 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 5,3 palaikyta buferiu MES.

Tirtos medžiagos ir jų koncentracijos:

- potencialūs Ca<sup>2+</sup> kanalų blokatoriai:
  - verapamilas (0,1 mM, 0,3 mM, 1 mM);
  - tetrandrinas (0,1 mM ir 0,2 mM), ištirpinta dimetilsulfoksido (DMSO) (atitinkamai 0,75 % ir 1,5 %);
  - NED-19 (50 μM ir 75 μM), ištirpinta DMSO (atitinkamai 0,09 % ir 0,13 %);
  - LaCl<sub>3</sub> (0,5 mM);
- potencialūs Ca<sup>2+</sup> kanalų aktyvatoriai:
  - D-*myo*-inozitolio 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) trinatrio druska (75 μM ir 150 μM);
  - D-*myo*-inozitolio heksakisfosfato (IP<sub>6</sub>) dodekanatrio druska (75 μM ir 150 μM);

- fosfolipazės C (PLC) inhibitorius U73122 (25  $\mu\text{M}$ ), ištirpintas 1 % DMSO.

Tirtos medžiagos buvo ištirpintos kontroliniame APW arba ACS tirpale (aukščiau nurodytos hidrofobiškesnės medžiagos prieš tirpinimą APW ištirpintos DMSO).

Tiriant  $\text{LaCl}_3$  poveikį, į papildomą  $\text{Cl}^-$  koncentraciją tiriamajame tirpale (0,5 mM  $\text{LaCl}_3$  tirpale lemia papildomą 1,5 mM  $\text{Cl}^-$  jonų koncentraciją) neatsižvelgta. Žinoma, kad palyginamos ar net keliomis eilėmis didesnės išorinės  $\text{Cl}^-$  koncentracijos kardinaliai nekeičia nei *Nitellopsis obtusa*  $\text{Cl}^-$  koncentracijų citoplazmoje ir vakuolėje, nei elektrinių signalų parametrų, įskaitant VP sužadavimo slenkstį  $E_{th}$  (Katsuhara, Tazawa, 1986; Lapeikaitė *et al.*, 2020).

Druskų (ypač  $\text{Na}^+$  jonų) koncentracija aplinkoje keičia menturdumblių *Nitellopsis obtusa* elektrofiziologinius parametrus (Winter *et al.*, 1999; Kisnieriene *et al.*, 2019). Tiriant abiejų koncentracijų  $\text{IP}_3$  ir 75  $\mu\text{M}$  koncentracijos  $\text{IP}_6$  poveikį, tirpintos šių junginių  $\text{Na}^+$  druskos, dėl to buvo atsižvelgta į papildomą  $\text{Na}^+$  koncentraciją APW tirpale. Tirpalai gaminti taip, kad  $\text{Na}^+$  koncentracija vis tiek būtų standartinė (1 mM);  $\text{Cl}^-$  jonų koncentracija standartizuota naudojant HCl, buferių sistema užtikrinant standartinį pH 7,2.

150  $\mu\text{M}$  koncentracijos  $\text{IP}_6$  atveju tirpale papildomai ištirpsta 1,8 mM  $\text{Na}^+$  jonų, todėl tyrimai vykdyti su modifikuotais kontroliniais APW tirpalais, kuriuose  $\text{Na}^+$  koncentracija buvo 1,8 mM, kitų druskų koncentracijos ir pH atitiko standartines vertes. Reikšmingos didesnės  $\text{Na}^+$  koncentracijos ląstelės aplinkoje įtakos tirtiems elektrofiziologiniams parametrams nebuvo pastebėta (pvz. **4.4 lentelė** ir **4.7 lentelė**)

Tirtos medžiagos pirktos iš Sigma Aldrich.

### 3.3. Tarpubamblinių ląstelių elektrofiziologinių atsakų tyrimas

Elektrofiziologiniai pavienių tarpubamblinių *Nitellopsis obtusa* ląstelių tyrimai vykdyti remiantis šaltiniais (Lapeikaitė *et al.*, 2019, 2020), taikant dviejų elektrodų porų fiksuotos srovės / įtampos metodą. Tarpubamblinė ląstelė tyrimo metu įtvirtinama registravimo kameroje, pagamintoje iš organinio stiklo, tuomet kamera pripildoma kontrolinio tirpalo.

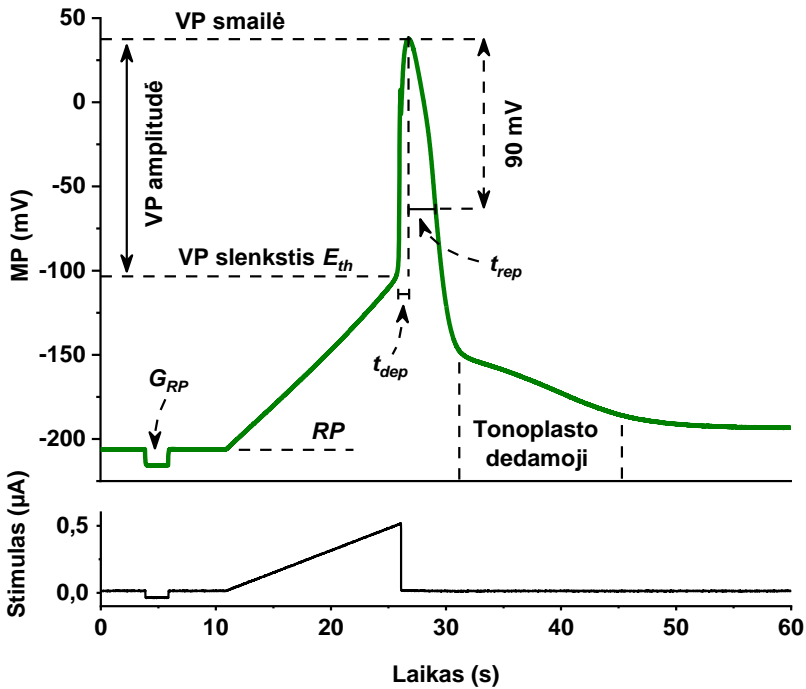
Siekiant ląstelę elektriškai stimuliuoti atskira išorinių Ag/AgCl elektrodų pora ir palaikyti pastovų ląstelės MP centrinėje kameros dalyje, taikant fiksuotos įtampos metodiką, tarpai tarp registravimo kameros dalių buvo izoliuoti vazelinu. Tokiu būdu, skirtingose kameros dalyse patalpinus

išorinius elektrodus ir tarp jų sukūrus įtampą, elektros srovė gali tekėti tik per ląstelę.

Mikroelektrodų gamybai naudoti borosilikatinio stiklo kapiliarai (WPI, Sarasota, FL, USA), iš kurių elektrodų traukikliu „P-1000“ (Sutter Instrument, Co., Novato, CA, USA) buvo ištraukiamos mikropipetės, kurių galiuko skersmuo siekė maždaug 1  $\mu\text{m}$ . Mikropipetės pripildomos 3 M KCl tirpalu. Toks mikroelektrodas manipulatoriumi „PatchMan“ (Eppendorf) būdavo įvedamas į ląstelės vakuolę centrinėje kameros dalyje. Referentinis elektrodas, pripildytas 1 % agaru 3 M KCl, būdavo įtvirtinamas tirpale greta tiriamos ląstelės. Signalų surinkimo sistemą sudarė stiprintuvas „TEC-10CX“ ir analogas-kodas keitiklis „Digidata 1440A“, kontroliuoti kompiuteriu „pCLAMP 10.2“ programa (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Iš abiejų pusių vazelinu izoliuotas 5 mm ilgio plotelis išilgai ląstelės, į kurią buvo įvestas elektrodas, buvo nuolat perfuzuojamas perfuzijos sistema (~1 ml/min; Scientifica PPS).

Praėjus 1,5 val. po mikroelektrodo įvedimo, taikytas fiksuotos srovės metodika paremtas **CC protokolas**, siekiant įvertinti MP ir jo dinamiką apibrėžiančius parametrus. Šio protokolo metu naudojant 1 kHz diskretizavimo dažnį 5 min. intervalu išoriniais elektrodais sužadinti du VP (**3.1 pav.**), stimuliacija atlikta tolygiai (0,02  $\mu\text{A/s}$ ) didinant per ląstelę tekančią nuolatinę elektros srovę. Stimuliavimas nutraukiamas pasiekus VP sužadinimo slenkstį  $E_{th}$ . Vertinti parametrai:

- membranos ramybės potencialas  $RP$  (mV): vertintas prieš kiekvieną stimuliuotą VP;
- membranos laidumas ramybės būsenoje  $G_{RP}$  ( $\text{S/m}^2$ ): ląstelė stimuliuota trumpu stačiakampiu hiperpolarizuojančiu srovės impulsu (2 s, 50 nA),  $G_{RP}$  apskaičiuotas pagal Omo dėsnį;
- VP sužadinimo slenksčiu  $E_{th}$  (mV) laikyta tokia membranos potencialo vertė, kai MP depolarizacijos greitis viršija 60 mV/s (Lapeikaitė *et al.*, 2020).
- VP smailė (mV);
- VP amplitudė (mV) – skirtumas tarp VP smailės ir VP sužadinimo slenksčio;
- VP depolarizacijos trukmė  $t_{dep}$  (s) įvertinta kaip laiko tarpas, per kurį ląstelės MP depolarizuojasi nuo VP sužadinimo slenksčio  $E_{th}$  vertės iki VP smailės vertės;
- VP repolarizacijos trukmė  $t_{rep}$  (s) įvertinta kaip laiko tarpas, per kurį ląstelės MP repolarizuojasi nuo VP smailės vertės per 90 mV.



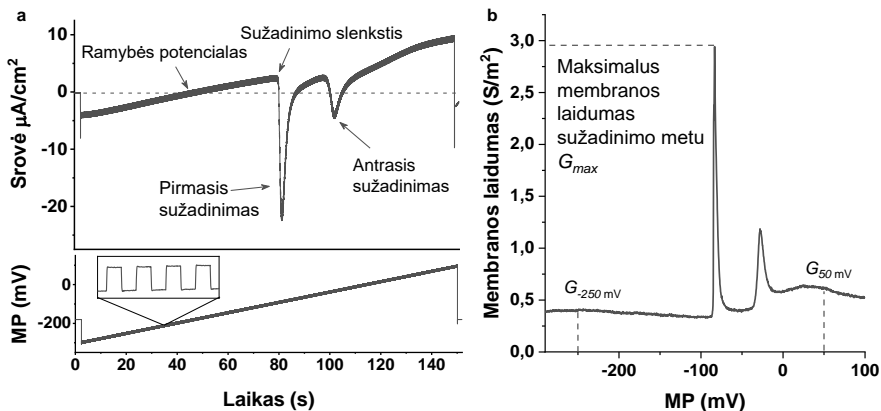
**3.1 pav.** Fiksuotos srovės metodu analizuoti *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinės ląstelės elektrofiziologiniai parametrai (CC protokolai): membranos ramybės potencialas  $RP$ , membranos varža ramybės būsenoje  $G_{RP}$ , VP slenkstis  $E_{th}$ , VP smailė, VP amplitudė, VP depolarizacijos ir repolarizacijos trukmės, atitinkamai  $t_{dep}$  ir  $t_{rep}$ . Adaptuota pagal (Lapeikaitė *et al.*, 2019).

Pabaigus tyrimą fiksuotos srovės metodika (CC protokolai), eksperimentai tęsti taikant fiksuotos įtampos metodiką: MP fiksuotas ties  $-180$  mV (nebent nurodyta kitaip), priklausomai nuo tikslo taikytas vienas ar keli žemiau išvardinti protokolai.

**VC1 protokolai (3.2 pav.)**, tinkamas įvertinti membranos laidumą norimame MP intervale (Tsutsui *et al.*, 1987a; Tsutsui, Ohkawa, 1993). Naudojant  $1$  kHz diskretizavimo dažnį, MP tolygiai keliamas nuo  $-300$  mV iki  $150$  mV  $3$  mV/s greičiu. Žinoma, kad, jei MP keitimo greitis neviršija  $100$  mV /  $30$  s, per membraną tekančių srovių voltamperinė charakteristika, gauta naudojant tokį protokolą, nesiskiria nuo voltamperinių charakteristikų, gautų naudojant tradicinius stačiakampius impulsus (atmetant sužadavimo regionus) (Tsutsui *et al.*, 1987a), bet užtrunka trumpiau.

Pritaikant šį protokolą, galima nustatyti membranos ramybės potencialo  $RP$  vertę (per membraną tekančių srovių atstojamoji lygi nuliui) bei sužadinimo slenkščio  $E_{th}$  vertę (MP, kai  $dV/dI$  tampa neigiama) (**3.2 pav.** a). Šių parametru vertės, gautos taikant VC1 protokolą, nesiskyrė nuo verčių, gautų panaudojant CC protokolą, bet šioje disertacijoje neanalizuotos.

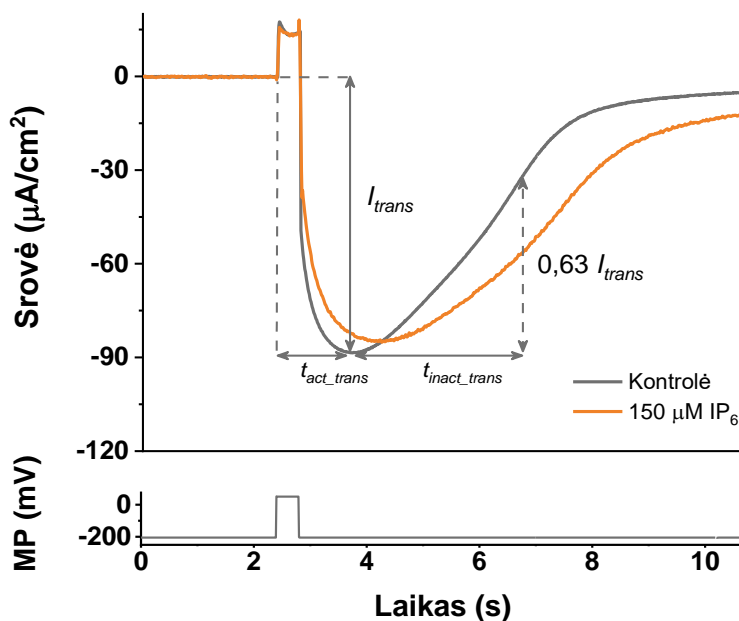
Tolygiai keliamas MP buvo moduluotas trumpais stačiakampiais impulsais (50 ms, 10 mV; **3.2 pav.** a stimulo grafikas). Tokiu būdu, pritaikant Omo dėsnį, buvo galima apskaičiuoti membranos laidumo vertes visame tirtame MP ruože. Statistinei analizei pasirinktos trys vertės – maksimalus membranos laidumas sužadinimo metu  $G_{max}$  ( $S/m^2$ ) taip pat membranos laidumo vertės ties  $-250$  mV ( $G_{-250\text{ mV}}$ ) ir ties  $50$  mV ( $G_{50\text{ mV}}$ ) (**3.2 pav.** b). Žinoma, kad ties  $-250$  mV *Nitellopsis obtusa* dumblių plazminėje membranoje aktyviausia  $H^+$ -ATPazė (Beilby *et al.*, 1993; Kisnieriene *et al.*, 2019), be to, vis labiau hiperpolarizuojant MP, aktyvuojami  $K_{in}$  kanalai (Kisnierienė *et al.*, 2012; Kisnieriene *et al.*, 2019; Blatt, 2024). Ties  $50$  mV membranos laidumą daugiausiai lemia  $K_{out}$  kanalų aktyvumas (Kisnieriene *et al.*, 2019; Blatt, 2024).



**3.2. pav.** Fiksuotos įtampos metodu taikant VC1 protokolą analizuoti *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinės ląstelės elektrofiziologiniai parametrai: a) membranos potencialas (MP) tolygiai keliamas nuo  $-300$  mV iki  $150$  mV, registruojant per membraną tekančias sroves, stimulus moduluotas trumpais stačiakampiais impulsais; b) remiantis Omo dėsniumi, kiekvieno impulso metu suskaičiuotas membranos laidumas, priklausantis nuo MP; statistinei analizei pasirinkta vertinti maksimalų laidumą sužadinimo metu  $G_{max}$  ( $S/m^2$ ) bei laidumo vertes ties  $-250$  mV ( $G_{-250\text{ mV}}$ ) ir  $50$  mV ( $G_{50\text{ mV}}$ ).

**VC2 protokolą (3.3 pav.)**, skirtas įvertinti  $Cl^-$  ir  $Ca^{2+}$  srovių dinamiką sužadinimo metu, ląstelės MP palaikant ramybės būsenoje (Zherelova *et al.*,

2009). Naudojant 10 kHz diskretizavimo dažnį, MP fiksuojamas ties ramybės potencialu. Kadangi ramybės būsenoje membrana yra laidžiausia  $K^+$  ir  $H^+$  jonams (Beilby, Casanova, 2014), tokiu būdu šių srovių superpozicija eliminuojama. Ląstelė sužadinama 400 ms trukmės stačiakampiu impulsu, MP fiksuojant ties 50 mV ir vėl grąžinant į prieš tai buvusią ramybės potencialo vertę (Zherelova *et al.*, 2009).



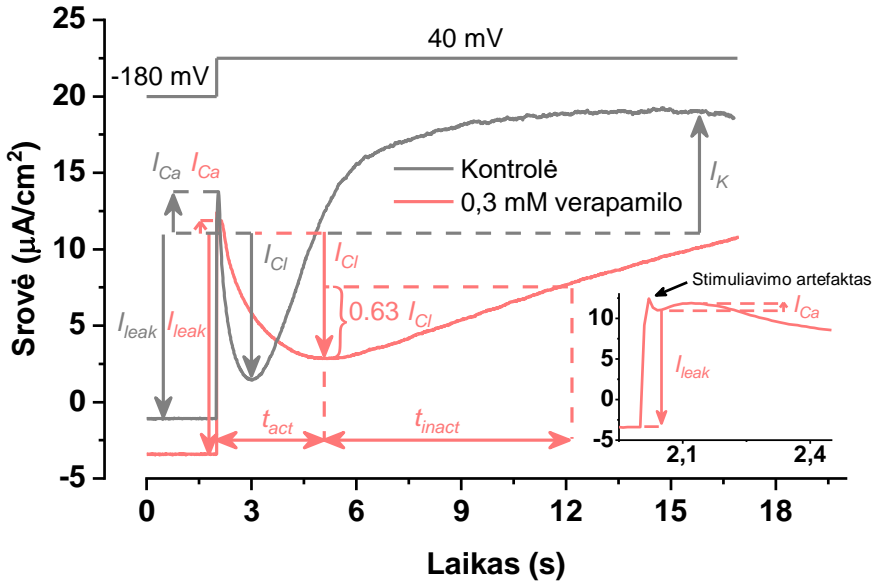
**3.3 pav.** Fiksuotos įtampos metodu taikant VC2 protokolą analizuoti *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinės ląstelės elektrofiziologiniai parametrai; pateikiamos tipinės per membraną tekančios srovės kontrolinėmis sąlygomis ir paveikus ląstelę 30 min. 150  $\mu$ M IP<sub>6</sub> tirpalu. Ląstelės membranos potencialas (MP) fiksuojamas ties ramybės potencialu, tuomet 400 ms trukmės impulsu fiksuojamas ties 50 mV, taip ląstelę sužadinant. Tada MP vėl fiksuojamas ties ramybės potencialu. Vertinti parametrai: sužadinimo metu tekančios srovės amplitudė  $I_{trans}$  bei jos aktyvacijos ir inaktyvacijos trukmės, atitinkamai  $t_{act\_trans}$  ir  $t_{inact\_trans}$ .

Taikant tokį protokolą, neatsižvelgiama į ramybės potencialo verčių skirtumus ląstelių populiacijoje, tačiau toks protokolai suteikia žinių apie jonų srautus ramybės būsenoje ir yra artimesnis natūralioms fiziologinėms sąlygoms, palyginus su protokolais, kai MP fiksuojamas ties tyrėjo pasirinkta verte. Statistiniam vertinimui pasirinkti parametrai sužadinimo srovės amplitudė  $I_{trans}$  ( $\mu$ A/m<sup>2</sup>), taip pat jos aktyvacijos ir inaktyvacijos

trukmės, atitinkamai  $t_{act\_trans}$  (s) ir  $t_{inact\_trans}$  (s).  $t_{act\_trans}$  apibrėžta kaip laiko tarpas nuo stimuliacijos pradžios iki tada, kai pasiekama maksimali sužadavimo metu tekančios srovės vertė;  $t_{inact\_trans}$  apibrėžta kaip laiko tarpas, per kurį srovė sumažėja per 63 % nuo maksimalios vertės.

**VC3 protokolas (3.4 pav.),** skirtas įvertinti sužadavimo metu tekančių srovių dinamiką sužadavimo metu, ląstelės MP fiksuojant ties norima MP verte. Naudojant 100 Hz diskretizavimo dažnį, MP fiksuojamas ties -180mV. Tada kas 3 min. ląstelės MP stačiakampiais 15 s trukmės impulsais fiksuojamas ties norimomis įtampos vertėmis intervale nuo -120 mV iki 60 mV kas 20 mV. Panaudojant tokią sužadavimo srovių norimomis įtampomis rinkinį, galima sudaryti jų voltamperines charakteristikas. Vertinti parametrai:

- neselektyvi nuotėkio srovė  $I_{leak}$ , ( $\mu\text{A}/\text{m}^2$ ) pasižyminti omine priklausomybe nuo įtampos, stebima keletą dešimčių milisekundžių po pateikto stimulo (Lunevsky *et al.*, 1983);
- įtekanti  $\text{Ca}^{2+}$  srovė  $I_{Ca}$  ( $\mu\text{A}/\text{m}^2$ ): pastebima keletą šimtų milisekundžių po stimulo;  $I_{Ca}$ , aktyvuoja  $\text{Cl}^-$  srovę, jos reversijos potencialas ~40 mV;
- įtekanti  $\text{Cl}^-$  srovė  $I_{Cl}$  ( $\mu\text{A}/\text{m}^2$ ): ši srovė aktyvuojama  $I_{Ca}$  srovės, pasižymi didesne už ją amplitude;  $I_{Cl}$  reversijos potencialas ~80 mV;
- $I_{Cl}$  aktyvacijos trukmė  $t_{act}$  (s) atitinka VC2 protokolo parametą  $t_{act\_trans}$ ;
- $I_{Cl}$  inaktyvacijos trukmė  $t_{inact}$  (s) atitinka VC2 protokolo parametą  $t_{inact\_trans}$ ;
- bendra suminė  $\text{Ca}^{2+}$  ir  $\text{Cl}^-$  srovė  $I_{CaCl}$  ( $\mu\text{A}/\text{m}^2$ );
- $I_K$  srovė ( $\mu\text{A}/\text{m}^2$ ), vertinta prieš pat pasibaigiant stimuluojančiam srovės impulsui (Lunevsky *et al.*, 1983; Kourie, 1994); nors, remiantis reversijos potencialu, kuris nesiekia pusiausvyrinio  $\text{K}^+$  potencialo (~-170 mV), šią srovę sudaro ir kitos dedamosios,  $I_K$  srovė geriausiai atspindi  $\text{K}_{out}$  kanalų aktyvumą sužadavimo metu.



**3.4 pav.** Fiksuotos įtampos metodu taikant VC3 protokolą analizuoti *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinės ląstelės elektrofiziologiniai parametrai; pateikiamos tipinės sužadavimo metu per membraną tekančios srovės kontrolinėmis sąlygomis ir 30 min. paveikus ląstelę 0,3 mM koncentracijos verapamilo tirpalu. Šiuo atveju membranos potencialas fiksuotas ties -180 mV, tada ties 40 mV. Vertinti parametrai: nuotėkio srovė  $I_{leak}$ ,  $Ca^{2+}$  srovė  $I_{Ca}$ ,  $Cl^-$  srovė  $I_{Cl}$ ,  $K^+$  srovė  $I_K$ . Taip pat vertintos  $I_{Cl}$  srovės aktyvacijos ir inaktyvacijos trukmės atitinkamai  $t_{act}$  ir  $t_{inact}$ . Įklijoje paryškintas  $I_{leak}$  ir  $I_{Ca}$  srovių atsiskyrimas tomis pačiomis sąlygomis, pasirinkus adekvačią laiko skalę.

Pritaikius fiksuotos srovės metodikos CC protokolą ir vieną ar kelis fiksuotos įtampos metodikos protokolus (VC1, VC2 ir / ar VC3), tirtos ląstelės centrinėje kameros dalyje esantis iš abiejų pusių vazelinu izoliuotas plotelis buvo paveikiamas tirama medžiaga 30 min., palaikant perfuziją ~1 ml/min greičiu. Tuomet tokia pačia tvarka taikyti tie patys protokolai, kaip ir kontrolinėmis sąlygomis.

Naudojant didesnes tirpiklio DMSO koncentracijas ( $\geq 0,75\%$ ), ląstelės pirmiausia buvo 30 min. veikiamos DMSO tirpalu, taikyti tie patys aukščiau minėti protokolai (dviguba kontrolė). Tik tada ląstelė buvo veikiamą tiriamąja medžiaga, ištirpinta DMSO, taikyti tie patys protokolai.



Tiriant  $IP_3$  ir  $IP_6$  poveikį, po protokolų serijos ląstelė 30 min vėl inkubuota kontrolinėmis sąlygomis, tokia pati protokolų serija vėl pakartota, taip siekiant įvertinti, ar  $IP_3$  ir / ar  $IP_6$  poveikis yra grįžtamas.

### 3.4. Citoplazminių lašų jonų kanalų tyrimas

Citoplazminiai lašai ruošti, kaip aprašyta (Lühring, 1986). Tarpubamblinė ląstelė įtvirtinama vertikaliai guminiame vamzdyje, pripildytame kontrolinio tirpalo. Ląstelės apatinis galas nukerpamas žirkliemis, ląstelės turiniui 30 min. leidžiama tekėti į kontrolinio tirpalo lašą po ląstele. Šiame laše iš vakuolės membranos – tonoplasto – spontaniškai formuojasi citoplazminiai lašai, kurių turinį sudaro citoplazma.

Tyrimui taikytas „patch clamp“ metodas, prisiurbtos ląstelės (*cell-attached*, šiuo atveju prisiubto tonoplasto – *tonoplast-attached*) konfigūracija. Borosilikatinės mikropipetės (WPI, Sarasota, FL, USA) trauktos naudojant pipečių traukiklį „P-1000“ (Sutter Instrument, Co., Novato, CA, USA). Mikropipetės (galiuko skersmuo  $\sim 1 \mu\text{m}$ ) pildytos arba kontroliniu tirpalu, arba kontroliniame tirpale ištirpinta tiriamąja medžiaga. Kaip referentinis elektrodas naudota sidabrinė viela, įmerkta netoli tiriamų citoplazminių lašų. Registravimo sistemą sudarė stiprintuvas „MultiClamp 700B“ ir analogas-kodas keitiklis „Digidata 1440A“ (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) valdomas kompiuteriu programine įranga „pClamp 10“ (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Naudotas diskretizavimo dažnis – bent 10 kHz, signalas filtruotas 1 kHz Besselio filtru.

Vertinti parametrai: per pavienį jonų kanalą tekančios srovės amplitudė (pA), kanalo atsidadymo tikimybė  $P_o$ .

### 3.5. Ciklozės greičio tyrimas

Menturdumblių tarpubamblinėse ląstelėse stebimas greitas (iki  $100 \mu\text{m/s}$ ) citoplazmos judėjimas – ciklozė, nulemtas miozino molekulių judėjimo aktino gijomis. Šio proceso greitis priklauso nuo  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracijos citoplazmoje, nes  $\text{Ca}^{2+}$  jungdamasis prie aktomiozino komplekso jį surakina; pavyzdžiui, VP generavimo metu citoplazmoje  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracijai viršijus  $\sim 1 \mu\text{M}$ , stebimas ciklozės sustojimas (Williamson, Ashley, 1982; Shimmen, 2007). Šis procesas yra grįžtamas – ciklozės greičio priklausomybė nuo laiko gali būti aprašyta eksponentine lygtimi  $v = v_{max}(1 - e^{-\frac{t}{\tau}})$ , kur  $v$  yra ciklozės greitis,  $v_{max}$  – maksimalus ciklozės greitis,  $t$  – laikas, o  $\tau$  – laiko konstanta (Pupkis *et al.*, 2021). Dėl  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracijos citoplazmoje ir ciklozės sąsajos stebint ciklozės greitį galima netiesiogiai vertinti

citoplazminę  $\text{Ca}^{2+}$  koncentraciją (Okazaki *et al.*, 2002; Shimmen, 2007), pavyzdžiui, siekiant nustatyti, ar potencialūs  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų aktyvatoriai, tokie kaip  $\text{IP}_6$ , keičia  $\text{Ca}^{2+}$  dinamiką ląstelės ramybės būsenoje ir / ar po elektrinio sužadinimo.

Citoplazmos judėjimas stebėtas tarpubamblinę *Nitellopsis obtusa* ląstelę įdėjus į registravimo kamerą su norimu tirpalu ir stebint mikroskopu su kamera „Eclipse FN1“ (Nikon), naudojant 200× didinimą. Vaizdas buvo įrašomas atviro kodo programa „OBS Studio“, įrašai vėliau analizuojami. Ciklozės greitis vertintas kas 1 min. pagal matomų citoplazminių dalelių judėjimo greitį, įvertinant, kokį atstumą jos nukeliaudavo per tam tikrą laiko tarpą.

Vykdamas eksperimentą, pirmiausia tarpubamblinė ląstelė 10 min. paliekama kontroliniame APW tirpale, tuomet galvaniniu elementu (1,5 V) elektriškai sužadinama, stebimas ciklozės sustojimas. Po sužadinimo 20 min. laukiama, kol ciklozės greitis atsistatys, tuomet tirpalas automatiškai pakeičiamas iš kontrolinio į 150  $\mu\text{M}$   $\text{IP}_6$  tirpalą. Ląstelė inkubuojama 30 min., tuomet vėl elektriškai sužadinama. Po 20 min., tirpalas pakeičiamas atgal į kontrolinį, po 30 min. inkubacijos ląstelė dar kartą elektriškai sužadinama, laukiama 20 min.

Pasirinkta vertinti ciklozės greitį, kai ląstelė yra ramybės būsenoje  $v_r$  prieš pat elektrinį sužadinimą ( $\mu\text{m/s}$ ), taip pat aukščiau aprašyto eksponentinio modelio parametrus  $v_{max}$  – maksimalų ciklozės greitį atsistatymo metu ( $\mu\text{m/s}$ ) ir  $\tau$  – greičio atsistatymo laiko konstantą (min.).

### 3.6. Tarpubamblinių ląstelių gyvybingumo tyrimas

Ląstelių gyvybingumas vertintas pagal jų turgorą – jį praradusi ląstelė laikyta žuvusia.

Tyrimo metu po 15 ląstelių laikytos kontroliniame tirpale, taip pat 0,1 mM, 0,3 mM ir 1 mM koncentracijų verapamilo tirpaluose registravimo kameroje. Kas 30 min. mechaniškai tikrinama, kiek ląstelių dar yra turgorizuotos. Tyrimas kiekvieno tirpalo atveju kartotas 4 kartus. Išgyvenusių ląstelių skaičiaus procentinės išraiškos priklausomybė nuo laiko aproksimuota Boltzmanno funkcija, siekiant įvertinti laiko trukmę  $t_{1/2}$ , per kurią tam tikrame tirpale žūsta 50 % ląstelių (min.).

### 3.7. Statistinė analizė

Duomenys analizuoti pasitelkiant programinę įrangą pClamp 10.2 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA), MicroCal OriginPro 2018

(OriginLab, Northampton, MA, USA) ir programavimo kalbą R (statistinės analizės paketas *rstatix* 0.7.2). Pavienių joninių kanalų tyrimuose papildomai naudota programa QuB (Nicolai, Sachs, 2014).

Atliktų tyrimų imties dydžiai pateikiami **3.1 lentelėje**; *n* nurodo tirtų citoplazminių lašų skaičių, kitais atvejais – tarpubamblinių ląstelių skaičių.

**3.1 lentelė.** Atliktų tyrimų imties dydžiai. Tyrimų „patch clamp“ metodu atveju *n* nurodo tirtų citoplazminių lašų skaičių, kitais atvejais – tarpubamblinių ląstelių skaičių.

Medžiaga ir koncentracija	Tyrimas / taikytas protokolai					
	CC protokolas	VC1 protokolas	VC2 protokolas	VC3 protokolas	„Patch clamp“ tyrimas	Ciklozės tyrimas
Verapamilas, 0,1 mM	4			5		
Verapamilas, 0,3 mM	10			10	7	
Verapamilas, 1 mM	6			4		
Tetrandrinas, 0,1 mM	5			5		
Tetrandrinas, 0,2 mM	10			10	5	
NED-19, 50 μM	7			8		
NED-19, 75 μM	8			8	8	
LaCl <sub>3</sub> , 0,5 mM	5	6	6			
IP <sub>3</sub> , 75 μM	6	8	8			
IP <sub>3</sub> , 150 μM	4	4	4			
IP <sub>6</sub> , 75 μM	9			8		
IP <sub>6</sub> , 150 μM	8	4	3	8		4
U73122, 25 μM	4	4	4			

Tiriant tarpubamblinių ląstelių gyvybingumą, visose grupėse (kontrolinė grupė ir 0,1 mM, 0,3 mM bei 1 mM verapamilo koncentracijos) tirta po 15 ląstelių.

Siekiant įvertinti skirtumų tarp imčių reikšmingumą, vertinant pasirinktus parametrus, pasitelktos statistinės analizės priemonės.

Kiekvienas tyrimas (išskyrus tyrimą „patch clamp“ metodika bei ląstelių gyvybingumo tyrimą) vykdytas pirmiausia pasirinktus parametrus vertinant kontrolinėmis sąlygomis, o tada tą pačią ląstelę veikiant pasirinkta medžiaga. Dėl šios priežasties taikyti poriniai statistiniai testai. Tiriant tetrandrino,  $IP_3$ ,  $IP_6$  ir U73122 poveikį, taikytas blokuotųjų duomenų ANOVA kriterijus bei *post-hoc* analizė (Bonferronio testas); kaip alternatyva taikytas Friedmano rangų sumų kriterijus bei *post-hoc* analizė (Bonferronio testas), priklausomai nuo imčių skirstinių (Shapiro-Wilko kriterijus).

Vertinant tetrandrino poveikį jonų kanalų aktyvumui „patch clamp“ metodu bei lyginant VP sužadinimo slenksčio  $E_{th}$  vertės pokyčius, paveikus tarpubamblines ląsteles  $IP_3$  ir  $IP_6$  tirpalais, taikytas vienfaktoris nepriklausomų imčių ANOVA kriterijus bei *post-hoc* analizė (Tukey'io HSD testas); kaip alternatyva taikytas Kruskalo-Wallisio kriterijus bei *post-hoc* analizė (Dunno testas), priklausomai nuo imčių skirstinių (Shapiro-Wilko kriterijus).

Tiriant citoplazminių lašų jonų kanalus „patch clamp“ metodu bei ląstelių gyvybingumą, vertinant skirtumų reikšmingumą, taikytas Stjudento t testas nepriklausomoms imtims (atsižvelgiant į jų variabilumą – Stjudento t testas dispersijai vertinti) arba Wilcoxonio kriterijus nepriklausomoms imtims, atsižvelgiant į imčių skirstinius (Shapiro-Wilko kriterijus). Siekiant vizualiai palyginti jonų kanalų voltamperines charakteristikas kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio, paveikslėliuose 4.6, 4.15 ir 4.20 pavaizduotos tiesinės regresijos, visais atvejais  $R^2 > 0,98$ .

Aukščiau nepaminti skirtumai tarp imčių vertinti taikant Stjudento t kriterijų priklausomoms imtims arba Wilcoxonio kriterijų priklausomoms imtims, atsižvelgiant į imčių skirstinius (Shapiro-Wilko kriterijus).

Visais atvejais skirtumas laikytas reikšmingu, kai  $p < 0,05$ . Tirtų parametrų vertės pateikiamos kaip vidurkiai  $\pm$  SD. Šalia p verčių pateikiama, koks statistinis testas buvo naudotas: „T“ – Stjudento t kriterijus nepriklausomoms imtims; „W“ – Wilcoxonio kriterijus nepriklausomoms imtims; „T“ – Stjudento t kriterijus priklausomoms imtims; „W“ – Wilcoxonio kriterijus priklausomoms imtims.

### 3.8. Autoriaus indėlis

Dažį eksperimentų, vertinant verapamilo, tetrandrino ir NED-19 poveikį elektrofiziologiniams tarpubamblinių *Nitellopsis obtusa* ląstelių

parametrams fiksuotos srovės ir fiksuotos įtampos metodais, atliko dr. Indrė Lapeikaitė.

Ląstelių gyvybingumo tyrimo duomenis surinko Julius Kavaliauskas, šie duomenys panaudoti jo magistro studijų baigiamajame darbe „Klasikinio L-tipo kalcio kanalų blokatoriaus verapamilio poveikis žvaigždėtojo maurašakio (*Nitelloopsis obtusa*) ląstelėms“.

Eksperimentus, vertinant  $IP_3$  poveikį elektrofiziologiniams tarpubamblinių *Nitelloopsis obtusa* ląstelių parametrams fiksuotos srovės ir fiksuotos įtampos metodais, atliko Judita Janužaitė, šie duomenys panaudoti jos bakalauro studijų baigiamajame darbe „Inozitolio trisfosfato ( $IP_3$ ) poveikis menturdumblio *Nitelloopsis obtusa* ląstelių elektrinių signalų parametrams“.

Aukščiau nepaminėtus eksperimentus atliko, programavo ir duomenis analizavo disertacijos autorius.

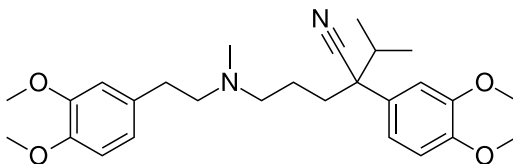
## 4. REZULTATAI

### 4.1. Ca<sup>2+</sup> kanalų blokatorių poveikio tyrimas

Siekiant nustatyti Ca<sup>2+</sup> kanalų indėlį generuojant *Nitellopsis obtusa* veikimo potencialus, pasitelkti keturi Ca<sup>2+</sup> kanalų blokatoriai – verapamilas, tetrandrinas, NED-19 ir La<sup>3+</sup>, – vertinta, kaip skirtingos jų koncentracijos veikia pasirinktus elektrinių signalų parametrus.

#### 4.1.1. Verapamilo poveikio tyrimas

Verapamilas (**4.1 pav.**) – vienas iš dažniausiai ir plačiausiai taikomų Ca<sup>2+</sup> kanalų blokatorių, priklausantis fenilalkilaminų grupei (Elliott, Ram, 2011), blokuojantis gyvūnų L-tipo Ca<sup>2+</sup> kanalus (Li, Shi, 2019). Pasirinkta tirti 30 min. ląstelių inkubacijos 0,1 mM, 0,3 mM ir 1 mM šios medžiagos koncentracijų tirpaluose poveikį įvairiems su *Nitellopsis obtusa* elektrogeneze susijusiems parametrams.



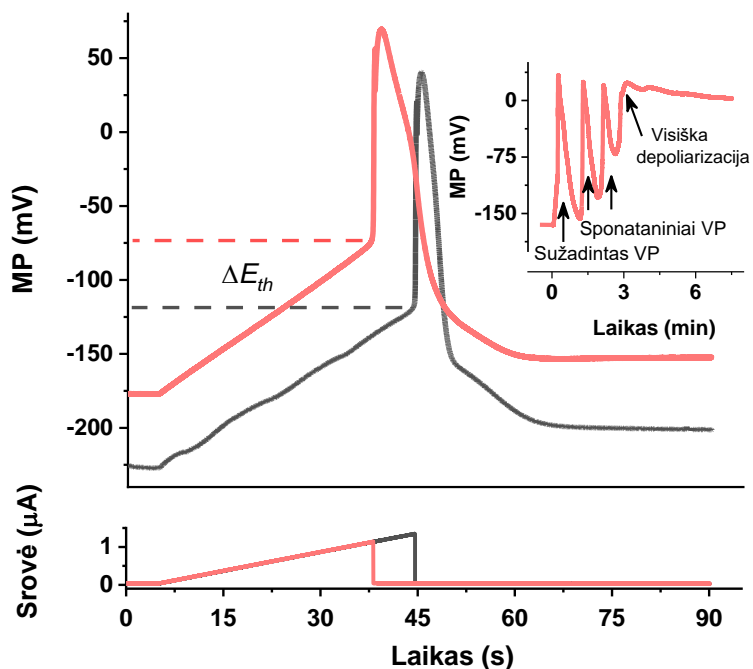
**4.1 pav.** Verapamilo struktūrinė formulė.

Taikant fiksuotos srovės metodą (CC protokolą), 0,1 mM verapamilo poveikio elektrofiziologiniams parametrams neaptikta (**P1 lentelė**). Ląsteles 30 min paveikus didesnių koncentracijų verpamilo tirpalu, poveikis jau buvo stebėtas (**4.1 lentelė, P16 lentelė, 4.2 pav.**).

**4.1 lentelė.** 0,3 mM verapamilo poveikis elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrams, CC protokolas, n = 10. Pateikti verčių vidurkiai ± SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai (p<0,05).

	Kontrolė	Verapamilas, 0,3 mM	p
Membranos ramybės potencialas $RP$ (mV)	-210±11	-172±36	0,002 W
Membranos laidumas ramybės būsenoje $G_{RP}$ ( $S \cdot m^{-2}$ )	0,45±0,16	0,42±0,11	0,235 T
VP sužadinimo slenkstis $E_{th}$ (mV)	-101±12	-87±12	0,016 T
VP smailė (mV)	36±14	41±19	0,301 T
VP amplitudė (mV)	137±21	128±23	0,160 W
VP depoliarizacijos trukmė $t_{dep}$ (s)	1±0,2	1,3±0,2	<0,001 T
VP repoliarizacijos trukmė $t_{rep}$ (s)	3,1±0,9	6±3	0,002 W

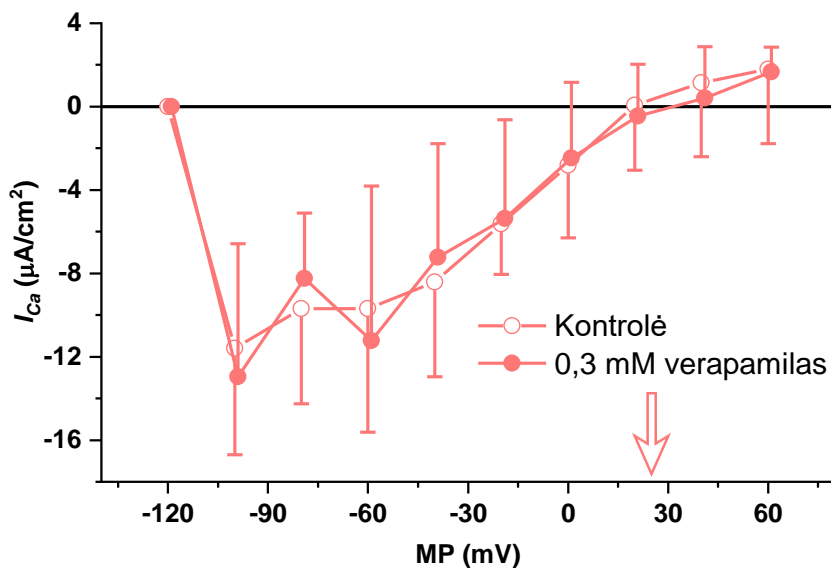
Nustatyta, kad 0,3 mM verapamilo koncentracijos tirpalas depoliarizuoja membranos ramybės potencialo  $RP$  vertę vidutiniškai per 40 mV, o 1 mM koncentracijos – per 100 mV. Nors 0,3 mM verapamilo koncentracijos tirpalas per maždaug 10 mV depoliarizavo VP sužadinimo slenkstį  $E_{th}$ , didesnės koncentracijos efektas nebuvo statistiškai reikšmingas dėl didelio elektrofiziologinio atsako variabilumo ir mažo imties dydžio, nors parametro vidurkiai skyrėsi daugiau nei 20 mV. Nepaisant verapamilo VP poveikio sužadinimo slenkščiui  $E_{th}$ , dėl nepakitusių VP smailės vertės VP amplitudės nepakito nepriklausomai nuo tirpalo koncentracijos. Verapamilas taip pat reikšmingai platino veikimo potencialus, ilgindamas tiek jų depoliarizacijos, tiek ir repoliarizacijos trukmes. 0,3 mM koncentracijos tirpalas pailgino depoliarizacijos trukmes ~30 %, o 1 mM koncentracija – daugiau nei dukart. Analogiškai, 0,3 mM verapamilo koncentracijos tirpalas pailgino repoliarizacijos trukmes beveik du kartus, o 1 mM koncentracija – daugiau nei 10 kartų. Poveikis membranos laidumui ramybės būsenoje nestebėtas.



**4.2 pav.** Tipinis 0,3 mM verapamilo poveikio elektriškai sukeltiems *Nitellopsis obtusa* veikimo potencialams pavyzdys. Verta atkreipti dėmesį į skirtumą tarp VP sužadavimo slenksčio  $E_{th}$  verčių. Įklėja rodo pavyzdinį membranos potencialo (MP) kitimą laike, kai po elektriškai sugeneruoto VP stebėti keli spontaniniai VP ir negrįžtama visiška MP depoliarizacija.

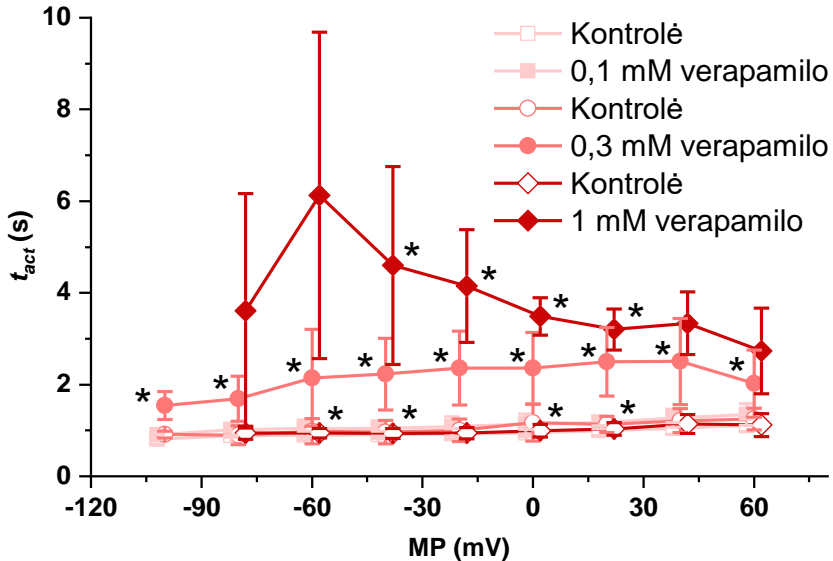
Tiriant verapamilo poveikį fiksuotos įtampos metodu, taikytas VC3 protokolas. Nepriklausomai nuo naudotos koncentracijos, verapamilas neveikė nei vienos iš pagrindinių sužadavimo metu tekančių srovių amplitudžių visame tirtame MP intervale (**4.3 pav.**, **lentelės P2-P5, P8-P12, P17-P20**). Nors aptikta, kad 0,3 mM verapamilo koncentracijos tirpalas mažina sužadavimo metu tekančių  $K^+$  srovių  $I_K$  amplitudes (**lentelė P15**), eksperimentai ląsteles veikiant 1 mM verapamilo tirpalu šios tendencijos nepatvirtino.





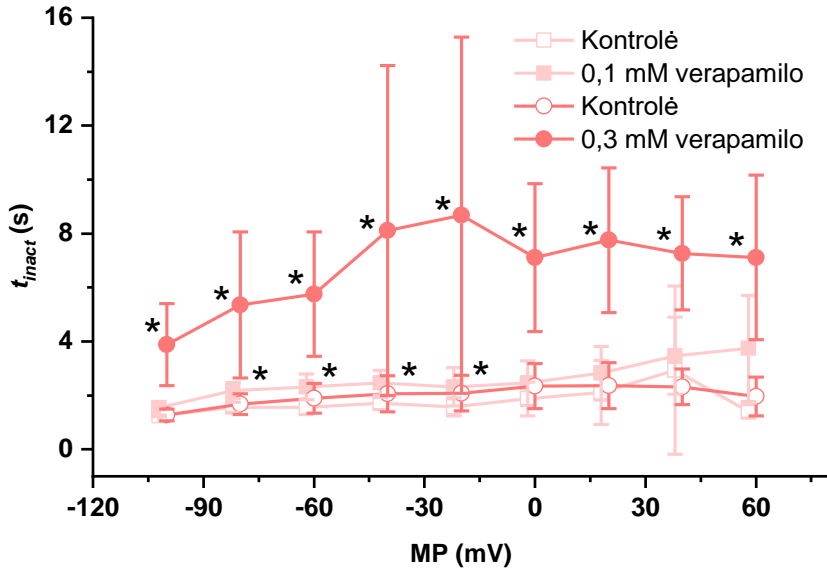
**4.3 pav.** Voltamperinės  $\text{Ca}^{2+}$  srovių  $I_{\text{Ca}}$ , tekančių per *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranas sužadavimo metu, charakteristikos – kontrolinėmis sąlygomis ir tas pačias ląsteles 30 min. paveikus 0,3 mM koncentracijos verapamilo tirpalu. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Srovės reversijos potencialas (pažymėta rodykle) nepakito.  $n=10$ .

Nors sužadavimo metu tekančių srovių amplitudės nekito, verapamilas reikšmingai keitė šių srovių tekėjimo dinamiką – ilgino tiek  $I_{\text{Cl}}$  srovės aktyvacijos, tiek ir inaktyvacijos trukmes, atitinkamai  $t_{\text{act}}$  ir  $t_{\text{inact}}$  (**3.3 pav.**, **4.4 pav.**, **4.5 pav.**). Paveikus ląsteles 0,1 mM verapamilo koncentracijos tirpalu, poveikis aktyvacijos trukmėms stebėtas tik ties tam tikromis įtampomis: -60 mV, -40 mV ir 20 mV (**P6 lentelė**), tuo tarpu 0,3 mM koncentracija reikšmingai ilgino aktyvacijos trukmės visame tirtame MP ruože nuo -100 mV iki 60 mV: trukmės pailgėjo apie du kartus (**P13 lentelė**). 1 mM verapamilo poveikis aktyvacijos trukmėms buvo reikšmingas MP intervale nuo -20 mV iki 40 mV. Nereikšmingumą ties kitomis MP vertėmis lėmė išaugęs variabilumas ir nedidelis imties dydis, nors patys verčių vidurkiai visame tirtame įtampų intervale nuo kontrolinių verčių skyrėsi bent pusestro karto (**P21 lentelė**).



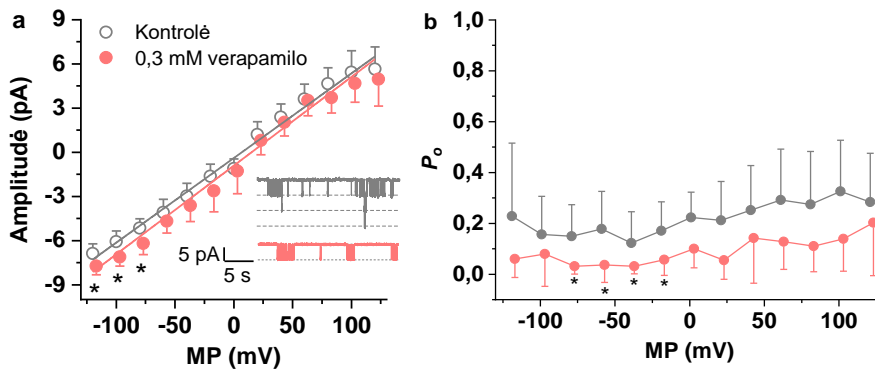
**4.4 pav.** Sužadavimo metu per *Nitellopsis obtusa* membranas tekančios  $\text{Cl}^-$  srovės  $I_{\text{Cl}}$  aktyvacijos trukmių  $t_{\text{act}}$  priklausomybė nuo membranos potencialo (MP) kontrolinėmis sąlygomis bei 30 min. paveikus 0,1 mM, 0,3 mM ir 1 mM koncentracijų verapamilo tirpalais. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus ( $p < 0,05$ ) tarp parametro verčių kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio.  $n=4-10$ .

Panašios tendencijos stebėtos vertinant verapamilo poveikį  $I_{\text{Cl}}$  inaktyvacijos trukmėms (**4.5 pav.**). 0,1 mM verapamilo koncentracijos tirpalas pailgino jas įtampų intervale nuo -80 mV iki -20 mV (**P7 lentelė**), o 0,3 mM koncentracijos tirpalo poveikis buvo reikšmingas dar didesniame intervale – nuo -100 mV iki 60 mV, kur inaktyvacijos trukmės pailgėjo net 3-5 kartus (**P14 lentelė**). Dėl sulėtėjusios srovių dinamikos taikytas VC3 protokolas neleido adekvačiai įvertinti 1 mM verapamilo koncentracijos poveikio inaktyvacijos trukmėms (taip pat ir  $I_{\text{K}}$  srovei), nes stimulus dažnai baigdavosi anksčiau, nei būdavo pasiekama stacionari būseną. Didžiausios tirtos koncentracijos verapamilo poveikis kokybiškai neturėtų skirtis nuo mažesnių koncentracijų sukulto poveikio.



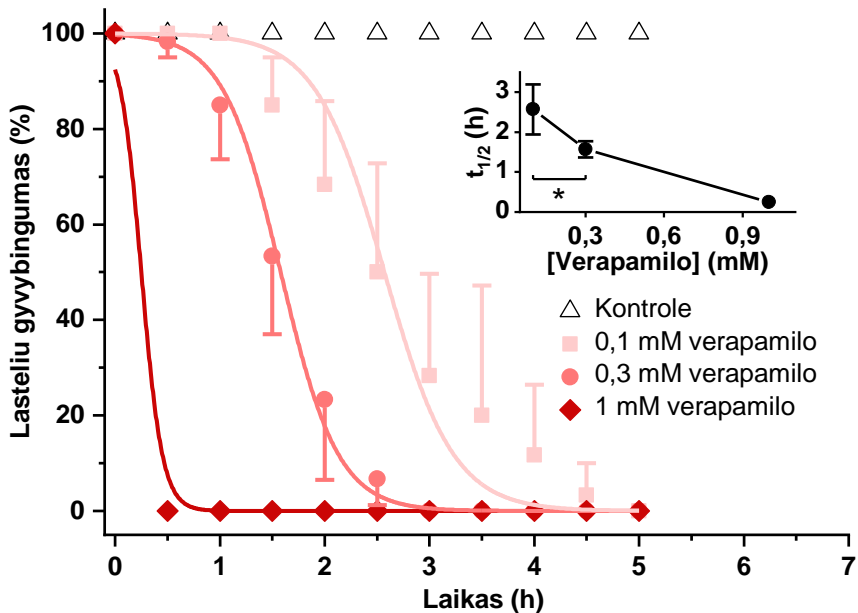
**4.5 pav.** Sužadavimo metu per *Nitellopsis obtusa* membranas tekančios  $Cl^-$  srovės  $I_{Cl}$  inaktyvacijos trukmių  $t_{inact}$  priklausomybė nuo membranos potencialo (MP) kontrolinėmis sąlygomis bei 30 min. paveikus 0,1 mM ir 0,3 mM koncentracijų verapamilo tirpalais. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus ( $p < 0,05$ ) tarp parametro verčių kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio.  $n=5-10$ .

Pastebėjus verapamilo poveikius, kurių negalima priskirti vien tik  $Ca^{2+}$  kanalų blokavimui, pavyzdžiui, membranos ramybės potencialo depoliarizaciją ir VP trukmės pailgėjimą, nutarta įvertinti, ar šis blokatorius veikia  $K^+$  kanalų aktyvumą. Šiuo tikslu pasirinkta patogi citoplazminių lašų modelinė sistema, leidžianti įvertinti pavienių tonoplasto  $K^+$  kanalų aktyvumą „patch clamp“ metodu. Tiriant šiuos kanalus, aptikta, kad, nors ties neigiamiausiomis potencialo vertėmis (nuo -60 mV) 0,3 mM verapamilo koncentracija reikšmingai didina srovių per pavienius didelio laidumo  $K^+$  kanalus amplitudes (**4.6 pav.**, **P1 pav.**), kanalų laidumas, sprendžiant iš voltamperinių charakteristikų tiesinių regresijų, nepakito. Vertinant kanalų atsidarymo tikimybes  $P_o$ , aptikta, kad verapamilas mažina jas MP ruože nuo -20 mV iki -80 mV (**4.6 pav.**, **P1 pav.**).



**4.6 pav.** 0,3 mM koncentracijos verapamilo tirpalo poveikis *Nitellopsis obtusa* citoplazminių lašų membranų  $K^+$  kanalų aktyvumui: srovių, tekančių per pavienius kanalus (a) ir kanalų atsidarymo tikimybėms (b), palaikant tam tikrą įtampą. Įkliaja kairėje rodo tipinį kanalų aktyvumą, palaikant -80 mV įtampą. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus ( $p < 0,05$ ) tarp parametro verčių kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio.  $n=7-9$ .

Svarbu paminėti, kad verapamilo poveikis ne tik keitė elektrinių signalų parametrus, bet ir buvo ląstelėms toksiškas. Daugumos (10 iš 12) ląstelių, veiktų 0,3 mM verapamilo tirpalu, MP galiausiai (per keletą valandų) negrįžtamai depoliarizavosi (**4.2 pav.** įkliaja). Tai buvo įvertinta kaip ląstelių žūtis, nes kartu ląstelės prarado turgorą, nustojo judėjusi citoplazma. Siekiant tiksliau įvertinti toksišką verapamilo poveikį, atliktas ląstelių gyvybingumo tyrimas. Aptikta, kad kontroliniame tirpale per visą stebėjimo laiką (5 val.) visos ląstelės išgyveno; ląsteles panardinus į visų tirtų koncentracijų verapamilo tirpalus, visos ląstelės galiausiai žuvo, tačiau poveikis priklausė nuo koncentracijos. Nustatyta, kad vidutiniškai pusė *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinių ląstelių žūna, veikiamos 0,1 mM koncentracijos verapamilo tirpalu – per  $2,57 \pm 0,63$  val., veikiamos 0,3 mM koncentracijos tirpalu – per  $1,58 \pm 0,2$  val., veikiamos 1 mM koncentracijos verapamilo tirpalu – per 0,25 val (**4.7 pav.**).



**4.7 pav.** *Nitellopsis obtusa* ląstelių gyvybingumo tyrimas, atliktas veikiant jas 0,1 mM, 0,3 mM ir 1 mM koncentracijos verapamilio tirpalais. Kiekviename eksperimente (n=4) tirta po 15 ląstelių, kurių turgoras mechaniškai vertintas kas 30 min. Turgoro praradimas laikytas ląstelių žūtimi. Išgyvenusių ląstelių dalies laikinė priklausomybė aproksimuota Boltzmanno funkcija, siekiant įvertinti laiko trukmę  $t_{1/2}$ , per kurią tam tikrame tirpale žūsta 50 % ląstelių (įklija).

Apibendrinant, 0,1 mM verapamilio koncentracijos poveikis pasireiškė tik kai kuriems nagrinėtiems parametrams, 0,3 mM koncentracijos poveikis buvo reikšmingas, 1 mM koncentracijos citotoksiškas poveikis daugeliu atveju nustelbė specifinius elektrofiziologinius efektus. Verapamilas depoliarizuoja membranos ramybės potencialą ir VP sužadinimo slenktį, bet nekeičia VP amplitudės. Sužadinimo metu tekančių srovių amplitudė taip pat nesikeičia, tačiau srovių dinamika yra paveikiama – tiek šių srovių, tiek ir VP laikinių charakteristikų vertės yra ilginamos.

#### 4.1.2. Tetrandrino poveikio tyrimas

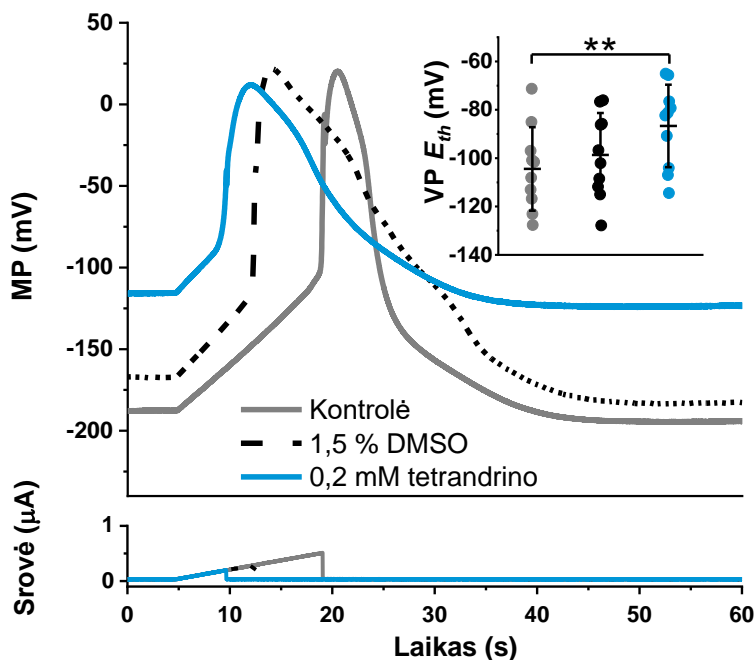
Tetrandrinis (**4.8 pav.**) –  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatorius, priklausantis alkaloidų grupei, išskirtas iš Japonijoje augančio augalo *Stephania tetrandra* S. Moore (Bhagya, Chandrashekar, 2016). Žinoma, kad tetrandrinis blokuoja gyvūnų N- ir T-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  kanalus (Wiegand *et al.*, 1990; Rossier *et al.*, 1993). Dėl savo hidrofobiškumo ši medžiaga buvo tirpiname tirpiklyje DMSO. Pasirinkta tirti 0,1 mM (ištirpinta 0,75 % DMSO) ir 0,2 mM (ištirpinta 1,5 %



**4.2 lentelė.** 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO poveikis elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrams, CC protokolais, n = 10. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su kontrole ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	Tetrandrinas, 0,2 mM	DMSO, 1,5 %
Membranos ramybės potencialas $RP$ (mV)	-197±22	-162±31	-173±22
Membranos laidumas ramybės būsenoje $G_{RP}$ ( $S \cdot m^{-2}$ )	0,37±0,13	0,27±0,1	0,31±0,08
VP sužadavimo slenkstis $E_{th}$ (mV)	-104±17	-87±17	-99±17
VP smailė (mV)	30±15	9±23	10±31
VP amplitudė (mV)	134±14	95±12	109±22
VP depoliarizacijos trukmė $t_{dep}$ (s)	1,4±0,4	1,8±0,6	1,7±0,6
VP repoliarizacijos trukmė $t_{rep}$ (s)	4±1,4	12,9±6	9,4±6,5

Nors 0,2 mM tetrandrino koncentracijos tirpalas iš pažiūros veikė visus pritaikant CC protokolą įvertintus parametrus, jų vertės nesiskyrė nuo verčių, gautų ląsteles paveikus 1,5 % koncentracijos DMSO tirpalu. Vis dėlto, verta paminėti, kad tetrandrino sukelta VP sužadavimo slenkščio  $E_{th}$  depoliarizacija per 10 mV, lyginant su parametru vertė ląsteles paveikus DMSO tirpalu, buvo arti reikšmingumo ribos ( $p = 0,056$ ) (**4.2 lentelė, P2 pav.**).

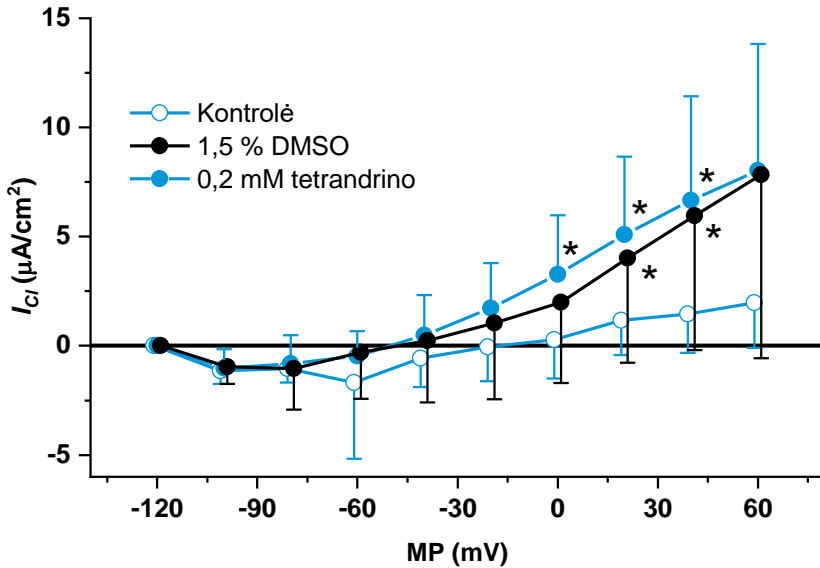


**4.9 pav.** Tipinis 0,2 mM koncentracijos tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % koncentracijos DMSO tirpalų poveikio elektriškai sukeltiems *Nitellopsis obtusa* veikimo potencialams pavyzdys. Įklia rodo veikimo potencialo sužadinimo slenksčio  $E_{th}$  vertes skirtinguose tirpaluose. Žvaigždutės žymi reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp parametro vertės kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio.  $n=10$ .

1,5 % koncentracijos DMSO tirpalo poveikis reikšmingai sumažino VP amplitudę vidutiniškai per 25 mV. Amplitudės vertė buvo dar vidutiniškai 15 mV mažesnė, paveikus 0,2 mM tetrandrino koncentracijos tirpalu, tačiau šis poveikis nesiskyrė nuo DMSO poveikio. Tiek VP depoliarizacijos, tiek ir VP repoliarizacijos trukmės pailgėjo, ląsteles inkubavus 1,5 % koncentracijos DMSO tirpale. Paveikus ląsteles 0,2 mM koncentracijos tetrandrino tirpalu, stebėtas panašus efektas, nors vertės nesiskyrė nuo verčių po inkubacijos 1,5 % koncentracijos DMSO tirpale (**4.2 lentelė, P22 lentelė, P2 pav.**).

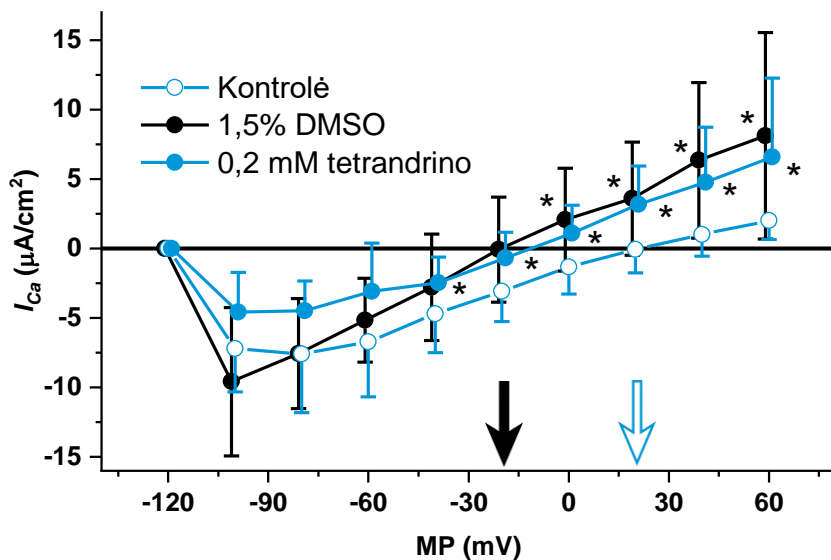
Tiriant tetrandrino poveikį sužadinimo metu tekančių srovių parametrą (VC3 protokolas), ląsteles inkubavus 0,1 mM koncentracijos tetrandrino tirpale ryškesnio poveikio, pasireiškiančio platesniame įtampų intervale, nepastebėta. 0,75 % koncentracijos DMSO tirpalas įtakos šiems parametrąs taip pat neturėjo (**lentelės P23-P29, P3-P9 pav.**).





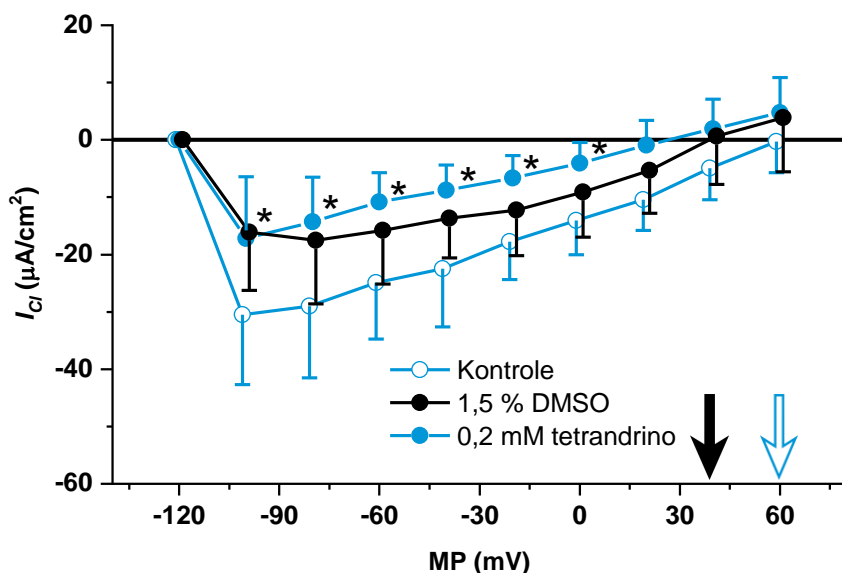
**4.10 pav.** Voltamperinės  $K^+$  srovių  $I_K$ , tekančių per *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranas sužadinimo metu, charakteristikos – kontrolinėmis sąlygomis ir tas pačias ląsteles 30 min. paveikus 0,2 mM koncentracijos tetrandrino bei jo tirpiklio 1,5 % koncentracijos DMSO tirpalais. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus ( $p < 0,05$ ) tarp parametro verčių kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio.  $n=11$ .

Vertinant 0,2 mM koncentracijos tetrandrino ir 1,5 % koncentracijos DMSO tirpalų poveikį sužadinimo metu tekančioms srovėms, nenustatyta skirtumų, kuriuos vienareikšmiškai būtų galima priskirti tetrandrino poveikiui. DMSO lėmė  $K^+$  srovių  $I_K$ , amplitudės išaugimą ties 20 mV ir 40 mV MP, tetrandrinas poveikio neturėjo (**P36 lentelė, 4.10 ir P9 pav.**). Panaši tendencija stebėta vertinant ir nuotėkio srovės  $I_{leak}$  (**P30 lentelė, P3 pav.**).



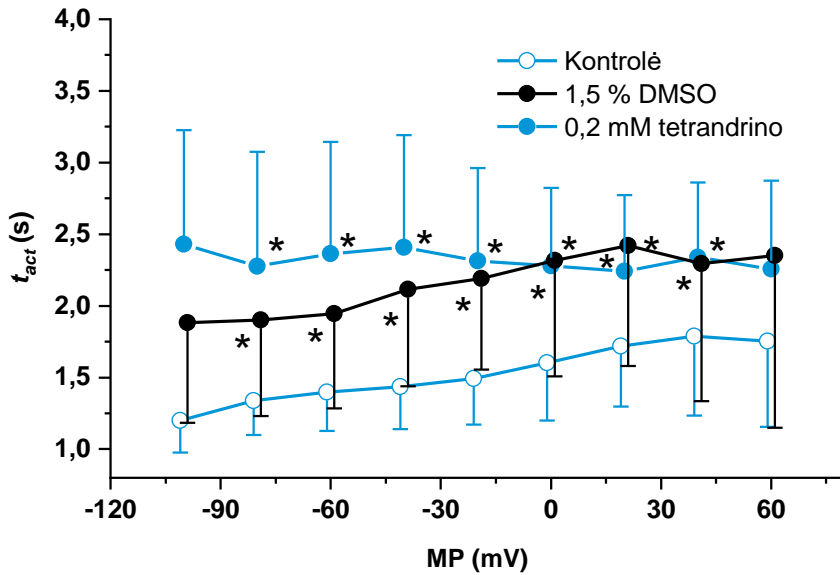
**4.11 pav.** Voltamperinės  $\text{Ca}^{2+}$  srovių  $I_{Ca}$ , tekančių per *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranas sužadinimo metu, charakteristikos – kontrolinėmis sąlygomis ir tas pačias ląsteles 30 min. paveikus 0,2 mM koncentracijos tetrandrino bei jo tirpiklio 1,5 % koncentracijos DMSO tirpalais. Srovės reversijos potencialas (pažymėta rodyklėmis) pasislinko. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus ( $p < 0,05$ ) tarp parametro verčių kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio.  $n=11$ .

Ryškesnis poveikis platesniame įtampų intervale buvo stebėtas vertinant  $\text{Ca}^{2+}$  ir  $\text{Cl}^-$  srovių amplitudes bei  $\text{Cl}^-$  srovės laikines charakteristikas.



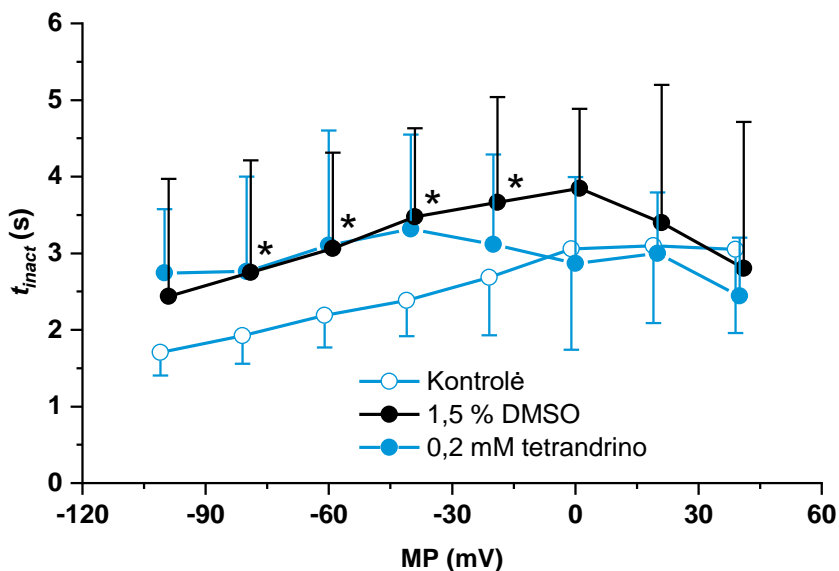
**4.12 pav.** Voltamperinės  $\text{Cl}^-$  srovių  $I_{\text{Cl}}$ , tekančių per *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranas sužadavimo metu, charakteristikos – kontrolinėmis sąlygomis ir tas pačias ląsteles 30 min. paveikus 0,2 mM koncentracijos tetrandrino bei jo tirpiklio 1,5 % koncentracijos DMSO tirpalais. Srovės reversijos potencialas (pažymėta rodyklėmis) pasislinko. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus ( $p < 0,05$ ) tarp parametro verčių kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio.  $n=11$ .

Po ląstelių inkubacijos 1,5 % koncentracijos DMSO tirpale,  $\text{Ca}^{2+}$  srovės  $I_{\text{Ca}}$ ,  $\text{Cl}^-$  srovės  $I_{\text{Cl}}$  bei jų suminės srovės  $I_{\text{CaCl}}$  voltamperinės charakteristikos buvo pasislinkusios link neigiamesnių MP verčių. Skirtumų tarp tetrandrino ir DMSO poveikio nustačius (P31-P33 lentelės, 4.11-4.12 pav., P4-P6 pav.). Analogiškai,  $I_{\text{Cl}}$  aktyvacijos trukmės  $t_{\text{act}}$  pailgėjo, paveikus ląsteles DMSO tirpalu, bet tetrandrino poveikio nustatyta nebuvo (P34 lentelė, 4.13 pav., P7 pav.).



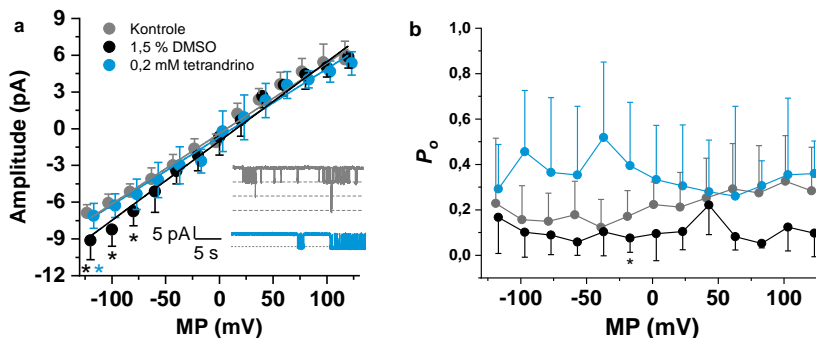
**4.13 pav.** Sužadavimo metu per *Nitellopsis obtusa* membranas tekančios  $\text{Cl}^-$  srovės  $I_{\text{Cl}}$  aktyvacijos trukmių  $t_{\text{act}}$  priklausomybė nuo membranos potencialo (MP) kontrolinėmis sąlygomis ir tas pačias ląsteles 30 min. paveikus 0,2 mM koncentracijos tetrandrino bei jo tirpiklio 1,5 % koncentracijos DMSO tirpalais. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus ( $p < 0,05$ ) tarp parametro verčių kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio.  $n=11$ .

1,5 %, koncentracijos DMSO tirpalas, bet ne 0,2 mM koncentracijos tetrandrino tirpalas taip pat ilgino inaktyvacijos laikų trukmes  $t_{\text{inact}}$  MP ruože nuo -80 mV iki -20 mV (**P35 lentelė, 4.14 pav., P8 pav.**).



**4.14 pav.** Sužadavimo metu per *Nitellopsis obtusa* membranas tekančios  $\text{Cl}^-$  srovės  $I_{\text{Cl}}$  inaktyvacijos trukmių  $t_{\text{inact}}$  priklausomybė nuo membranos potencialo (MP) kontrolinėmis sąlygomis ir tas pačias ląsteles 30 min. paveikus 0,2 mM koncentracijos tetrandrino bei jo tirpiklio 1,5 % koncentracijos DMSO tirpalais. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus ( $p < 0,05$ ) tarp parametro verčių kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio.  $n=11$ .

„Patch clamp“ metodu tiriant citoplazminių lašų membranos jonų kanalų aktyvumą, nustatyta, kad 1,5 % koncentracijos DMSO tirpalas didina šių srovių amplitudes ties neigiamiausiomis tirtomis įtampomis (nuo -80 mV). 0,2 mM koncentracijos tetrandrino tirpalas sumažino srovės amplitudę ties -120 mV. Šių kanalų laidumo, sprendžiant iš voltamperinių charakteristikų tiesinių regresijų, nepakeitė nei tetrandrinas, nei DMSO. Aptikta, kad DMSO sumažina kanalų atsidarymo tikimybę  $P_o$  ties -20 mV, tetrandrinas poveikio neturi (**4.15 pav.**, **P10-P11 pav.**).

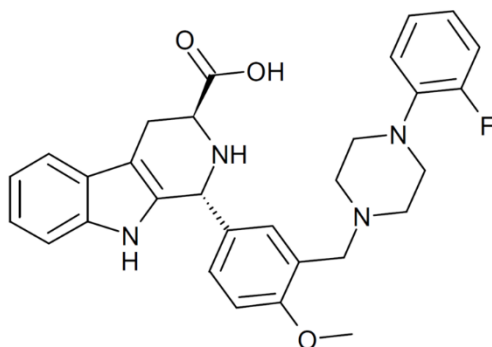


**4.15 pav.** 0,2 mM koncentracijos tetrandrino bei jo tirpiklio 1,5 % koncentracijos DMSO tirpalų poveikis citoplazminių lašų membranų  $K^+$  kanalų aktyvumui: srovių, tekančių per pavienius kanalus (a) ir kanalų atsidarymo tikimybėms (b), palaikant tam tikrą įtampą. Įklija kairėje rodo tipinį kanalų aktyvumą, palaikant -80 mV įtampą. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus ( $p < 0,05$ ) tarp parametro verčių skirtingomis sąlygomis.  $n=5-9$ .

Apibendrinant, negalima teigti, kad tetrandrinas veikia tirtus elektrofiziologinius parametrus: tokį patį poveikį sukėlė tetrandrino tirpiklis DMSO. DMSO (1,5 %) mažina VP amplitudę, ilgina VP depoliarizacijos ir repoliarizacijos trukmes, sužadinimo metu tekančių srovių laikinių charakteristikų vertės analogiškai pailgėja. Taip pat pastebėta, kad DMSO padidina sužadinimo metu tekančių  $K^+$  srovių amplitudes bei paslenka  $Ca^{2+}$  ir  $Cl^-$  srovių reversijos potencialus link neigiamesnių MP verčių.

#### 4.1.3. NED-19 poveikio tyrimas

NED-19 (**4.16 pav.**) – rečiau taikomas policiklinis  $Ca^{2+}$  kanalų blokatorius (Kintzer, Stroud, 2016). Pasirinkta tirti 50  $\mu M$  ir 75  $\mu M$  NED-19 koncentracijų tirpalų poveikį įvairiems tarpubamblinių *Nitellopsis obtusa* ląstelių elektrogenezės parametrams. Nors NED-19 buvo tirpintas DMSO, naudotos šio tirpiklio koncentracijos (<0,15%) buvo tokios mažos, kad į galimą DMSO poveikį nebuvo atsižvelgta.



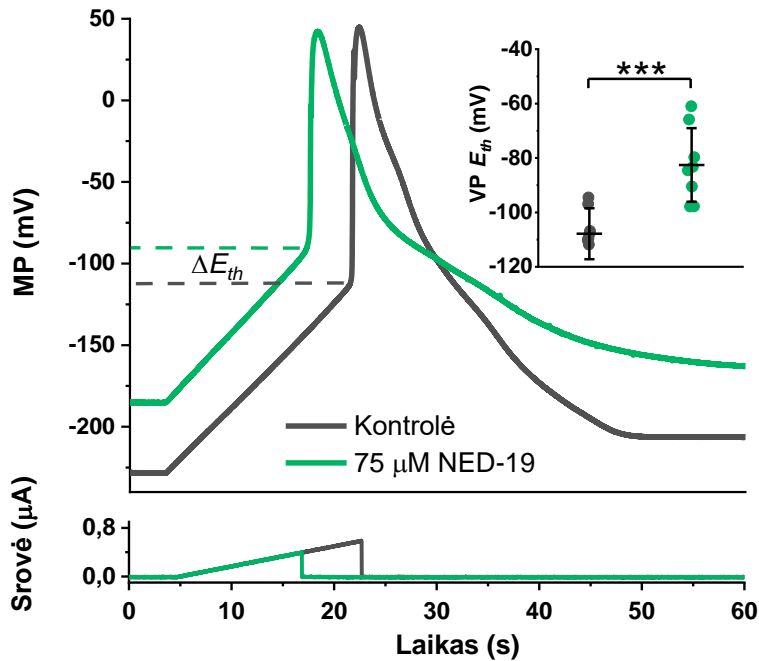
#### 4.16 pav. NED-19 struktūrinė formulė

Taikant fiksuotos srovės metodą (CC protokolas), 50  $\mu\text{M}$  koncentracijos NED-19 tirpalo poveikis elektrofiziologiniams parametrams nenustatytas (**P37 lentelė**), tačiau 75  $\mu\text{M}$  koncentracijos jau užteko, kad kai kurie parametrai būtų reikšmingai paveikti (**4.3 lentelė**, **4.17 pav.**). Po 30 min inkubacijos pastebėta, kad 75  $\mu\text{M}$  koncentracijos NED-19 tirpalas daugiau nei 30 mV depoliarizuoja membranos ramybės potencialą, nors membranos laidumo ramybės būsenoje ir neveikia. 75  $\mu\text{M}$  koncentracijos NED-19 tirpalas taip pat depoliarizavo VP sužadinimo slenkstį vidutiniškai per 25 mV, tai lėmė ir reikšmingą VP amplitudės sumažėjimą. Nors VP depoliarizacijos trukmė reikšmingai nepailgėjo, repoliarizacijos trukmę 75  $\mu\text{M}$  koncentracijos NED-19 tirpalo poveikis pailgino daugiau nei trečdaliu.

**4.3 lentelė.** 75  $\mu\text{M}$  NED-19 poveikis elektrinių *Nitelloopsis obtusa* signalų parametrams, CC protokolas, n = 8. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ).

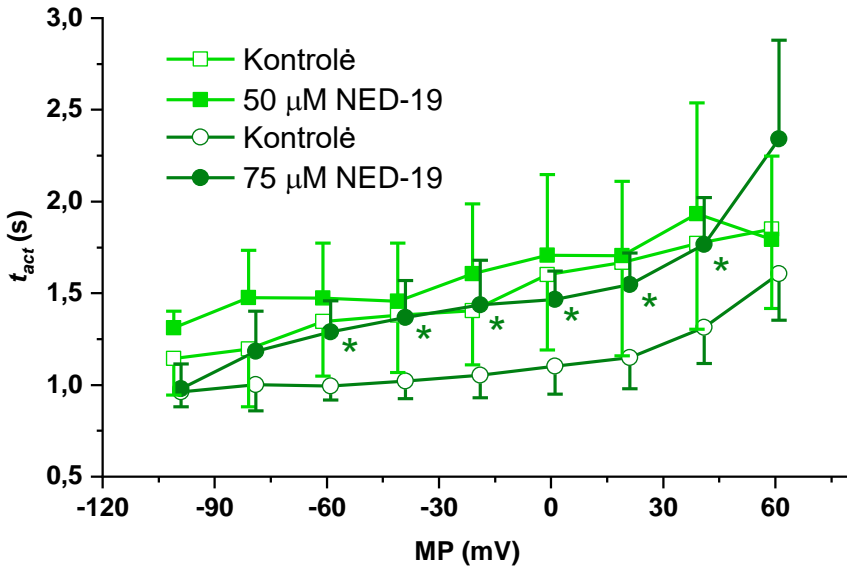
	Kontrolė	NED-19, 75 $\mu\text{M}$	p
Membranos ramybės potencialas $R_P$ (mV)	-201 $\pm$ 16	-176 $\pm$ 15	0,005 T
Membranos laidumas ramybės būsenoje $G_{RP}$ ( $\text{S} \cdot \text{m}^{-2}$ )	0,35 $\pm$ 0,06	0,33 $\pm$ 0,08	0,307 T
VP sužadavimo slenkstis $E_{th}$ (mV)	-108 $\pm$ 9	-83 $\pm$ 14	<0,001 T
VP smailė (mV)	35 $\pm$ 10	31 $\pm$ 16	0,337 T
VP amplitudė (mV)	143 $\pm$ 10	114 $\pm$ 21	0,008 W
VP depoliarizacijos trukmė $t_{dep}$ (s)	1,1 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	0,055 W
VP repoliarizacijos trukmė $t_{rep}$ (s)	4,3 $\pm$ 1,5	6,2 $\pm$ 1,7	0,001 T





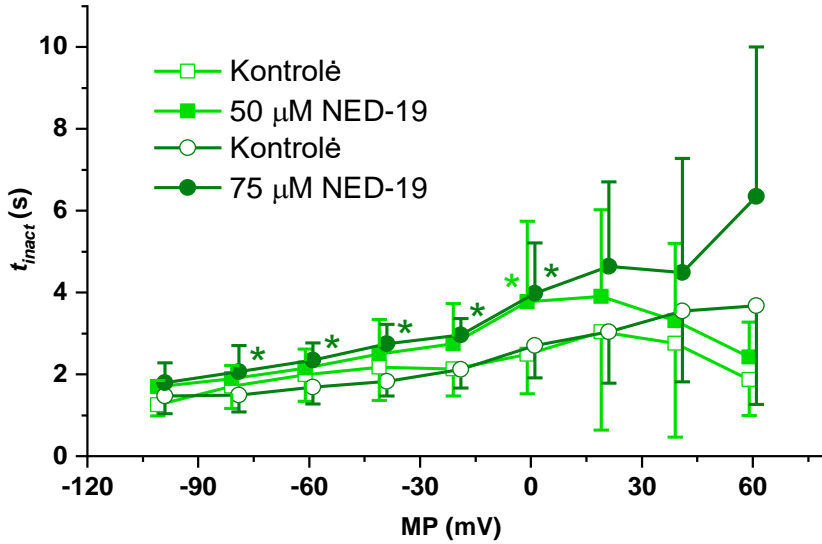
**4.17 pav.** Tipinis 75  $\mu\text{M}$  koncentracijos NED-19 tirpalo poveikio elektriškai sukeltiems *Nitellopsis obtusa* veikimo potencialams pavyzdys. Įklija rodo veikimo potencialo sužadavimo slenksčio  $E_{th}$  vertės skirtinguose tirpaluose. Žvaigždutės žymi reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp parametro vertės kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio.  $n=8$ .

Tiriant NED-19 poveikį fiksuotos įtampos metodu, taikytas VC3 protokolas. Reikšmingesnio poveikio sužadimo metu tekančių srovių amplitudėms platesniame įtampų intervale, ląsteles veikiant 50  $\mu\text{M}$  ar 75  $\mu\text{M}$  NED-19 koncentracijų tirpalais, nepastebėta (**lentelės P39-P41, P44, P46-P48, P51**). Nors įtampų ruože nuo 20 mV iki 60 mV mažesniosios koncentracijos tirpalas sumažino nuotėkio srovės  $I_{leak}$  amplitudes (**P38 lentelė**), didesniosios koncentracijos poveikis nebuvo reikšmingas (**P45 lentelė**).



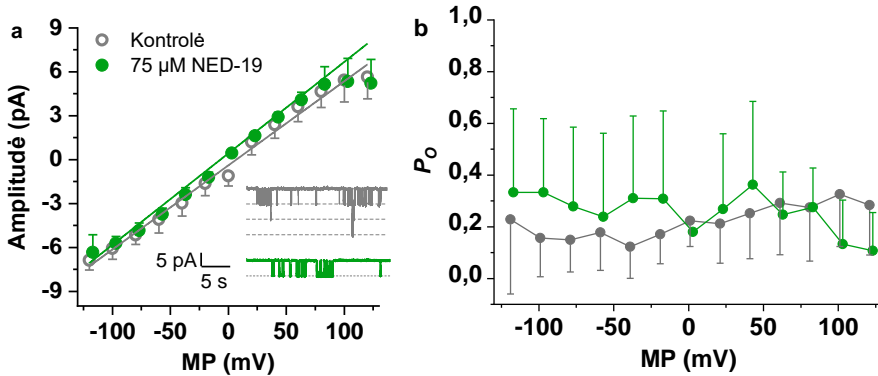
**4.18 pav.** Sužadavimo metu per *Nitellopsis obtusa* membranas tekančios  $\text{Cl}^-$  srovės  $I_{\text{Cl}}$  aktyvacijos trukmių  $t_{\text{act}}$  priklausomybė nuo membranos potencialo (MP) kontrolinėmis sąlygomis bei 30 min. paveikus 50  $\mu\text{M}$  ir 75  $\mu\text{M}$  koncentracijų NED-19 tirpalais. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus ( $p < 0,05$ ) tarp parametro verčių kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio.  $n=8$ .

50  $\mu\text{M}$  NED-19 tirpalo koncentracijos buvo per maža, kad paveiktų sužadavimo metu tekančių srovių dinamiką (**lentelės P42-P43, pav. 4.18-4.19**), bet 30 min. inkubavus ląsteles 75  $\mu\text{M}$  koncentracijos NED-19 tirpale, stebėtas reikšmingas poveikis.  $I_{\text{Cl}}$  srovės aktyvacijos trukmės  $t_{\text{act}}$  pailgėjo įtampų intervale nuo -60 mV iki 40 mV maždaug 30 % (**P49 lentelė, 4.18 pav.**), inaktyvacijos trukmės  $t_{\text{inact}}$  pailgėjo irgi po vidutiniškai 30 % MP intervale nuo -80 mV iki 20 mV (**P50 lentelė, 4.19 pav.**).



**4.19 pav.** Sužadavimo metu per *Nitellopsis obtusa* membranas tekančios  $\text{Cl}^-$  srovės  $I_{\text{Cl}}$  inaktyvacijos trukmių  $t_{\text{inact}}$  priklausomybė nuo membranos potencialo (MP) kontrolinėmis sąlygomis bei 30 min. paveikus 50  $\mu\text{M}$  ir 75  $\mu\text{M}$  koncentracijų NED-19 tirpalais. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus ( $p < 0,05$ ) tarp parametro verčių kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio.  $n=8$ .

„Patch clamp“ metodu tiriant citoplazminių lašų membranos jonų kanalų aktyvumą, neaptiktas 75  $\mu\text{M}$  koncentracijos NED-19 tirpalo poveikio nei per  $\text{K}^+$  kanalus tekančių srovių amplitudėms, nei atsidarymo tikimybėms. Kanalų laidumas, sprendžiant iš voltamperinių charakteristikų tiesinių regresijų, taip pat nepakito (**4.20 pav.**)



**4.20 pav.** 75  $\mu\text{M}$  koncentracijos NED-19 tirpalo poveikis citoplazminių lašų membranų  $\text{K}^+$  kanalų aktyvumui: srovių, tekančių per pavienius kanalus (a) ir kanalų atsidarymo tikimybėms (b), palaikant tam tikrą įtampą. Įklia kairėje rodo tipinį kanalų aktyvumą, palaikant  $-80$  mV įtampą.  $n=8-9$ .

Apibendrinant, nors 50  $\mu\text{M}$  NED-19 koncentracija buvo per maža sukelti reikšmingesnių nagrinėtų elektrofiziologinių parametru pokyčių, bet 75  $\mu\text{M}$  NED-19 koncentracijos tirpalo poveikis jau buvo reikšmingas: nustatyta, kad ši medžiaga depoliarizuoja membranos ramybės potencialą bei VP sužadinimo slenksį, tokiu būdu sumažindama VP amplitudę. Taip pat stebėtas ilginantis poveikis VP ir sužadinimo metu tekančių srovių laikinių charakteristikų vertėms.

#### 4.1.4. Lantano poveikio tyrimas

$\text{La}^{3+}$  jonai dažnai taikomi elektrofiziologiniuose tyrimuose kaip  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatoriai. Nors toks kanalų blokavimas nėra specifinis,  $\text{La}^{3+}$  vis tiek dažnai pasitelkiamas siekiant blokuoti  $\text{Ca}^{2+}$  sroves augalų ląstelėse (Tsutsui *et al.*, 1987a; Scherzer, Böhm, *et al.*, 2022), tačiau šio blokatoriaus poveikis VP sužadinimo slenksčio vertėms kol kas nežinomas. Pasirinkta nustatyti 0,5 mM  $\text{LaCl}_3$  koncentracijos poveikį šiam bei kitiems su *Nitellopsis obtusa* elektrogeneze susijusiems parametrams.

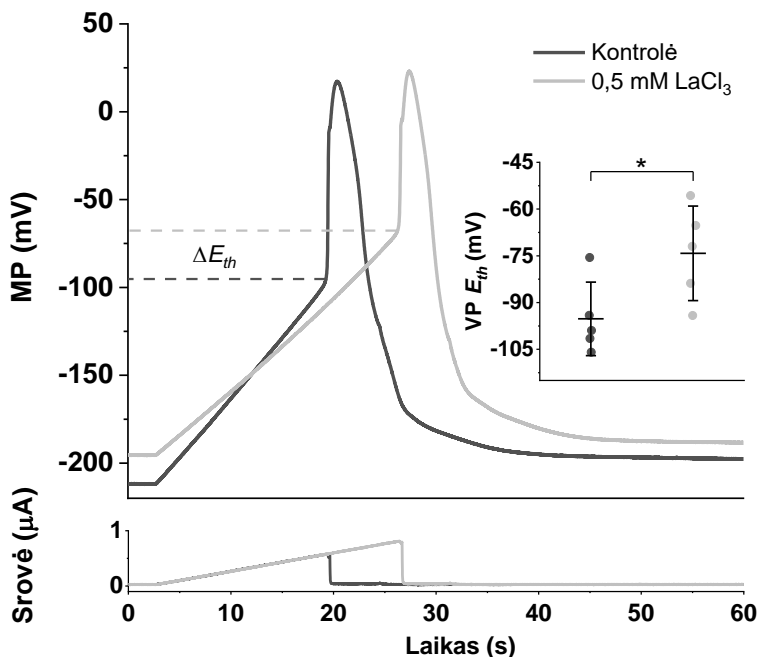
30 min. paveikus *Nitellopsis obtusa* ląsteles 0,5 mM koncentracijos  $\text{LaCl}_3$  tirpalu, sumažėjo maksimalus membranos laidumas sužadinimo metu  $G_{max}$  ir VP amplitudė. VP smailės vertė nepakito, bet stebėta reikšminga VP sužadinimo slenksčio depoliarizacija vidutiniškai per 20 mV. Visi kiti nagrinėti parametrai, įskaitant membranos ramybės potencialą, reikšmingai nekito (**4.4 lentelė**, **4.21 pav.**). Tai leidžia  $\text{La}^{3+}$  jonus laikyti specifiskesniais *N. obtusa*  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatoriais nei verapamilas, tetrandrinas ir NED-19.

Keleto eksperimentų metu  $\text{La}^{3+}$  paveiktos ląstelės buvo grąžintos į kontrolinį tirpalą.  $\text{La}^{3+}$  poveikis ne tik nebuvo grįžtamas, bet suintensyvėjo,

kelios ląstelės visiškai prarado sužadinamumą. Tai leidžia spręsti apie stiprią sąveiką tarp blokatoriaus ir jo taikinio.

**4.4 lentelė.** 0,5 mM LaCl<sub>3</sub> poveikis elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrams, taikyti CC, VC1 ir VC2 protokolai, n = 5-6. Pateikti verčių vidurkiai ± SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai (p<0,05).

	Kontrolė	0,5 mM LaCl <sub>3</sub>	p
Membranos ramybės potencialas $RP$ (mV)	-221±21	-217±25	0,479 T
Membranos laidumas ramybės būsenoje $G_{RP}$ (S·m <sup>-2</sup> )	0,31±0,08	0,33±0,08	0,568 T
VP sužadinimo slenkstis $E_{th}$ (mV)	-95±12	-74±15	0,047 T
VP smailė (mV)	18±7	7±22	0,208 T
VP amplitudė (mV)	113±14	81±30	0,045 T
VP depoliarizacijos trukmė $t_{dep}$ (s)	1,4±0,3	1,2±0,1	0,290 T
VP repoliarizacijos trukmė $t_{rep}$ (s)	3,1±0,7	3±0,6	0,748 T
Maksimalus membranų laidumas sužadinimo metu $G_{max}$ (S·m <sup>-2</sup> )	3,4±0,5	2,5±0,7	0,019 T
Membranų laidumas ties -250 mV $G_{-250\text{ mV}}$ (S·m <sup>-2</sup> )	0,35±0,07	0,42±0,10	0,065 T
Membranų laidumas ties 50 mV $G_{50\text{ mV}}$ (S·m <sup>-2</sup> )	0,88±0,25	0,79±0,12	0,438 W
Sužadinimo srovės amplitudė $I_{trans}$ (μA·cm <sup>-2</sup> )	-41±9	-33±10	0,169 T
Sužadinimo srovės aktyvacijos trukmė $t_{act\_trans}$ (s)	1,2±0,2	0,9±0,3	0,179 T
Sužadinimo srovės inaktyvacijos trukmė $t_{inact\_trans}$ (s)	2,2±0,7	2,2±0,6	0,987 T



**4.21 pav.** Tipinis 0,5 mM koncentracijos  $\text{LaCl}_3$  tirpalo poveikio elektriškai sukeltiems *Nitellopsis obtusa* veikimo potencialams pavyzdys. Įklija rodo veikimo potencialo sužadavimo slenksčio  $E_{th}$  vertės skirtinguose tirpaluose. Žvaigždutė žymi reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp parametro vertės kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio.  $n=5$ .

#### 4.2. Inozitolio fosfatų poveikio tyrimas

Žinant, kad inozitolio 1,4,5-trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ) vaidmuo augalų fiziologijoje, ypač elektrinių signalų generavimo metu, dar nėra aiškus, nutarta įvertinti, kaip ši potenciali antrinė signalinė molekulė veikia *Nitellopsis obtusa* elektrinių signalų parametrus. Tam taip pat pasitelktas fosfolipazės C (PLC), sintetinančios  $\text{IP}_3$ , blokatorius U73122. Galiausiai, tikrinta hipotezė, kad  $\text{IP}_3$  augalų fiziologiniuose procesuose gali pakeisti kitas inozitolio fosfatas –  $\text{IP}_6$ . Kitaip nei tiriant  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatorius, šių tyrimų metu nuspręsta taip pat atkreipti dėmesį, ar tirtų potencialiai aktyvuojančių medžiagų poveikis yra grįžtamas, nes tik tokie aktyvatoriai galėtų atlikti fiziologinę antrinių signalinių molekulių funkciją.

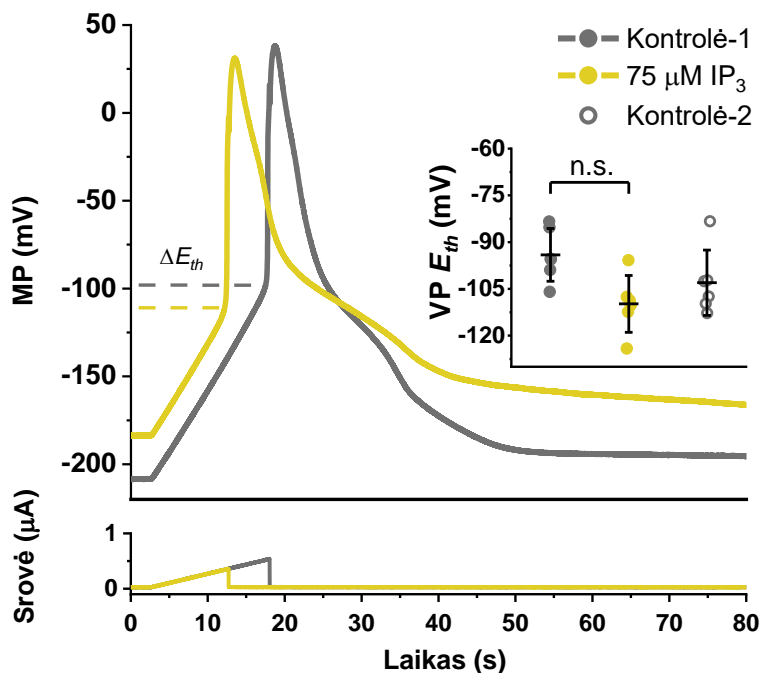
#### 4.2.1. Inozitolio 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) poveikio tyrimas

Pasirinkta tirti 75  $\mu\text{M}$  ir 150  $\mu\text{M}$  inozitolio 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) koncentracijų bei 25  $\mu\text{M}$  fosfolipazės C (PLC) blokatoriaus U73122 poveikį įvairiems su *Nitellopsis obtusa* elektrogeneze susijusiems parametrams.

**4.5 lentelė.** 75  $\mu\text{M}$  inozitolio 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) poveikis elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrams, taikyti CC, VC1 ir VC2 protokolai, n = 6-8. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su Kontrolė-1 ( $p < 0,05$ ). Pabrauktos vertės, rodančios statistiškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp IP<sub>3</sub> ir Kontrolės-2 grupių.

	Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> , 75 $\mu\text{M}$	Kontrolė-2
Membranos ramybės potencialas $R_P$ (mV)	-229 $\pm$ 12	-221 $\pm$ 22	-215 $\pm$ 22
Membranos laidumas ramybės būsenoje $G_{RP}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	0,32 $\pm$ 0,07	0,32 $\pm$ 0,08	0,35 $\pm$ 0,07
VP sužadavimo slenkstis $E_{th}$ (mV)	-94 $\pm$ 8	-110 $\pm$ 9	-103 $\pm$ 10
VP smailė (mV)	31 $\pm$ 12	19 $\pm$ 15	34 $\pm$ 11
VP amplitudė (mV)	125 $\pm$ 15	<u>128<math>\pm</math>14</u>	<u>137<math>\pm</math>12</u>
VP depoliarizacijos trukmė $t_{dep}$ (s)	1,2 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,1
VP repoliarizacijos trukmė $t_{rep}$ (s)	3,1 $\pm$ 0,5	3,4 $\pm$ 0,7	2,9 $\pm$ 0,5
Maksimalus membranos laidumas sužadavimo metu $G_{max}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	5 $\pm$ 1,9	4,8 $\pm$ 1,8	5,5 $\pm$ 2,2
Membranos laidumas ties -250 mV $G_{-250\text{ mV}}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	0,36 $\pm$ 0,07	0,35 $\pm$ 0,08	0,37 $\pm$ 0,07
Membranos laidumas ties 50 mV $G_{50\text{ mV}}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	1,06 $\pm$ 0,24	1,18 $\pm$ 0,32	1,08 $\pm$ 0,17
Sužadavimo srovės amplitudė $I_{trans}$ ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-56 $\pm$ 16	-60 $\pm$ 19	-63 $\pm$ 12
Sužadavimo srovės aktyvacijos trukmė $t_{act\_trans}$ (s)	0,9 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,4	1 $\pm$ 0,3
Sužadavimo srovės inaktyvacijos trukmė $t_{inact\_trans}$ (s)	1,6 $\pm$ 0,5	1,7 $\pm$ 0,7	1,6 $\pm$ 0,6

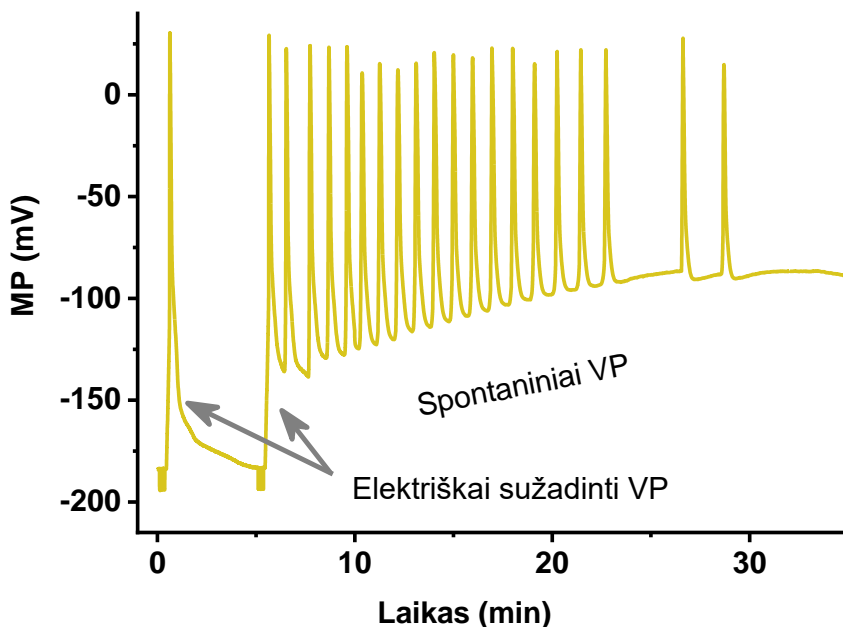
Vertinant abiejų koncentracijų IP<sub>3</sub> tirpalų poveikį, neaptikta, kad ši medžiaga keistų elektrinių signalų parametrus, nestebėta ir tikėtina priklausomybė nuo koncentracijos (4.5 lentelė, P52 lentelė, 4.22 pav., P13 pav.).



**4.22 pav.** Tipinis 75 µM koncentracijos inozitolio 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) tirpalo poveikio elektrškai sukeltiems *Nitellopsis obtusa* veikimo potencialams pavyzdys. Įklija rodo veikimo potencialo sužadavimo slenksčio  $E_{th}$  vertes skirtinguose tirpaluose. n=6.

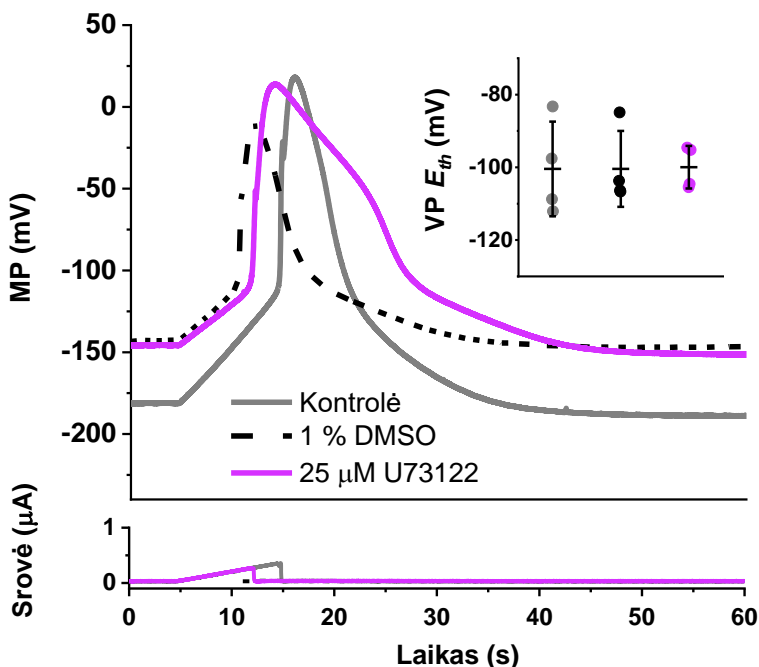
Vis dėlto, verta paminėti, kad kai kurių ląstelių VP sužadavimo slenksčio vertės po inkubacijos IP<sub>3</sub> tirpale buvo hiperpolarizuotos, tačiau poveikis nebuvo statistiškai reikšmingas ( $p = 0,072$ ). Nors kontrolinėmis sąlygomis *Nitellopsis obtusa* ląstelės beveik niekada negeneruoja spontaninių veikimo potencialų, po inkubacijos 75 µM koncentracijos IP<sub>3</sub> tirpale 1 ląstelė iš 9 bei po inkubacijos 150 µM koncentracijos IP<sub>3</sub> tirpale 1 ląstelė iš 4 generavo spontaninių VP sekas (4.23 pav.).





**4.23 pav.** Po 30 min. tarpubamblinių *Nitellopsis obtusa* ląstelių inkubacijos 75  $\mu\text{M}$  koncentracijos inozitolio 1,4,5-trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ) tirpale ir elektriškai sugeneruoto VP stebėta spontaninių VP seka.

Vertinant 25  $\mu\text{M}$  koncentracijos fosfolipazės C (PLC) blokatoriaus U73122 tirpalo poveikį *Nitellopsis obtusa* elektrinių signalų parametrams atsižvelgta, kad ši medžiaga tirpinta 1 % koncentracijos DMSO tirpale. Nors iš pirmo žvilgsnio U73122 depoliarizavo membranos ramybės potencialą vidutiniškai per 30 mV, šį parametą depoliarizavo ir DMSO, reikšmingo skirtumo tarp abiejų poveikių nenustatyta (**P53 lentelė, 4.24 pav., P14 pav.**). Taikant fiksuotos įtampos metodo VC2 protokolą taip pat įvertinta, kad 1 % DMSO reikšmingai sumažino sužadavimo metu tekančios srovės amplitudes vidutiniškai 30 %.



**4.24 pav.** Tipinis 25  $\mu\text{M}$  koncentracijos fosfolipazės C blokatoriaus U73122 ir jo tirpiklio 1 % koncentracijos DMSO tirpalų poveikio elektriškai sukeltiems *Nitellopsis obtusa* veikimo potencialams pavyzdys. Įklia rodo veikimo potencialo sužadavimo slenksčio  $E_{th}$  vertes skirtinguose tirpaluose.  $n=4$ .

Apibendrinant, nepaisant stebėtų tendencijų (kai kurių ląstelių VP sužadavimo slenksčio hiperpolarizacija, kartais stebėtas spontaninis aktyvumas), rezultatai neleidžia patvirtinti, kad  $\text{IP}_3$  yra bioaktyvi medžiaga, susijusi su *Nitellopsis obtusa* elektrinių signalų generavimu.

#### 4.2.2. Inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikio tyrimas

Pasirinkta tirti 75  $\mu\text{M}$  ir 150  $\mu\text{M}$  inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) koncentracijų tirpalų poveikį įvairiems su *Nitellopsis obtusa* elektrogeneze susijusiems parametrams.

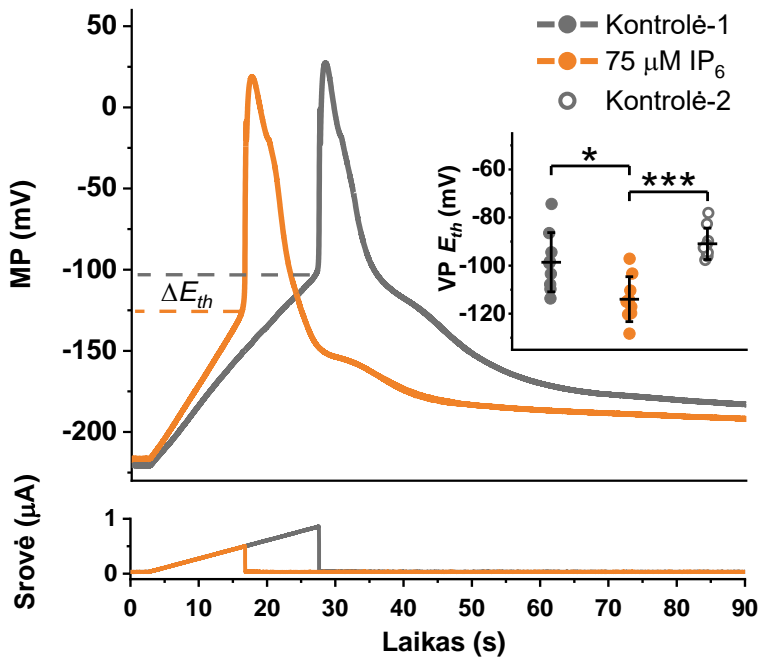
Pastebėta, kad abi naudotos  $\text{IP}_6$  koncentracijos, priešingai nei tokios pačios  $\text{IP}_3$  koncentracijos, reikšmingai hiperpolarizuoja VP sužadavimo slenksčio vertę: 75  $\mu\text{M}$  vidutiniškai 15 mV, 150  $\mu\text{M}$  – beveik 40 mV, abiem atvejais  $\text{IP}_6$  poveikis buvo grįžtamas (4.6 lentelė, 4.7 lentelė, 4.27 pav., P15 pav.)

**4.6 lentelė.** 75  $\mu\text{M}$  inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikis elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrų, taikytas CC protokolas,  $n = 9$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su Kontrolė-1 ( $p < 0,05$ ). Pabrauktos vertės, rodančios statistiškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp  $\text{IP}_6$  ir Kontrolės-2 grupių.

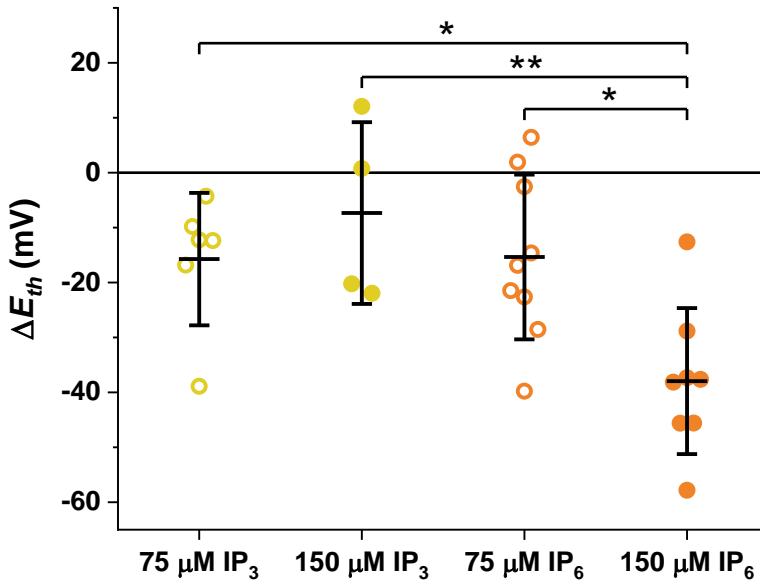
	Kontrolė-1	$\text{IP}_6$ , 75 $\mu\text{M}$	Kontrolė-2
Membranos ramybės potencialas $RP$ (mV)	-222 $\pm$ 17	-215 $\pm$ 17	-216 $\pm$ 18
Membranos laidumas ramybės būsenoje $G_{RP}$ ( $\text{S} \cdot \text{m}^{-2}$ )	0,57 $\pm$ 0,34	0,6 $\pm$ 0,44	0,48 $\pm$ 0,25
VP sužadavimo slenkstis $E_{th}$ (mV)	-99 $\pm$ 12	<u>-114<math>\pm</math>9</u>	-91 $\pm$ 7
VP smailė (mV)	29 $\pm$ 7	<u>20<math>\pm</math>13</u>	31 $\pm$ 16
VP amplitudė (mV)	128 $\pm$ 17	<u>135<math>\pm</math>14</u>	122 $\pm$ 15
VP depoliarizacijos trukmė $t_{dep}$ (s)	1,3 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,2
VP repoliarizacijos trukmė $t_{rep}$ (s)	3,6 $\pm$ 1,3	<u>4,2<math>\pm</math>1,2</u>	3,3 $\pm$ 0,9

**4.7 lentelė.** 150  $\mu\text{M}$  inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikis elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrams, taikyti CC, VC1 ir VC2 protokolai,  $n = 4-8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistškai reikšmingi skirtumai, palyginus su Kontrolė-1 ( $p < 0,05$ ). Pabrauktos vertės, rodančios statistškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp  $\text{IP}_6$  ir Kontrolės-2 grupių.

	Kontrolė-1	150 $\mu\text{M}$ $\text{IP}_6$	Kontrolė-2
Membranos rambybės potencialas $RP$ (mV)	-206 $\pm$ 19	-195 $\pm$ 31	-180 $\pm$ 35
Membranos laidumas rambybės būsenoje $G_{RP}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	0,33 $\pm$ 0,1	<u>0,34<math>\pm</math>0,11</u>	0,37 $\pm$ 0,1
VP sužadavimo slenkstis $E_{th}$ (mV)	-96 $\pm$ 5	<u>-133<math>\pm</math>15</u>	-89 $\pm$ 9
VP smailė (mV)	35 $\pm$ 9	<u>13<math>\pm</math>10</u>	37 $\pm$ 11
VP amplitudė (mV)	130 $\pm$ 10	<u>146<math>\pm</math>18</u>	125 $\pm$ 12
VP depoliarizacijos trukmė $t_{dep}$ (s)	1,2 $\pm$ 0,2	<u>1,5<math>\pm</math>0,4</u>	1,3 $\pm$ 0,2
VP repoliarizacijos trukmė $t_{rep}$ (s)	3,6 $\pm$ 1,2	<u>7,2<math>\pm</math>5,1</u>	4,1 $\pm$ 2
Maksimalus membranos laidumas sužadavimo metu $G_{max}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	5,5 $\pm$ 1,2	<u>6,8<math>\pm</math>2,4</u>	4,6 $\pm$ 2,3
Membranos laidumas ties -250 mV $G_{-250\text{mV}}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	0,41 $\pm$ 0,05	0,42 $\pm$ 0,05	0,42 $\pm$ 0,06
Membranos laidumas ties 50 mV $G_{50\text{mV}}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	1,03 $\pm$ 0,16	1,25 $\pm$ 0,37	0,99 $\pm$ 0,27
Sužadavimo srovės amplitudė $I_{trans}$ ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-89 $\pm$ 23	<u>-102<math>\pm</math>36</u>	-65 $\pm$ 34
Sužadavimo srovės aktyvacijos trukmė $t_{act\_trans}$ (s)	1,2 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,4
Sužadavimo srovės inaktyvacijos trukmė $t_{inact\_trans}$ (s)	1,9 $\pm$ 0,8	2,8 $\pm$ 1	2,2 $\pm$ 1



**4.25 pav.** Tipinis 75  $\mu\text{M}$  koncentracijos inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) tirpalo poveikio elektriškai sukeltiems *Nitellopsis obtusa* veikimo potencialams pavyzdys. Įklia rodo veikimo potencialo sužadavimo slenksčio  $E_{th}$  vertes skirtinguose tirpaluose. Žvaigždutės žymi reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp parametro verčių.  $n=9$ .

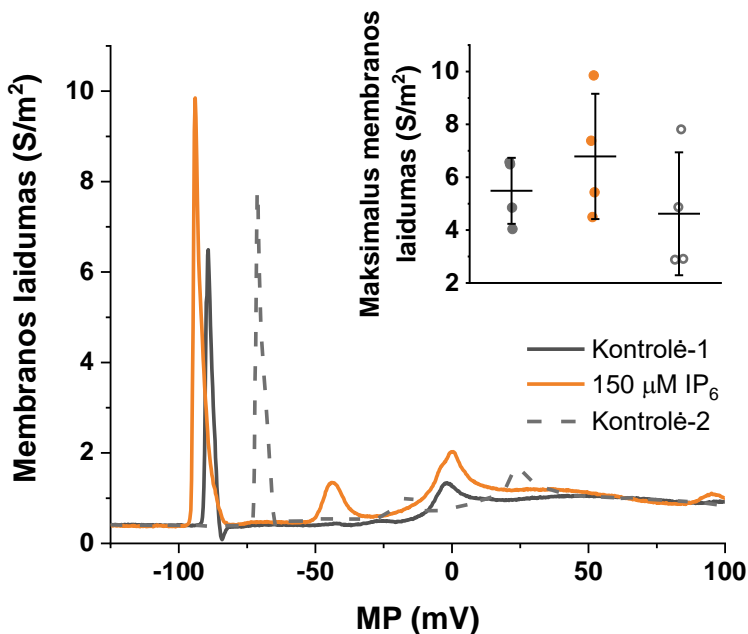


**4.26 pav.** 75  $\mu\text{M}$  ir 150  $\mu\text{M}$  koncentracijų inozitolio 1,4,5-trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ) ir inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikis *Nitellopsis obtusa* veikimo potencialo sužadavimo slenksčio  $E_{th}$  vertei. Vaizduojamas parametro pokytis lyginant su kontrole  $\Delta E_{th}$  (vidurkis  $\pm$  SD), tą pačią ląstelę paveikus norimu tirpalu Žvaigždutės žymi reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp parametro verčių.  $n = 4-9$ .

VP sužadavimo slenksčių  $E_{th}$  150  $\mu\text{M}$  koncentracijos  $\text{IP}_6$  tirpalas hiperpolarizavo vidutiniškai 20 mV daugiau, nei mažesniosios koncentracijos  $\text{IP}_6$  tirpalas ( $p = 0,016$ ), taip pat nei 75  $\mu\text{M}$  koncentracijos  $\text{IP}_3$  tirpalas ( $p = 0,037$ ) ir 150  $\mu\text{M}$  koncentracijos  $\text{IP}_3$  tirpalas ( $p = 0,009$ ) (4.26 pav.).

Nors po inkubacijos 75  $\mu\text{M}$  koncentracijos  $\text{IP}_6$  tirpalu VP smailės vertė tik rodė tendenciją mažėti vidutiniškai per 10 mV, didesniosios koncentracijos tirpalas VP smailės vertę grįžtamai sumažino vidutiniškai per 20 mV. VP amplitudės ir maksimalaus membranos laidumo sužadinimo metu vertės reikšmingai nepasikeitė. Taip pat pastebėta, kad 75  $\mu\text{M}$   $\text{IP}_6$  koncentracija buvo per maža pailginti VP depolarizacijos ir repolarizacijos trukmes, tačiau 150  $\mu\text{M}$   $\text{IP}_6$  koncentracijos tirpalas jau reikšmingai jas pailgino, šis pokytis irgi buvo grįžtamas.

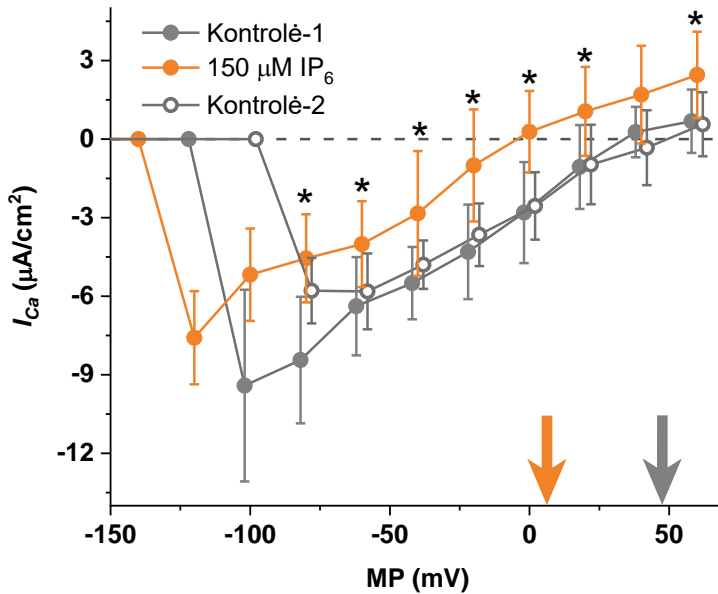
VP amplitudės bei maksimalaus membranos laidumo sužadavimo metu vertės, nors ir rodė tendenciją didėti po IP<sub>6</sub> poveikio, reikšmingai nesiskyrė (4.27 pav.).



**4.27 pav.** Tipinis 75 μM koncentracijos inozitolio heksakisfosfato (IP<sub>6</sub>) tirpalo poveikio *Nitellopsis obtusa* membranos laidumo priklausomybei nuo membranos potencialo (MP) pavyzdys. Įklia rodo maksimalaus membranos laidumo sužadavimo metu  $G_{max}$  vertes skirtinguose tirpaluose. n=4.

Tolesni tyrimai, siekiant įvertinti IP<sub>6</sub> poveikį sužadavimo metu tekančioms srovėms, tęsti pasitelkiant VC3 protokolą. Nei vienas iš pasirinktų IP<sub>6</sub> koncentracijų tirpalų nepaveikė nuotėkio ir K<sup>+</sup> srovių, atitinkamai  $I_{leak}$  ir  $I_K$ , amplitudžių (**lentelės P54, P60-P61, P67, pav. P16 ir pav. P22**).

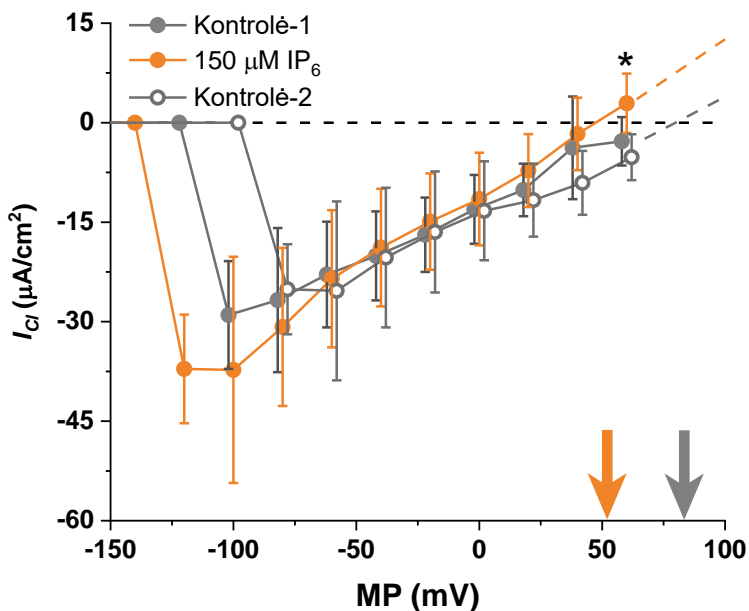
Nors 75 μM IP<sub>6</sub> koncentracijos tirpalo poveikio Ca<sup>2+</sup> srovėms nebuvo nustatyta, 150 μM IP<sub>6</sub> koncentracijos tirpalo poveikis sukėlė Ca<sup>2+</sup> srovių reversijos potencialo pasislinkimą link neigiamesnių MP verčių (**lentelės P55 ir P62, pav. 4.28 ir pav. P17**).



**4.28 pav.** Voltamperinės  $\text{Ca}^{2+}$  srovių  $I_{Ca}$ , tekančių per *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranas sužadavimo metu, charakteristikos – kontrolinėmis sąlygomis ir tas pačias ląsteles 30 min. paveikus  $150 \mu\text{M}$  koncentracijos inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) tirpalais bei ląsteles pakartotinai veikiant kontroliniu tirpalu. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Srovės reversijos potencialas (pažymėta rodyklėmis) pasislinko. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus ( $p < 0,05$ ) tarp parametro verčių kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio.  $n=8$ .

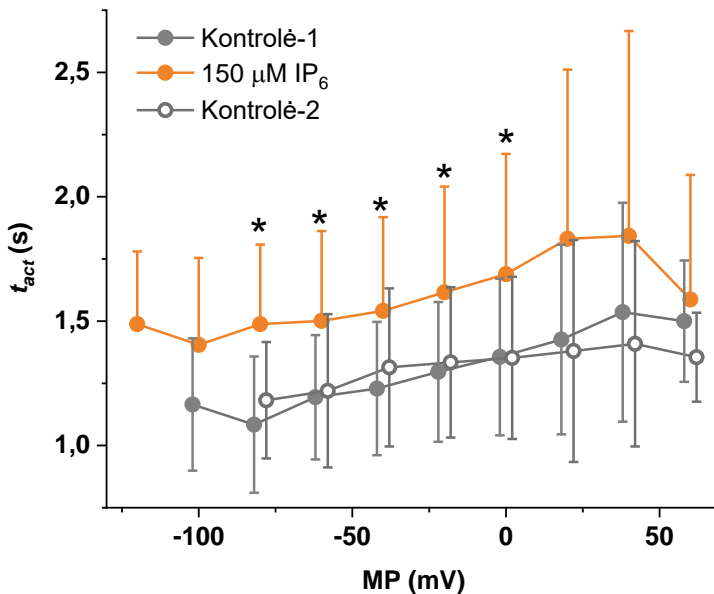
Nors ties kai kuriomis MP vertėmis reikšmingų skirtumų nustatyta vertinant  $\text{Cl}^-$  srovių  $I_{Cl}$  bei suminių  $\text{Ca}^{2+}$  ir  $\text{Cl}^-$  srovių  $I_{CaCl}$  amplitudes, poveikis nebuvo ryškus (lentelės P56-P57 ir P63-P64, pav. 4.29 ir pav. P18-P19).





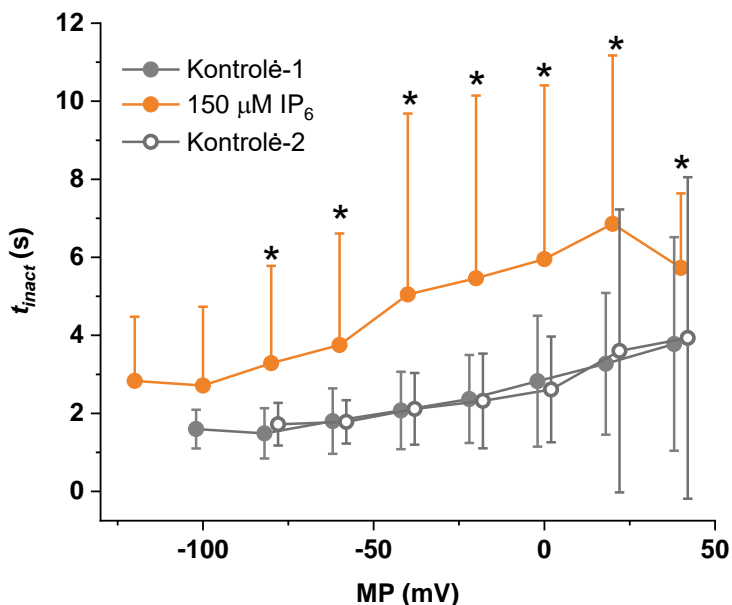
**4.29 pav.** Voltamperinės  $\text{Cl}^-$  srovių  $I_{\text{Cl}}$ , tekančių per *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranas sužadavimo metu, charakteristikos – kontrolinėmis sąlygomis ir tas pačias ląsteles 30 min. paveikus  $150 \mu\text{M}$  koncentracijos inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) tirpalais bei ląsteles pakartotinai veikiant kontroliniu tirpalu. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Srovės reversijos potencialas (pažymėta rodyklėmis) pasislinko. Žvaigždutė žymi reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp parametro verčių kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio.  $n=8$ .

$\text{IP}_6$  poveikis buvo ryškesnis vertinant srovių laikinių parametru pokyčius: nors  $75 \mu\text{M}$   $\text{IP}_6$  koncentracijos įtaka pastebėta tik ties kai kuriomis įtampomis, ląstelių inkubacija didesnės koncentracijos tirpale lėmė sužadavimo metu tekančios srovės  $I_{\text{Cl}}$  aktyvacijos trukmės pailgėjimą MP intervale nuo  $-80 \text{ mV}$  iki  $0 \text{ mV}$ , šis poveikis buvo grįžtamas (**lentelės P58 ir P65, pav. 4.30 ir pav. P20**).



**4.29 pav.** Sužadavimo metu per *Nitellopsis obtusa* membranas tekančios Cl<sup>-</sup> srovės  $I_{Cl}$  aktyvacijos trukmių  $t_{act}$  priklausomybė nuo membranos potencialo (MP) kontrolinėmis sąlygomis bei 30 min. paveikus 150 μM koncentracijos inozitolio heksakisfosfato (IP<sub>6</sub>) tirpalais bei ląsteles pakartotinai veikiant kontroliniu tirpalu. Pateikti verčių vidurkiai ± SD. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus ( $p < 0,05$ ) tarp parametro verčių kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio.  $n=8$ .

Srovės  $I_{Cl}$  inaktyvacijos trukmės  $t_{inact}$  taip pat pakito, ląsteles inkubavus IP<sub>6</sub> tirpaluose – po inkubacijos 150 μM IP<sub>6</sub> koncentracijos tirpale stebėtas maždaug dvigubas jų grįžtamas pailgėjimas MP intervale nuo -60 mV iki 40 mV (lentelės P59 ir P66, pav. 4.31 ir pav. P21).



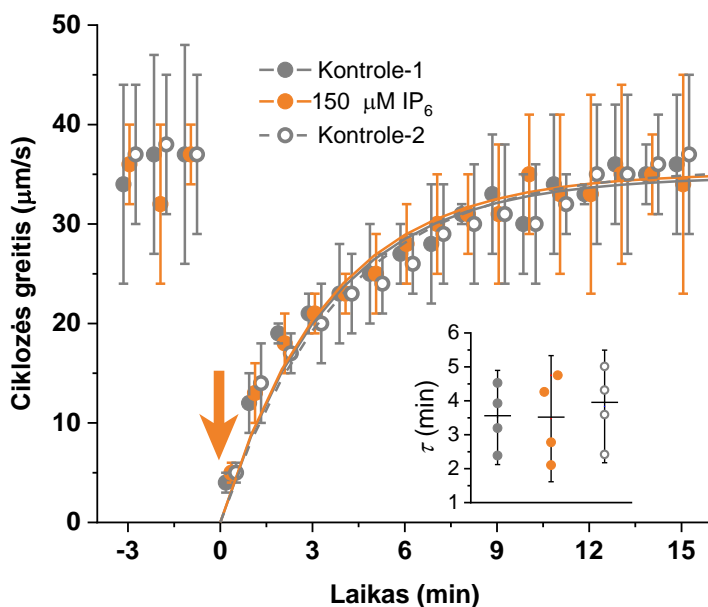
**4.31 pav.** Sužadavimo metu per *Nitellopsis obtusa* membranas tekančios  $Cl^-$  srovės  $I_{Cl}$  inaktyvacijos trukmių  $t_{inact}$  priklausomybė nuo membranos potencialo (MP) kontrolinėmis sąlygomis bei 30 min. paveikus 150  $\mu M$  koncentracijos inozitolio heksakisfosfato ( $IP_6$ ) tirpalais bei ląsteles pakartotinai veikiant kontroliniu tirpalu. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus ( $p < 0,05$ ) tarp parametro verčių kontrolinėmis sąlygomis ir po poveikio.  $n=8$ .

Siekiant įvertinti galimą  $IP_6$  poveikį kitiems ląsteliniams su  $Ca^{2+}$  susijusiems procesams, registruotas ciklozės greitis ramybės būsenoje ir elektriškai sužadinus VP – kontrolinėmis sąlygomis ir ląsteles 30 min inkubavus 150  $\mu M$  koncentracijos  $IP_6$  tirpale. Nei vienas iš tirtų parametru nebuvo paveiktas inkubacijos 150  $\mu M$  koncentracijos  $IP_6$  tirpale (**4.8 lentelė, 4.32 pav., pav. P23**).

Apibendrinant, nustatyta, kad  $IP_6$  hiperpolarizuoja sužadavimo slenkstį, bet nekeičia VP amplitudės. Ši medžiaga taip pat paslenka  $I_{Ca}$  srovės reversijos potencialą link neigiamų MP verčių bei ilgina VP ir sužadavimo metu tekančių srovių laikinių charakteristikų vertes.

**4.8 lentelė.** 150  $\mu\text{M}$  inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikis ciklozės greičio parametrui ramybės būsenoje ir ląstelę elektriškai sužadinus. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD.  $n = 4$ .

	Kontrolė-1	$\text{IP}_6$ , 150 $\mu\text{M}$	Kontrolė-2
Ciklozės greitis ramybės būsenoje $v_r$ ( $\mu\text{m/s}$ )	37 $\pm$ 11	37 $\pm$ 3	37 $\pm$ 8
Maksimalus ciklozės greitis atsistatymo metu $v_{max}$ ( $\mu\text{m/s}$ )	35 $\pm$ 5	35 $\pm$ 8	36 $\pm$ 7
Greičio atsistatymo laiko konstantą $\tau$ (min)	3,5 $\pm$ 0,9	3,5 $\pm$ 1,2	3,8 $\pm$ 1,1



**4.32 pav.** *Nitellopsis obtusa* ląstelių ciklozės greičio kaita laike ramybės būsenoje ir po elektrinio sužadavimo (rodyklė) kontrolinėmis sąlygomis bei 30 min. paveikus 150  $\mu\text{M}$  koncentracijos inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) tirpalais bei ląstelės pakartotinai veikiant kontroliniu tirpalu. Rodyklė pažymi elektrinio sužadavimo momentą. Įklija rodo ciklozės greičio atsistatymo po elektrinio ląstelės sužadavimo laiko konstantos  $\tau$  vertes vertes skirtinguose tirpaluose. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD.  $n=4$ .

## 5. DISKUSIJA

$\text{Ca}^{2+}$  jonų svarba ląsteliniams procesams, ypač elektrinių signalų, skirtų ilgais atstumais perduoti informaciją apie lokalių išorinių stresorių poveikį, formavimui, yra neginčijama (White, 2000). Pastebėta, kad iš kontrolinėmis sąlygomis jaudrių ląstelių aplinkos pašalinus  $\text{Ca}^{2+}$ , šios tampa nebesužadindamos (Findlay, Hope, 1964; Kataev, Zherelova, 1984). Remiantis Characeae šeimos dumblių tyrimų, atliktų keičiant išorines  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracijas, o, ląsteles perfuzavus, ir vidines  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracijas, rezultatais, nustatyta, kad pirmoji iš dviejų pagrindinių sužadavimo metu per membranas tekančių srovių yra  $\text{Ca}^{2+}$  jonų srovė (Beilby, Coster, 1979; Lunevsky *et al.*, 1983; Shiina, Tazawa, 1987; Zherelova, 1989b).

Vis dėlto, šiuos  $\text{Ca}^{2+}$  kanalus elektrofiziologiškai tirti yra sudėtinga, nes per juos tekanti srovė aktyvuoja ne visada lengvai atskiriamą tos pačios krypties  $\text{Cl}^-$  srovę (Beilby, Coster, 1979; Lunevsky *et al.*, 1983). Tyrimai „patch clamp“ metodu leido aptikti daug įvairaus selektyvumo jonų kanalų aktyvumo įrodymų tiek Characeae šeimos dumblių plazminėje, tiek ir vakuolės membranoje, tačiau vienareikšmiškai aptikti  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų aktyvumo nepavyko (Katsuhara *et al.*, 1991; Laver, Walker, 1991; Homann, Thiel, 1994; Berecki *et al.*, 1999). Tyrimus taip pat apsunkina tai, kad tik palyginus neseniai buvo nusekvenuotas Characeae šeimos dumblio *Chara braunii* genomas, leidžiantis lyginti jau nebe tik skirtingų augalų rūšių funkcinis elektrofiziologinius duomenis, bet ir ieškoti genomų homologijų ir skirtumų, o ateityje ir pasinaudoti genų išveiklinimo metodais (Nishiyama *et al.*, 2018; Beilby, 2019).

Kol kas nesant struktūrinių galimybių ištirti šiuos menturdumblių  $\text{Ca}^{2+}$  kanalus, verta taikyti funkcinis metodus, siekiant atskleisti ir išskirti  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų savybes ir jų įtaką elektrinių signalų generavimo procese, funkciškai šiuos kanalus charakterizuoti, taip papildant fundamentines žinias apie augalų  $\text{Ca}^{2+}$  pernašos sistemas.

### 5.1. $\text{Ca}^{2+}$ kanalų blokatorių poveikis *Nitellopsis obtusa* ląstelėms

Viena iš priemonių, padedančių įvertinti tam tikrų kanalų aktyvumo įtaką fiziologiniams procesams, yra kanalų blokatoriai. Žinoma, kad Characeae šeimos dumblių  $\text{Ca}^{2+}$  kanalus gali blokuoti metalų jonai, pavyzdžiui,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  (Lunevsky *et al.*, 1983), tačiau jų taikymas gali turėti ir šalutinių poveikių kitoms jonų pernašos sistemoms (Kisnierienė *et al.*, 2016). Organiniai  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatoriai, pavyzdžiui, nifedipinas, turi panašų elektrofiziologinį poveikį, tačiau taikant blokatorius, kurie gyvūninėse

sistemose veikia specifiškai, augalinėse sistemose stebimi tiek specifiniai, tiek ir nespecifiniai poveikiai (Tester, MacRobbie, 1990; Zherelova *et al.*, 1994). Taigi, identifikuoti specifiniai augalų  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatoriai leistų tiksliau aprašyti šių kanalų savybes, be to, leistų geriau suprasti  $\text{Ca}^{2+}$  srovių poveikį įvairiems fiziologiniams procesams.

Šiame tyrime buvo panaudoti keturi  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatoriai: verapamilas, tetrandrinas, NED-19 ir  $\text{La}^{3+}$ .

Verapamilu, NED-19 ir  $\text{La}^{3+}$  30 min paveikus *Nitellopsis obtusa* ląsteles pastebėta, kad visi šie blokatoriai depoliarizavo VP sužadavimo slenkstį (**4.2 pav.**, **4.17 pav.**, **4.21 pav.**). Žinant, kad, generuojant VP, pirmiausia aktyvuojami  $\text{Ca}^{2+}$  kanalai (Lunevsky *et al.*, 1983), o molekulės, potencialiai aktyvuojančios  $\text{Ca}^{2+}$  kanalus, VP sužadavimo slenkstį hiperpoliarizuoja (Lapeikaitė *et al.*, 2019, 2020), šį parametą galima laikyti  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų, atsakingų už pradinę depoliarizaciją VP generavimo metu, aktyvumo indikatoriumi.

Kadangi VP depoliarizacijos fazė siejama su  $\text{Ca}^{2+}$  ir  $\text{Cl}^-$  kanalų aktyvumu, nesudėtinga paaiškinti  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatorių sukeltą VP depoliarizacijos trukmių  $t_{dep}$  ir sužadavimo metu tekančių srovių aktyvacijos trukmių  $t_{act}$  pailgėjimą (**3.3 pav.**, **4.2 pav.**, **4.4 pav.**, **4.18 pav.**) – užblokavus dalį kanalų, užtrunka daugiau laiko membraną depoliarizuoti (Tsutsui *et al.*, 1987b).

$\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatorių (verapamilo, NED-19) sukeltą membranos ramybės potencialo depoliarizaciją (**4.2 pav.**, **4.17 pav.**) galima paaiškinti  $\text{H}^+$ -ATPazių blokavimu. Šį poveikį, stebėtą ir *Chara corallina* menturdumbliuose, mėginta grįsti dar ir membranos laidumo ramybės būsenoje sumažėjimu (Tsutsui *et al.*, 1987b). Šioje disertacijoje aprašytuose tyrimuose reikšmingo poveikio membranos laidumui ramybės būsenoje tirti  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatoriai nesukėlė, nors neryški laidumo mažėjimo tendencija verapamilo bei NED-19 poveikio tyrimuose ir buvo stebėta. Taip pat membranos ramybės potencialo vertę lemia ir  $\text{K}^+$  kanalų, kuriuos taip pat galėjo paveikti tirti blokatoriai, aktyvumas (Blatt, 2024).

Veikimo potencialų repoliarizacijos trukmės  $t_{rep}$  ir  $I_{Cl}$  srovės inaktyvacijos trukmių pailgėjimas (**3.3 pav.**, **4.2 pav.**, **4.5 pav.**, **4.17 pav.**, **4.19 pav.**) gali būti siejamas su blokatorių įtaka  $\text{K}_{out}$  kanalų aktyvumui (Kourie, 1994). Be to, kadangi už repoliarizacijos fazę atsakingos ir  $\text{H}^+$ -ATPazės, jų blokavimas, stebimas ir kaip ramybės potencialo depoliarizacija (**4.2 pav.**, **4.17 pav.**), taip pat gali prisidėti prie minėtų parametų verčių didėjimo (Gyenes *et al.*, 1980; Tsutsui *et al.*, 1987b). Kadangi  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazės yra giminingos  $\text{H}^+$ -ATPazėms (García Bossi *et al.*, 2020), galima įtarti, kad kai kurie tirti  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatoriai analogiškai

veikia ir  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazės: sutrikus  $\text{Ca}^{2+}$  pašalinimui iš citoplazmos,  $\text{Cl}^-$  kanalai lieka aktyvuoti ilgiau, taip membranos repoliarizacija yra apsunkinama.

Žinoma, kad verapamilas sumažina atsaką į žemos temperatūros stimulus baltaziedžiame vairyneje, pupose (*Vicia faba*) ir saulėgražose (*Helianthus annuus*) amplitudes (Krol *et al.*, 2004), taip pat veikimo potencialų amplitudes kerpsamanėse *Marchantia polymorpha* (Koselski *et al.*, 2021). Šio tyrimo metu NED-19 ir  $\text{La}^{3+}$  mažino VP amplitudes (**4.17 pav.**, **4.21 pav.**), tačiau verpamilas tokio poveikio neturėjo (**4.2 pav.**). Taip pat nepakito ir visų sužadavimo metu stebėtų srovių amplitudės (**4.3 pav.**). Kadangi šie  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatoriai ilgino ir VP repoliarizacijos trukmes (**4.2 pav.**, **4.17 pav.**), galima įtarti, kad  $\text{K}^+$  kanalai taip pat buvo blokuoti. Žinoma, kad menturdumbliuose *Chara inflata* užblokavus  $\text{K}^+$  srovės blokatoriumi tetraetilamoniu (TEA), sužadavimo metu tekančių depoliarizuojančių srovių amplitudės gali padidėti keliskart (Kourie, 1994). Taigi, blokuojant ir depoliarizuojančias, ir repoliarizuojančias sroves, galima užregistruoti tokios pačios amplitudės srovės signalą kaip ir kontrolinėmis sąlygomis.

Kadangi verapamilas ir NED-19 veikė ne tik  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų aktyvumą, bet ir kitas jonų pernašos sistemas (**4.2 pav.**, **4.17 pav.**), šių blokatorių negalima laikyti specifiniais, tiriant *Nitellopsis obtusa* tarpubamblines ląsteles. Verapamilo nespecifiškumą patvirtina ir ląstelių gyvybingumo tyrimas (**4.7 pav.**): paaiškėjo, kad net ir nedidelės verapamilo koncentracijos (0,1 mM) tirpaluose inkubuotos *Nitellopsis obtusa* ląstelės galiausiai žūsta, taigi, veikiamos ne tik jonų pernašos sistemos. Tikėtina, kad pakartojus ląstelių gyvybingumo tyrimą ir su tetrandrinu bei NED-19, būtų galima tikėtis panašių rezultatų.

Iš visų tirtų  $\text{Ca}^{2+}$  blokatorių, panašų inhibicinį poveikį pasiekti užteko mažiausios NED-19 koncentracijos. NED-19 yra specifinis žinduolių endolizosomų TPC kanalų blokatorius (Naylor *et al.*, 2009; Sakurai *et al.*, 2015). Kadangi šie TPC kanalai yra homologiški augalų TPC kanalams (Hedrich, Marten, 2011), naudojant šį blokatorių, tikėtasi atskleisti TPC kanalų įtaką Characeae šeimos dumblių elektrinių signalų generavimui, tačiau remiantis surinktais duomenimis, nepanašu, kad šie kanalai, net jei ir yra ekspresuojami menturdumbliuose, savo aktyvumu atitinka aukštesniųjų augalų TPC kanalų aktyvumą. Vis dėlto, NED-19 poveikis elektrofiziologiniams parametrams iš esmės nesiskyrė nuo verapamilo poveikio (**4.2 pav.**, **4.17 pav.**), taigi, šios medžiagos, nors ir pasižymi poveikiu ir kitoms jonų pernašos sistemoms, *Nitellopsis obtusa*  $\text{Ca}^{2+}$  kanalus geba blokuoti. Netikėtai,  $\text{La}^{3+}$  jonai, priešingai nei verapamilas ir NED-19, nepasižymėjo tokiais nespecifinėmis savybėmis (**4.21 pav.**), pavyzdžiui,

neveikė membranos ramybės potencialo, nekeitė VP trukmės. Taigi, nors šie jonai nelaikomi specifiniais  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatoriais, jie veikė specifiskiau nei kiti šiame tyrime naudoti blokatoriai.

Sunku vertinti tetrandrino poveikį, nes visi iš pažiūros šio  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatoriaus sukelti *Nitellopsis obtusa* elektrofiziologinių parametų pokyčiai reikšmingai nesiskyrė nuo jo tirpiklio DMSO poveikio (**4.9 pav.**). Galima pastebėti, kad net jei DMSO maskavo tetrandrino poveikį, kai kurių parametų verčių kitimo tendencijos atitiko stebėtas ląsteles veikiant kitų  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatorių verapamilo ir NED-19 tirpalais. Pavyzdžiui, net jei skirtumai tarp parametų verčių nebuvo reikšmingi, VP amplitudės vertė buvo mažesnė paveikus ląsteles tetrandrinu, o ne DMSO; analogiškos tendencijos stebėtos ir su kitais parametrais – membranos ramybės potencialu, VP sužadinimo slenksčiu, VP repoliarizacijos trukme (**4.9 pav.**).

Aukščiau minėti TPC kanalai pasižymi rektifikacija – lengviau praleidžiamos srovės, tekančios iš citoplazmos į vakuolę (Jašlan *et al.*, 2019), todėl vargu, ar šioje disertacijoje aprašytų  $\text{K}^+$  laidžių *Nitellopsis obtusa* tonoplasto jonų kanalai, per kuriuos tekančios srovės gerai praleidžiamos abiem kryptimis (**4.6 pav.**, **4.15 pav.**, **4.20 pav.**), yra koduojami TPC geno, nebent funkciškai Characeae šeimos TPC kanalai reikšmingai skiriasi nuo aukštesniųjų augalų TPC kanalų. Iš visų šioje disertacijoje aprašytų  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatorių, NED-19 yra specifiskiausias TPC kanalams (Kintzer, Stroud, 2016), tačiau didesnių skirtumų tarp šio ir kitų blokatorių poveikio nepastebėta.

## 5.2. Tirpiklio DMSO poveikis *Nitellopsis obtusa* ląstelėms

Tirpiklis dimetilsolfoksidas (DMSO) dažnai naudojamas tirpinti vandenyje netirpias medžiagas (Galvao *et al.*, 2014). Tokias medžiagas, ištirpusias DMSO, jau galima skiesti vandeniniais tirpalais ir naudoti gyvų sistemų tyrimams. Laikoma, kad nedidelės DMSO koncentracijos nėra ląstelėms toksiškos (Bulychev, Rybina, 2018), bet ne visada atsižvelgiama, kad DMSO gali pralaidinti membranas, taip sukeldamas citotoksinius efektus (Zhang *et al.*, 2016; Tunçer *et al.*, 2018). Taip pat žinoma, kad gyvūninėse sistemose DMSO gali mažinti neselektyvių katijonų kanalų ir  $\text{Cl}^-$  kanalų aktyvumą (Nakahiro *et al.*, 1992; Nardid *et al.*, 2013).

Šiame tyrime stebėta, kaip DMSO reikšmingai sumažina VP amplitudę; šis poveikis labiau pasireiškė per VP smailės vertės sumažėjimą, nors šis pokytis ir nebuvo statistiškai reikšmingas (**4.9 pav.**). VP smailės vertės pokyčiai siejami su  $\text{Cl}^-$  kanalų aktyvumu, šiuo atveju, jų blokavimu, kas paaiškintų ir pailgėjusias VP depoliarizacijos trukmes bei sužadinimo metu



tekančios srovės  $I_{Cl}$  aktyvacijos trukmes (**4.9 pav.**, **4.13 pav.**). Taip pat stebėtas DMSO poveikis  $I_K$  srovėms (**4.10 pav.**), – jį galima sieti su pailgėjusiomis VP repoliarizacijos trukmėmis bei sužadinimo metu tekančių srovių inaktyvacijos trukmių pailgėjimu (**4.9 pav.**, **4.14 pav.**). Poveikio vidinėms jonų koncentracijoms taip pat negalima atmesti, nes stebėtas sužadinimo metu tekančios srovės  $I_{Ca}$  reversijos potencialo pasislinkimas (**4.11 pav.**).

### 5.3. Inozitolio fosfatų poveikis *Nitellopsis obtusa* ląstelėms

#### 5.3.1. Inozitolio 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ) poveikis

Augaluose  $IP_3$  ilgą laiką sietas su įvairių fiziologinių procesų reguliavimu (Krinke *et al.*, 2007), spėjama, kad tam tikras signalas perduodamas padidinant  $IP_3$  koncentraciją citoplazmoje, tuomet  $IP_3$  aktyvuoja nežinomos tapatybės  $Ca^{2+}$  kanalus, per kuriuos į citoplazmą plūstantys  $Ca^{2+}$  jonai tiesiogiai aktyvuoja ar inhibuoja tam tikrus baltymus, pavyzdžiui, fosfatazes ar kinazes (Gilroy *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). Nors daugelis tyrimų atskleidė fiziologinį  $IP_3$  poveikį, augalai neturi receptorių, homologiškų gyvūnų  $IP_3$  receptoriams, genų, tad visas signalo perdavimo kelias lieka neaiškus (Krinke *et al.*, 2007).

Tiriant Characeae šeimos dumbliaus aptikta, kad į citoplazmą mikroinjekuotas  $IP_3$  gali ląsteles elektriškai sužadinti, aktyvuodamas  $Ca^{2+}$  kanalus (Zherelova, 1989a; Biskup *et al.*, 1999). Remiantis šiais rezultatais, sukurtas matematinis Thielio-Beilby modelis, aprašantis MP kitimą laike veikimo potencialo generavimo metu (Biskup *et al.*, 1999; Wacke, Thiel, 2001; Wacke *et al.*, 2003; Beilby, Al Khazaaly, 2016, 2017; Kisinieriene *et al.*, 2019). Modelio šerdis –  $IP_3$  aktyvuojami  $Ca^{2+}$  kanalai, per kuriuos sužadinimo metu iš endoplazminio tinklo į citoplazmą teka  $Ca^{2+}$  srovė.

Nors modelis geba tiksliai atkartoti empirinius elektrinio sužadinimo duomenis ne tik kontrolinėmis sąlygomis, bet ir ląstelėms sukėlus stresą, esama tyrimų, prieštaraujančių  $IP_3$  aktyvuojamų  $Ca^{2+}$  kanalų hipotezei. *Chara corallina* ląstelėse  $IP_3$  injekavimas nesukėlė citoplazmos judėjimo greičio pokyčių, nors šis procesas stabdomas išaugusios  $Ca^{2+}$  koncentracijos citoplazmoje (Tazawa, Kikuyama, 2003).

Šiame tyrime *Nitellopsis obtusa* ląsteles veikiant  $IP_3$  tirpalais, jokio poveikio elektrofiziologiniams parametrams neaptikta (**4.22 pav.**). Verta paminėti, kad nors VP sužadinimo slenkstis nebuvo paveiktas statistiškai reikšmingai, stebėta šio parametro hiperpolarizacijos tendencija. Be to, kai

kurios ląstelės, paveiktos IP<sub>3</sub> tirpalais, generavo spontaninių VP serijas (**4.23 pav.**).

Fosfolipazės C (PLC) inhibitorius U73122 turėtų veikti kaip Ca<sup>2+</sup> kanalų blokatorius: neveikli PLC negeba sintetinti IP<sub>3</sub>, vadinasi, ir Ca<sup>2+</sup> kanalai negali būti aktyvuojami. Nors *Chara corallina* menturdumbliuose stebėtas neigiamas U73122 ir kito PLC blokatoriaus neomicino poveikis sužadavimo metu tekančioms srovėms (Biskup *et al.*, 1999), kitos mokslininkų grupės tyrimai šių efektų nepatvirtino (Tazawa, Kikuyama, 2003). Šioje disertacijoje aprašytų tyrimų metu U73122 taip pat neturėjo poveikio tirtiems *Nitellopsis obtusa* elektrofiziologiniams parametrams, tarp jų ir VP sužadavimo slenksčiui, kurį galima sieti su Ca<sup>2+</sup> kanalų aktyvumu (**4.24 pav.**).

Apibendrinant, nors esama rezultatų, rodančių, kad IP<sub>3</sub> turi potencialo veikti Characeae šeimos dumblių elektrofiziologinius parametrus, tačiau negalima vienareikšmiškai patvirtinti, kad ši molekulė aktyvuoja *Nitellopsis obtusa* Ca<sup>2+</sup> kanalus.

### 5.3.2. Inozitolio heksakisfosfato (IP<sub>6</sub>) poveikis

Keliuose tyrimuose parodyta, kad visiškai fosforilinta inozitolio forma IP<sub>6</sub> aukštesniuose augaluose turi elektrofiziologinį poveikį – aktyvuoja tonoplasto jonų kanalus, blokuoja plazminės membranos K<sup>+</sup> kanalus. Žinoma, kad tokį patį poveikį sukelia ir IP<sub>3</sub>, tačiau tokio paties intensyvumo poveikį sukelia mažesnės IP<sub>6</sub> koncentracijos tirpalai (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2000, 2003). Iškelta teorija, kad ne IP<sub>3</sub>, bet IP<sub>6</sub> gali būti veikli antrinė signalinė molekulė, sukianti fiziologinius atsakus augaluose. Literatūroje aprašytą IP<sub>3</sub> poveikį galima paaiškinti tariant, kad eksperimento metu į ląstelės citoplazmą patekęs IP<sub>3</sub> gali būti konvertuojamas į IP<sub>6</sub>, kuris ir sukelia stebimus atsakus. (Munnik, Vermeer, 2010).

Šios disertacijos tyrimų metu nuspręsta patikrinti, ar IP<sub>6</sub> veikia menturdumblių *Nitellopsis obtusa* elektrinių signalų generavimo parametrus, ypač kreipiant dėmesį į galimą poveikį Ca<sup>2+</sup> kanalams.

*Nitellopsis obtusa* ląsteles 30 min. paveikus IP<sub>6</sub> tirpalais, stebėta ženkliai veikimo potencialo slenksčio hiperpolarizacija (**4.25 pav.**, **4.26 pav.**). Prisimenant, kad Ca<sup>2+</sup> kanalų blokatoriai VP slenksčių depolarizavo (**4.2 pav.**, **4.17 pav.**, **4.21 pav.**), galima teigti, kad IP<sub>6</sub> aktyvuoja Ca<sup>2+</sup> kanalus, atsakingus už ląstelių elektrinį sužadimumą.

Stebint ląstelių, paveiktų IP<sub>6</sub>, membranos potencialo kitimą laike, nė karto nebuvo stebėtas spontaninis elektrinis aktyvumas. Ciklozės greičio tyrimas šiuos rezultatus patvirtino (**4.32 pav.**): žinoma, kad šio proceso

greitis atspindi citoplazminę  $\text{Ca}^{2+}$  koncentraciją ir gali indikuoti jos dinamiką, pavyzdžiui, VP generavimo metu (Okazaki *et al.*, 2002; Shimmen, 2007). Taigi, nestebint ciklozės greičio pokyčių ląsteles inkubavus  $\text{IP}_6$  tirpale, galima teigti, kad viduląstelinė  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracija nepakito. Taigi,  $\text{IP}_6$  savaime nėra ląstelę sužadinanti medžiaga, ką patvirtina pupos (*Vicia faba*) žiotelių varstomųjų ląstelių tyrimai (Levchenko *et al.*, 2005).

Pastebėta, kad, paveikus ląsteles 150  $\mu\text{M}$   $\text{IP}_6$  koncentracijos tirpalu, sumažėjo ir VP smailės vertė, o VP amplitudės nepakito. Nepakito ir maksimalus membranos laidumas sužadinimo metu (**4.27 pav.**), bei sužadinimo srovės amplitudė  $I_{\text{trans}}$  (**3.3 pav.**) Taip pat, nors sužadinimo metu tekančios  $\text{Ca}^{2+}$  srovės  $I_{\text{Ca}}$  amplitudės iš pažiūros sumažėjo, ties sužadinimo slenksčiu tekančios srovės amplitudė išliko panaši, tad  $\text{IP}_6$  pakeitė reversinį šios srovės potencialą (**4.28 pav.**). Šie rezultatai leistų teigti, kad  $\text{IP}_6$  ne papildomai atidaro  $\text{Ca}^{2+}$  kanalus, leisdamas į citoplazmą pritekėti daugiau  $\text{Ca}^{2+}$  jonų, bet keičia  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų priklausomybę nuo įtampos – kanalai tampa aktyvuojami prie neigiamesnių MP verčių, tačiau ir deaktyvuojasi prie neigiamesnių jo verčių. Kita vertus, nors statistiškai reikšmingai minėtų parametrų, susijusių su  $\text{Ca}^{2+}$  srovės amplitude, vertės nesiskiria nuo verčių kontrolinėmis sąlygomis, matoma tendencija parametrų verčių vidurkiams po  $\text{IP}_6$  poveikio viršyti vidurkius kontrolinėmis sąlygomis (**4.27 pav.**). Tai galima sieti su  $\text{Cl}^-$  srovės aktyvavimu – nors maksimali  $\text{Ca}^{2+}$  srovės amplitudė nekinta,  $\text{Cl}^-$  srovė aktyvuojama anksčiau, tad veikia didesnė elektrovaros jėga, nes kanalai aktyvuojami ties labiau nuo  $\text{Cl}^-$  jonų pusiausvyrinio potencialo nutolusiu MP.

$\text{IP}_6$  taip pat ilgino sužadinimo metu tekančios  $\text{Cl}^-$  srovės aktyvacijos ir inaktyvacijos bei VP depoliarizacijos ir repoliarizacijos trukmes (**4.25 pav.**, **4.29 pav.**, **4.31 pav.**). Pailgėjusias aktyvacijos trukmes galima sieti su VP amplitudės išaugimo tendencija – didesniai srautui pratekėti per membraną užtrunka ilgiau.  $I_{\text{Ca}}$  inaktyvacijos trukmių bei VP repoliarizacijos trukmių pailgėjimą paaiškinti sunkiau. Repoliarizacijos fazė priklauso nuo  $\text{Ca}^{2+}$  jonų pašalinimo iš citoplazmos,  $\text{Cl}^-$  kanalų deaktyvacijos,  $\text{K}^+$  kanalų bei  $\text{H}^+$ -ATPazių aktyvumo. Verta paminėti, kad aminorūgštys, kurios, manoma, taip pat aktyvuoja  $\text{Ca}^{2+}$  kanalus, irgi sukelia VP repoliarizacijos fazės ilgėjimą (Lapeikaitė *et al.*, 2019, 2020). Taigi, tikėtina, kad tiek aminorūgščių, tiek ir  $\text{IP}_6$  poveikis VP repoliarizacijos fazei turėtų būti susijęs su  $\text{Ca}^{2+}$  pernašos sistemų aktyvumu. Citoplazmos greičio ramybės būsenoje ir po elektrinio sužadinimo tyrimas parodė, kad  $\text{IP}_6$  neveikia bent kai kurių su  $\text{Ca}^{2+}$  siejamų fiziologinių procesų ląstelėje –  $\text{Ca}^{2+}$  sąveikos su aktomiozinu dinamikos (**4.32 pav.**).  $I_{\text{Ca}}$  srovės reversinio potencialo pokytis

indikuoja pasikeitusią viduląstelinę  $\text{Ca}^{2+}$  koncentraciją (**4.28 pav.**), tad galima spėti, kad, kai VP sužadinimo slenkstis hiperpoliarizuotas ir  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracijos pokyčiai inicijuojami ties neigiamesniais MP, keičiasi elektrovaros jėgos ir  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazių veikla nebėra tokia efektyvi.

Verta prisiminti, kad Thielio-Beilby matematinio modelio, aprašančio veikimo potencialų generavimą Characeae šeimos dumbliuose, centrinė prielaida teigia, kad  $\text{Ca}^{2+}$  kanalus aktyvuoja  $\text{IP}_3$  molekulės. Vis dėlto, patys modelio autoriai teigia, kad iš principo  $\text{IP}_3$  nėra būtinas; modelis gali veikti, kai  $\text{Ca}^{2+}$  kanalus aktyvuoja kokia nors kita signalinė molekulė, kurios metabolizmas panašus, kaip  $\text{IP}_3$  (Wacke *et al.*, 2003). Taigi, remiantis šioje disertacijoje aprašytais tyrimais (**4.26 pav.**) bei faktu, kad modelis sėkmingai simuliuoja eksperimentinius duomenis, galima daryti prielaidą, kad ne  $\text{IP}_3$ , o  $\text{IP}_6$  veikia kaip signalinė molekulė, aktyvuojanti  $\text{Ca}^{2+}$  kanalus ir inicijuojanti griūtinę membranos depoliarizaciją menturdumblių ląstelės sužadinimo metu.

#### 5.4. Tyrimo ribotumas

Žinant, kad tiek  $\text{IP}_6$ , tiek ir aminorūgščių poveikis *Nitellopsis obtusa* VP parametrams panašus (Lapeikaitė *et al.*, 2019, 2020) – hiperpoliarizuojamas VP sužadinimo slenkstis, – bet ne tapatus –  $\text{IP}_6$ , priešingai nei aminorūgštys, mažina VP smailės vertę, – reikėtų atlikti tyrimų, kartu veikiant ląsteles ir  $\text{IP}_6$ , ir aminorūgštis, ir įvertinti, ar jų poveikis yra sinergetinis. Tai padėtų paaiškinti, ar aminorūgščių ir  $\text{IP}_6$  aktyvuojami  $\text{Ca}^{2+}$  kanalai priklauso tai pačiai populiacijai, ar už VP generavimo inicijavimą atsakingi dviejų tipų  $\text{Ca}^{2+}$ , valdomi skirtingų agonistų.

Žinant, kad  $\text{IP}_6$  aukštesniuosiuose augaluose aktyvuoja tonoplasto FV ir SV kanalus (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2003), derėtų išsiaiškinti, ar  $\text{K}^+$  kanalai *Nitellopsis obtusa* tonoplaste yra irgi jautrūs  $\text{IP}_6$ . Tai, viena vertus, suteiktų daugiau žinių apie  $\text{IP}_6$  signalinius kelius augaluose; kita vertus, padėtų geriau charakterizuoti pačius tonoplasto  $\text{K}^+$  kanalus.

Tyrimo metu neaptikta reikšmingo  $\text{IP}_3$  poveikio *Nitellopsis obtusa* veikimo potencialų parametrams. Galbūt pasirinkus kitas koncentracijas ir inkubavimo trukmes, būtų galima tikėtis kitokių rezultatų. Taip pat verta paminėti mažus imties dydžius, galimai trukdžius pasiekti statistškai reikšmingų rezultatų, ypač tais atvejais, kai duomenys nebuvo pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį. Svarbu, kad šiame tyrime ląstelės  $\text{IP}_3$  ir  $\text{IP}_6$  tirpalais buvo veiktos išoriškai, o ne injekuojant tirpalus tiesiai į citoplazmą (Thiel *et al.*, 1990; Biskup *et al.*, 1999). Dėl šios priežasties, atsižvelgiant į barjerines ląstelės sienelės ir membranos funkcijas, šiame tyrime pasirinktos dviem

eilėmis didesnės koncentracijos. Pasirinktą eksperimentų schemą validuoja įrodytas  $IP_6$  poveikis, bet, siekiant galimybės korektiškiau palyginti tyrimus, reiktų atlikti tyrimų injekuojant  $IP_3$  (ir  $IP_6$ ) į *Nitellopsis obtusa* citoplazmą.

Didžiausias šio tyrimo ribotumas – galimybės pasinaudoti genomiais ištekliais nebuvimas. Nors *Chara braunii* genomas yra nusekvenuotas (Nishiyama *et al.*, 2018), *Nitellopsis obtusa* dumbliai sudaro atskirą rūšį, netgi priklauso kitai genčiai. Žinoma, kad Lenkijoje *Chara braunii* aptinkama sekliuose dirbtiniuose tvenkiniuose (Urbaniak 2007), kai *Nitellopsis obtusa* dumbliai gali gyventi ežeruose iki keliolikos metrų gylyje (Larkin *et al.*, 2018). *Chara braunii* Švedijoje auga vandenyse su iki 3 % druskos koncentracija (Blindow 2000). *Nitellopsis obtusa* auga aplinkoje, kurios druskingumas siekia iki 7 % (Bučas *et al.* 2016), bent keletą savaitių gali išgyventi 17 % druskingumo aplinkoje (Winter *et al.* 1999). Galima įtarti, kad abi rūšys užima šiek tiek kitokią ekologinę nišą, tad natūralu tikėtis skirtumų šių giminiškų organizmų genomuose. Dėl šios priežasties visos prielaidos apie joninių kanalų molekulinę tapatybę šiuose dumbliuose lieka spekuliatyvios. Be to, kol kas dar nėra pavykę sukurti Characeae šeimos dumblių mutantų, kurių tam tikri baltymai būtų išveiklinti; tai, derinant funkcinius elektrofiziologinius tyrimus su struktūriniais molekuliniais tyrimais, leistų atskleisti jonų pernašos sistemų, atsakingų už elektrinių signalų generavimą, molekulinę tapatybę.

Siekiant geriau išaiškinti  $Ca^{2+}$  bangų dinamiką *Nitellopsis obtusa* ląstelėse, vertėtų pritaikyti fluorescencinio  $Ca^{2+}$  vaizdinimo metodikas. Tai kur kas tiksliau už elektrofiziologinius metodus leistų atskirti  $Ca^{2+}$  sroves nuo  $Cl^-$  srovių, bei sekti jų dinamiką realiu laiku, taip pat atkreipiant dėmesį ne tik į taškinę dominančią sritį, bet į visą ląstelę, ląstelių kompleksą ar net visą augalą.

## IŠVADOS

- 1) Tirti  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatoriai – verapamilas, NED-19 ir  $\text{La}^{3+}$  – depoliarizuoja *N. obtusa* veikimo potencialų sužadinimo slenkstį.
- 2) Tirti  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatoriai verapamilas ir NED-19 taip pat depoliarizuoja membranos ramybės potencialą, ilgina veikimo potencialų ir sužadinimo metu tekančių  $\text{Cl}^-$  srovių laikinių charakteristikų vertes.
- 3)  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatoriaus tetrandrino poveikis *N. obtusa* membranų jonų pernašos sistemoms nenustatytas.
- 4) Tirti  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatoriai – verapamilas, tetrandrinas ir NED-19 – neveikia tonoplasto  $\text{K}^+$  kanalų aktyvumo.
- 5) Inozitolio 1,4,5-trisfosfatas ( $\text{IP}_3$ ) neveikia *N. obtusa* membranų jonų pernašos sistemų.
- 6) Inozitolio heksakisfosfatas ( $\text{IP}_6$ ) hiperpoliarizuoja *N. obtusa* veikimo potencialų sužadinimo slenkstį.
- 7) Inozitolio heksakisfosfatas ( $\text{IP}_6$ ) paslenka sužadinimo metu tekančių  $\text{Ca}^{2+}$  srovių reversijos potencialą link neigiamų membranos potencialo verčių, taip pat ilgina  $\text{Cl}^-$  srovių aktyvacijos ir inaktyvacijos trukmes.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

- 1) Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MRG, Hedrich R (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K<sup>+</sup>-selective, K<sup>+</sup>-sensing ion channel. *FEBS Letters* **486**, 93–98. doi:10.1016/S0014-5793(00)02248-1.
- 2) Alexandre J, Lassalles J-P (1992) Intracellular Ca<sup>2+</sup> Release by InsP<sub>3</sub> in Plants and Effect of Buffers on Ca<sup>2+</sup>. *Source: Philosophical Transactions: Biological Sciences* **338**, 53–61. <https://www.jstor.org/stable/55781>.
- 3) Alexandre J, Lassalles JP, Kado RT (1990) Opening of Ca<sup>2+</sup> channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* **343**, 567–570. doi:10.1038/343567a0.
- 4) Ali A, Maggio A, Bressan RA, Yun D-J (2019) Role and Functional Differences of HKT1-Type Transporters in Plants under Salt Stress. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 1059. doi:10.3390/ijms20051059.
- 5) Allen GJ, Muir SR, Sanders D (1995) Release of Ca<sup>2+</sup> from Individual Plant Vacuoles by Both InsP<sub>3</sub> and Cyclic ADP-Ribose. *Science* **268**, 735–737. doi:10.1126/science.7732384.
- 6) Allen GJ, Sanders D (1994) Osmotic stress enhances the competence of *Beta vulgaris* vacuoles to respond to inositol 1,4,5-trisphosphate. doi:10.1046/j.1365-313X.1994.6050687.x.
- 7) Andjus PR (1998) Harvesting the Biophysical Field of the ‘Green Axon’. *Iugoslav Physiol Pharmacol Acta* **34**, 1–9.
- 8) Arazi T, Sunkar R, Kaplan B, Fromm H (1999) A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni<sup>2+</sup> tolerance and Pb<sup>2+</sup> hypersensitivity in transgenic plants. *Plant Journal* **20**, 171–182. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00588.x.
- 9) Barbier-Brygoo H, De Angeli A, Filleur S, Frachisse JM, Gambale F, Thomine S, Wege S (2011) Anion channels/transporters in plants: From molecular bases to regulatory networks. *Annual Review of Plant Biology* **62**, 25–51. doi:10.1146/annurev-arplant-042110-103741.
- 10) Bassil E, Tajima H, Liang YC, Ohto M, Ushijima K, Nakano R, Esumi T, Coku A, Belmonte M, Blumwald E (2011) The Arabidopsis Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporters NHX1 and NHX2 Control Vacuolar pH and K<sup>+</sup> Homeostasis to Regulate Growth, Flower Development, and Reproduction. *The Plant Cell* **23**, 3482–3497. doi:10.1105/TPC.111.089581.

- 11) Becker D, Geiger D, Dunkel M, Roller A, Bertl A, Latz A, Carpaneto A, Dietrich P, Roelfsema MRG, Voelker C, Schmidt D, Mueller-Roeber B, Czempinski K, Hedrich R (2004) AtTPK4, an Arabidopsis tandem-pore K<sup>+</sup> channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15621–15626. doi:10.1073/PNAS.0401502101.
- 12) Beilby MJ (2007) Action Potential in Charophytes. *International Review of Cytology* **257**, 43–82. doi:10.1016/S0074-7696(07)57002-6.
- 13) Beilby MJ (2019) *Chara braunii* genome: a new resource for plant electrophysiology. *Biophysical Reviews and Letters* **11**, 235–239. doi:10.1007/s12551-019-00512-7.
- 14) Beilby MJ, Casanova MT (2014) ‘The Physiology of Characean Cells.’ doi:10.1007/978-3-642-40288-3.
- 15) Beilby MJ, Coster HGL (1979) The Action Potential in *Chara corallina* II. Two Activation-Inactivation Transients in Voltage Clamps of the Plasmalemma. *Functional Plant Biology* **6**, 323–335. <http://pcp.oxfordjournals.org/content/5/3/377.extract>.
- 16) Beilby MJ, Al Khazaaly S (2016) Re-modeling Chara action potential: I. from Thiel model of Ca<sup>2+</sup> transient to action potential form. *AIMS Biophysics* **3**, 431–449. doi:10.3934/biophy.2016.3.431.
- 17) Beilby MJ, Al Khazaaly S (2017) Re-modeling Chara action potential: II. The action potential form under salinity stress. *AIMS Biophysics* **4**, 298–315. doi:10.3934/biophy.2017.2.298.
- 18) Beilby MJ, Mimura T, Shimmen T (1993) The proton pump, high pH channels, and excitation: voltage clamp studies of intact and perfused cells of *Nitellopsis obtusa*. *Protoplasma* **175**, 144–152.
- 19) Benkerrou D, Minicozzi V, Gradogna A, Milenkovic S, Bodrenko IV, Festa M, Lagostena L, Cornara L, D’Amore A, Ceccarelli M, Filippini A, Carpaneto A (2019) A perspective on the modulation of plant and animal two pore channels (TPCs) by the flavonoid naringenin. *Biophysical Chemistry* **254**, 106246. doi:10.1016/j.bpc.2019.106246.
- 20) Berecki G, Varga Z, Van Iren F, Van Duijn B (1999) Anion Channels in *Chara corallina* Tonoplast Membrane: Calcium Dependence and Rectification. *The Journal of Membrane Biology* **172**, 159–168. doi:10.1007/s002329900593.
- 21) Berestovsky GN, Kataev AA (2005) Voltage-gated calcium and Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channels and Ca<sup>2+</sup> transients : voltage-clamp studies of perfused and intact cells of Chara. *European Biophysics Journal* **34**, 973–986. doi:10.1007/s00249-005-0477-9.



- 22) Bhagya N, Chandrashekar KR (2016) Tetrandrine - A molecule of wide bioactivity. *Phytochemistry* **125**, 5–13. doi:10.1016/J.PHYTOCHEM.2016.02.005.
- 23) Biskup B, Gradmann D, Thiel G (1999) Calcium release from InsP3-sensitive internal stores initiates action potential in *Chara*. *FEBS Letters* **453**, 72–76. doi:10.1016/S0014-5793(99)00600-6.
- 24) Blatt MR (2024) A charged existence: A century of transmembrane ion transport in plants. *Plant Physiology*. doi:10.1093/plphys/kiad630.
- 25) Bose JC (1913) ‘Researches on irritability of plants.’ (Longmans, Green, and Company)
- 26) Boss WF, Im YJ (2012) Phosphoinositide signaling. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 409–429. doi:10.1146/ANNUREV-ARPLANT-042110-103840.
- 27) Brunet T, Arendt D (2016) From damage response to action potentials: early evolution of neural and contractile modules in stem eukaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **371**, 20150043. doi:10.1098/rstb.2015.0043.
- 28) Bulychev A, Kamzolkina NA (2006) Effect of action potential on photosynthesis and spatially distributed H<sup>+</sup> fluxes in cells and Chloroplasts of *Chara corallina*. *Russian Journal of Plant Physiology* **53**, 1–9. doi:10.1134/s1021443706010018.
- 29) Bulychev AA, Rybina AA (2018) Long-range interactions of *Chara* chloroplasts are sensitive to plasma-membrane H<sup>+</sup> flows and comprise separate photo- and dark-operated pathways. *Protoplasma* **255**, 1621–1634. doi:10.1007/S00709-018-1255-8/FIGURES/11.
- 30) Burdon-Sanderson JS (1873) I. Note on the electrical phenomena which accompany irritation of the leaf of *Dionæa muscipula*. *Proceedings of the Royal Society of London* **21**, 495–496. doi:10.1098/rspl.1872.0092.
- 31) Chanroj S, Padmanaban S, Czerny DD, Jauh G-Y, Sze H (2013) K<sup>+</sup> Transporter AtCHX17 with Its Hydrophilic C Tail Localizes to Membranes of the Secretory/Endocytic System: Role in Reproduction and Seed Set. *Molecular Plant* **6**, 1226–1246. doi:10.1093/mp/sst032.
- 32) Chen X, Lin W-H, Wang Y, Luan S, Xue H-W (2008) An Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase Functions in PHOTOTROPIN1 Signaling in *Arabidopsis* by Altering Cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *The Plant Cell* **20**, 353–366. doi:10.1105/tpc.107.052670.
- 33) Choi WG, Toyota M, Kim SH, Hilleary R, Gilroy S (2014) Salt stress-induced Ca<sup>2+</sup> waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America* **111**, 6497–6502. doi:10.1073/PNAS.1319955111.
- 34) Conde A, Chaves MM, Gerós H (2011) Membrane transport, sensing and signaling in plant adaptation to environmental stress. *Plant Cell Physiol* **52**, 1583–1602. doi:10.1093/pcp/pcr107.
  - 35) Cuin T, Dreyer I, Michard E (2018) The Role of Potassium Channels in Arabidopsis thaliana Long Distance Electrical Signalling: AKT2 Modulates Tissue Excitability While GORK Shapes Action Potentials. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 926. doi:10.3390/ijms19040926.
  - 36) Darwin CDF (1888) ‘Insectivorous plants.’ (J Murray, Ed.).
  - 37) Das-Chatterjee A, Goswami L, Maitra S, Ghosh Dastidar K, Ray S, Majumder AL (2006) Introgression of a novel salt-tolerant L-myoinositol 1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka (PcINO1) confers salt tolerance to evolutionary diverse organisms. doi:10.1016/j.febslet.2006.06.033.
  - 38) Demidchik V, Shabala S, Isayenkov S, Cuin TA, Pottosin I (2018) Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions. *New Phytologist* **220**, 49–69. doi:10.1111/nph.15266.
  - 39) Dreyer I, Susmilch FC, Fukushima K, Riadi G, Becker D, Schultz J, Hedrich R (2021) How to Grow a Tree: Plant Voltage-Dependent Cation Channels in the Spotlight of Evolution. *Trends Plant Sci* **26**, 41–52. doi:10.1016/j.tplants.2020.07.011.
  - 40) Dreyer I, Uozumi N (2011) Potassium channels in plant cells. *FEBS Journal* **278**, 4293–4303. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08371.x.
  - 41) Edel KH, Kudla J (2015) Increasing complexity and versatility: How the calcium signaling toolkit was shaped during plant land colonization. *Cell Calcium* **57**, 231–246. doi:10.1016/j.ceca.2014.10.013.
  - 42) Edel KH, Marchadier E, Brownlee C, Kudla J, Hetherington AM (2017) The Evolution of Calcium-Based Signalling in Plants. *Current Biology* **27**, R667–R679. doi:10.1016/j.cub.2017.05.020.
  - 43) Elliott WJ, Ram CVS (2011) Calcium Channel Blockers. *The Journal of Clinical Hypertension* **13**, 687. doi:10.1111/J.1751-7176.2011.00513.X.
  - 44) Fan L, Zhao L, Hu W, Li W, Novák O, Strnad M, Simon S, Friml J, Shen J, Jiang L, Qiu QS (2018) Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters regulate the pH of endoplasmic reticulum and auxin-mediated development. *Plant Cell and Environment* **41**, 850–864. doi:10.1111/PCE.13153.

- 45) Findlay GP, Hope AB (1964) Ionic relations of cells of *Chara australis* IX. Analysis of Transient Membrane Currents. *Australian Journal of Biological Sciences* **17**, 400–411.
- 46) Foissner I, Wasteneys GO (2014) Characean Internodal Cells as a Model System for the Study of Cell Organization. 'Int Rev Cell Mol Biol'. pp. 307–364. (Elsevier Inc.) doi:10.1016/B978-0-12-800179-0.00006-4.
- 47) Fotouhi N, Fischer-Stettler M, Lenzoni G, Stolz S, Glauser G, Zeeman SC, Farmer EE (2022) ACA pumps maintain leaf excitability during herbivore onslaught. *Current Biology* **32**, 2517-2528.e6. doi:10.1016/j.cub.2022.03.059.
- 48) Freed C, Adepoju O, Gillaspay G (2020) Can Inositol Pyrophosphates Inform Strategies for Developing Low Phytate Crops? *Plants* **9**, 115. doi:10.3390/plants9010115.
- 49) Fromm J, Lautner S (2007) Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, Cell and Environment* **30**, 249–57. doi:10.1111/j.1365-3040.2006.01614.x.
- 50) Fuglsang AT, Paez-Valencia J, Gaxiola RA (2011) Plant Proton Pumps: Regulatory Circuits Involving H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPase. 'Transporters and Pumps in Plant Signaling'. pp. 39–64 doi:10.1007/978-3-642-14369-4\_2.
- 51) Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF (2014) Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal* **28**, 1317–1330. doi:10.1096/fj.13-235440.
- 52) García Bossi J, Kumar K, Barberini ML, Domínguez GD, Rondón Guerrero YDC, Marino-Buslje C, Obertello M, Muschietti JP, Estevez JM (2020) The role of P-type IIA and P-type IIB Ca<sup>2+</sup>-ATPases in plant development and growth. *J Exp Bot* **71**, 1239–1248. doi:10.1093/jxb/erz521.
- 53) Gilroy S, Read ND, Trewavas AJ (1990) Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure. *Nature* **346**, 769–771. doi:10.1038/346769a0.
- 54) Gobert A, Isayenkov S, Voelker C, Czempinski K, Maathuis FJM (2007) The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K<sup>+</sup> conductance and plays a role in K<sup>+</sup> homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10726–10731. doi:10.1073/PNAS.0702595104.
- 55) Gong X-Q, Bisson MA (2002) Acetylcholine-activated Cl<sup>-</sup> Channel in the *Chara* Tonoplast. *The Journal of Membrane Biology* **188**, 107–113. doi:10.1007/s00232-001-0177-z.

- 56) Gyenes M, Bulychev AA, Kurella GA (1980) Voltage Clamp Studies on the Slow Inward Current during the Excitation of *Nitellopsis obtusa*. *Journal of Experimental Botany* **31**, 589–595.
- 57) Han B, Jiang Y, Cui G, Mi J, Roelfsema MRG, Mouille G, Sechet J, Al-Babili S, Aranda M, Hirt H (2020) CATION-CHLORIDE CO-TRANSPORTER 1 (CCC1) Mediates Plant Resistance against *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiology* **182**, 1052–1065. doi:10.1104/pp.19.01279.
- 58) Hashimoto K, Saito M, Matsuoka H, Iida K, Iida H (2004) Functional Analysis of a Rice Putative Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Channel, OsTPC1, Expressed in Yeast Cells Lacking its Homologous Gene CCH1. *Plant Cell Physiol* **45**, 496–500. <https://academic.oup.com/pcp/article/45/4/496/1922041>.
- 59) Hedrich R (2012) Ion Channels in Plants. *Physiological Reviews* **92**, 1777–1811. doi:10.1152/physrev.00038.2011.
- 60) Hedrich R, Flügge UI, Fernandez JM (1986) Patch-clamp studies of ion transport in isolated plant vacuoles. *FEBS Letters* **204**, 228–232. doi:10.1016/0014-5793(86)80817-1.
- 61) Hedrich R, Fukushima K (2021) On the Origin of Carnivory: Molecular Physiology and Evolution of Plants on an Animal Diet. *Annu Rev Plant Biol* **2021** **72**, 133–153. doi:10.1146/annurev-arplant-080620.
- 62) Hedrich R, Kreuzer I (2023) Demystifying the Venus flytrap action potential. *New Phytologist*. doi:10.1111/nph.19113.
- 63) Hedrich R, Marten I (2011) TPC1 - SV channels gain shape. *Mol Plant* **4**, 428–441. doi:10.1093/mp/ssr017.
- 64) Heilmann I (2016) Phosphoinositide signaling in plant development. *Development (Cambridge)* **143**, 2044–2055. doi:10.1242/dev.136432.
- 65) Heß D, Heise CM, Schubert H, Hess WR, Hagemann M (2023) The impact of salt stress on the physiology and the transcriptome of the model streptophyte green alga *Chara braunii*. doi:10.1111/ppl.14123.
- 66) Heß D, Holzhausen A, Hess WR (2023) Insight into the nodal cells transcriptome of the streptophyte green alga *Chara braunii*. S276. doi:10.1111/ppl.14025.
- 67) Hilleary R, Paez-Valencia J, Vens C, Toyota M, Palmgren M, Gilroy S (2020) Tonoplast-localized Ca<sup>2+</sup> pumps regulate Ca<sup>2+</sup> signals during pattern-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**, 18849–18857. doi:10.1073/PNAS.2004183117.

- 68) Hirsch J, Misson J, Crisp PA, David P, Bayle V, Estavillo GM, Javot H, Chiarenza S, Mallory AC, Maizel A, Declerck M, Pogson BJ, Vaucheret H, Crespi M, Desnos T, Thibaud M-C, Nussaume L, Marin E (2011) A Novel *fry1* Allele Reveals the Existence of a Mutant Phenotype Unrelated to 5'->3' Exoribonuclease (XRN) Activities in *Arabidopsis thaliana* Roots (E Newbigin, Ed.). *PLoS ONE* **6**, e16724. doi:10.1371/journal.pone.0016724.
- 69) Homann U, Thiel G (1994) Cl<sup>-</sup> and K<sup>+</sup> channel currents during the action potential in *Chara*. Simultaneous recording of membrane voltage and patch currents. *The Journal of Membrane Biology* **141**, 297–309. doi:10.1007/BF00235139.
- 70) Iosip AL, Böhm J, Scherzer S, Al-Rasheid KAS, Dreyer I, Schultz J, Becker D, Kreuzer I, Hedrich R (2020) The Venus flytrap trigger hair-specific potassium channel KDM1 can reestablish the K<sup>+</sup> gradient required for hapto-electric signaling. *PLoS Biology* **18**,. doi:10.1371/journal.pbio.3000964.
- 71) Isayenkov S, Isner JC, Maathuis FJM (2010) Vacuolar ion channels: Roles in plant nutrition and signalling. *FEBS Letters* **584**, 1982–1988. doi:10.1016/j.febslet.2010.02.050.
- 72) Jašlan J (2019) R-type currents in *Arabidopsis* guard cells: properties and molecular nature. Doctoral Dissertation, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg. doi:10.25972/OPUS-18883.
- 73) Jašlan D, Dreyer I, Lu J, O'Malley R, Dindas J, Marten I, Hedrich R (2019) Voltage-dependent gating of SV channel TPC1 confers vacuole excitability. *Nature Communications* **10**, 2659. doi:10.1038/s41467-019-10599-x.
- 74) Jašlan J, Marten I, Jakobson L, Arjus T, Deeken R, Sarmiento C, De Angeli A, Brosché M, Kollist H, Hedrich R (2023) ALMT-independent guard cell R-type anion currents. *New Phytologist* **239**, 2225–2234. doi:10.1111/nph.19124.
- 75) Johns S, Hagihara T, Toyota M, Gilroy S (2021) The fast and the furious: Rapid long-range signaling in plants. *Plant Physiol* **185**, 694–706. doi:10.1093/PLPHYS/KIAA098.
- 76) Kaplan B, Sherman T, Fromm H (2007) Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Letters* **581**, 2237–2246. doi:10.1016/J.FEBSLET.2007.02.017.
- 77) Karol KG, McCourt RM, Cimino MT, Delwiche CF (2001) The Closest Living Relatives of Land Plants. *Science* **294**, 2351–2353. doi:10.1126/science.1065156.

- 78) Kataev A, Zherelova OM (1984) Ca<sup>2+</sup>-induced activation and irreversible inactivation of chloride channels in the perfused plasmalemma of *Nitellopsis obtusa*. *General Physiology and Biophysics* **3**, 447–462.
- 79) Katsuhara M, Mimura T, Tazawa M (1991) Patch-clamp study on Ion channels in the tonoplast of *Nitellopsis obtusa*. *Plant Cell Physiology* **32**, 179–184.
- 80) Katsuhara M, Tazawa M (1986) Salt tolerance in *Nitellopsis obtusa*. *Protoplasma* **135**, 155–161. doi:10.1007/BF01277008.
- 81) Kaul S, Koo HL, Jenkins J, Rizzo M, Rooney T, Tallon LJ, Feldblyum T, Nierman W, Benito MI, Lin X, Town CD, Venter JC, Fraser CM, Tabata S, Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, Asamizu E, Kato T, Kotani H, Sasamoto S, Ecker JR, Theologis A, Federspiel NA, Palm CJ, Osborne BI, Shinn P, Dewar K, Kim CJ, Buehler E, Dunn P, Chao Q, Chen H, Theologis A, Osborne BI, Vysotskaia VS, Lenz CA, Kim CJ, Hansen NF, Liu SX, Buehler E, Alta H, Sakano H, Dunn P, Lam B, Pham PK, Chao Q, Nguyen M, Yu G, Chen H, Southwick A, Lee JM, Miranda M, Toriumi MJ, Davis RW, Federspiel NA, Palm CJ, Conway AB, Conn L, Hansen NF, Hootan A, Lam B, Wambutt R, Murphy G, Düsterhöft A, Stiekema W, Pohl T, Entian KD, Terryn N, Volckaert G, Salanoubat M, Choisne N, Artiguenave F, Weissenbach J, Quetier F, Rieger M, Ansorge W, Unseld M, Fartmann B, Valle G, Wilson RK, Sekhon M, Pepin K, Murray J, Johnson D, Hillier L, de la Bastide M, Huang E, Spiegel L, Gnoj L, Habermann K, Dedhia N, Parnell L, Preston R, Marra M, McCombie WR, Chen E, Martienssen R, Mayer K, Lemcke K, Haas B, Haase D, Rudd S, Schoof H, Frishman D, Morgenstern B, Zaccaria P, Mewes HW, White O, Creasy TH, Bielke C, Maiti R, Peterson J, Ermolaeva M, Perteu M, Quackenbush J, Volfovsky N, Wu D, Salzberg SL, Bevan M, Lowe TM, Rounsley S, Bush D, Subramaniam S, Levin I, Norris S, Schmidt R, Acarkan A, Bancroft I, Brennicke A, Eisen JA, Bureau T, Legault BA, Le QH, Agrawal N, Yu Z, Copenhaver GP, Luo S, Preuss D, Pikaard CS, Paulsen IT, Sussman M, Britt AB, Selinger DA, Pandey R, Chandler VL, Jorgensen RA, Mount DW, Pikaard C, Juergens G, Meyerowitz EM, Dangl J, Jones JDG, Chen M, Chory J, Somerville C (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**:6814 **408**, 796–815. doi:10.1038/35048692.
- 82) Kiep V, Vadassery J, Lattke J, Maaß J, Boland W, Peiter E, Mithöfer A (2015) Systemic cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation is activated upon wounding

- and herbivory in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **207**, 996–1004. doi:10.1111/nph.13493.
- 83) Kikuyama M (1986) Tonoplast action potential of Characeae. *Plant and Cell Physiology* **27**, 1461–68.
- 84) Kikuyama M, Shimada K, Hiramoto Y (1993) Cessation of cytoplasmic streaming follows an increase of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> during action potential in *Nitella*. *Protoplasma* **174**, 142–146. doi:10.1007/BF01379046/METRICS.
- 85) Kintzer AF, Stroud RM (2016) Structure, inhibition and regulation of two-pore channel TPC1 from *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **531**, 258–264. doi:10.1038/nature17194.
- 86) Kishimoto U, Takeuchi Y, Ohkawa T-A, Kami-Ike N (1985) A Kinetic Analysis of the Electrogenic Pump of *Chara corallina*: III. Pump Activity during Action Potential. *The Journal of Membrane Biology* **86**, 27–36.
- 87) Kisnierienė V, Ditchenko TI, Kudryashov AP, Sakalauskas V, Yurin VM, Rukšėnas O (2012) The effect of acetylcholine on Characeae K<sup>+</sup> channels at rest and during action potential generation. *Central European Journal of Biology* **7**, 1066–1075. doi:10.2478/s11535-012-0085-5.
- 88) Kisnieriene V, Lapeikaite I, Pupkis V, Beilby MJ (2019) Modeling the Action Potential in Characeae *Nitellopsis obtusa*: Effect of Saline Stress. *Frontiers in Plant Science* **10**, 82. doi:10.3389/fpls.2019.00082.
- 89) Kisnierienė V, Lapeikaitė I, Sevriukova O, Rukšėnas O (2016) The effects of Ni<sup>2+</sup> on electrical signaling of *Nitellopsis obtusa* cells. *Journal of Plant Research* **129**, 551–558. doi:10.1007/s10265-016-0794-3.
- 90) Kisnieriene V, Trębacz K, Pupkis V, Koselski M, Lapeikaite I (2022) Evolution of long-distance signalling upon plant terrestrialization: comparison of action potentials in Characean algae and liverworts. *Annals of Botany* **130**, 457–475. doi:10.1093/aob/mcac098.
- 91) Koselski M, Hoernstein SNW, Wasko P, Reski R, Trebacz K (2023) Long-Distance Electrical and Calcium Signals Evoked by Hydrogen Peroxide in *Physcomitrella*. *Plant And Cell Physiology* **64**, 880–892. doi:10.1093/pcp/pcad051.
- 92) Koselski M, Pupkis V, Hashimoto K, Lapeikaitė I, Hanaka A, Wasko P, Plukaitė E, Kuchitsu K, Kisnieriene V, Trębacz 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**, 647. doi:10.3390/plants10040647.
- 93) Koselski M, Wasko P, Kupisz K, Trebacz K (2019) Cold- and menthol-evoked membrane potential changes in the moss *Physcomitrella patens*: influence of ion channel inhibitors and phytohormones. *Physiologia Plantarum* **167**, 433–446. doi:10.1111/PPL.12918.
- 94) Kourie JI (1994) Transient Cl<sup>-</sup> and K<sup>+</sup> Currents during the Action Potential in *Chara inflata*. *Plant Physiology* **106**, 651–660.
- 95) Krinke O, Novotná Z, Valentová O, Martinec J (2007) Inositol trisphosphate receptor in higher plants: is it real? *Journal of Experimental Botany* **58**, 361–376. doi:10.1093/jxb/er1220.
- 96) Krol E, Dziubińska H, Trebacz K (2004) Low-temperature-induced transmembrane potential changes in mesophyll cells of *Arabidopsis thaliana*, *Helianthus annuus* and *Vicia faba*. *Physiologia Plantarum* **120**, 265–270. doi:10.1111/j.0031-9317.2004.0244.x.
- 97) Król E, Dziubińska H, Trębacz K (2010) What do plants need action potentials for? ‘Action Potential’. (Ed ML DuBois) pp. 1–26. (Nova Science Publishers, Inc.)
- 98) Kunz H-H, Gierth M, Herdean A, Satoh-Cruz M, Kramer DM, Spetea C, Schroeder JI (2014) Plastidial transporters KEA1, -2, and -3 are essential for chloroplast osmoregulation, integrity, and pH regulation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 7480–7485. doi:10.1073/pnas.1323899111.
- 99) Lapeikaitė I, Dragūnaitė U, Pupkis V, Rukšėnas O, Kisnierienė V (2019) Asparagine alters action potential parameters in single plant cell. *Protoplasma* **256**, 511–519.
- 100) Lapeikaitė I, Pupkis V, Neniškis V, Rukšėnas O, Kisnierienė V (2020) Glutamate and NMDA affect cell excitability and action potential dynamics of single cell of macrophyte *Nitellopsis obtusa*. *Functional Plant Biology* **47**, 1032–1040. doi:10.1071/FP20074.
- 101) Larkin DJ, Monfils AK, Boissezon A, Sleith RS, Skawinski PM, Welling CH, Cahill BC, Karol KG (2018) Biology, ecology, and management of starry stonewort (*Nitellopsis obtusa*; Characeae): A Red-listed Eurasian green alga invasive in North America. *Aquatic Botany* **148**, 15–24. doi:10.1016/j.aquabot.2018.04.003.
- 102) Laver DR, Walker NA (1991) Activation by Ca<sup>2+</sup> and block by divalent ions of the K<sup>+</sup> channel in the membrane of cytoplasmic drops from *Chara australis*. *The Journal of Membrane Biology* **120**, 131–139. doi:10.1007/BF01872396.



- 103) Lemtiri-Chlieh F, MacRobbie EAC, Brearley CA (2000) Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating the  $K^+$ -inward rectifying conductance in guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 8687–8692. doi:10.1073/pnas.140217497.
- 104) Lemtiri-Chlieh F, MacRobbie EAC, Webb AAR, Manison NF, Brownlee C, Skepper JN, Chen J, Prestwich GD, Brearley CA (2003) Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells. *PNAS* **100**, 17–21.
- 105) Levchenko V, Konrad KR, Dietrich P, Roelfsema MRG, Hedrich R (2005) Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding  $Ca^{2+}$  signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 4203–4208. doi:10.1073/PNAS.0500146102.
- 106) Li P, Luo T, Pu X, Zhou Y, Yu J, Liu L (2021) Plant transporters: roles in stress responses and effects on growth and development. *Plant Growth Regulation* **93**, 253–266. doi:10.1007/s10725-020-00684-3.
- 107) Li W, Shi G (2019) How  $Ca_v1.2$ -bound verapamil blocks  $Ca^{2+}$  influx into cardiomyocyte: Atomic level views. *Pharmacological Research* **139**, 153–157. doi:10.1016/J.PHRS.2018.11.017.
- 108) Li Y, Zeng H, Xu F, Yan F, Xu W (2022)  $H^+$ -ATPases in Plant Growth and Stress Responses. *Rev Plant Biol* **2022** **73**, 495–521. doi:10.1146/annurev-arplant-102820.
- 109) Lühring H (1986) Recording of single  $K^+$  channels in the membrane of cytoplasmic drop of *Chara australis*. *Protoplasma* **133**, 19–28. doi:10.1007/BF01293183.
- 110) Lunevsky VZ, Zherelova OM, Vostrikov IY, Berestovsky GN (1983) Excitation of Characeae cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels. *The Journal of Membrane Biology* **72**, 43–58. doi:10.1007/BF01870313.
- 111) Maksaev G, Haswell ES (2012) MscS-Like10 is a stretch-activated ion channel from *Arabidopsis thaliana* with a preference for anions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 19015–19020. doi:10.1073/pnas.1213931109.
- 112) Meimoun P, Vidal G, Bohrer A-S, Lehner A, Tran D, Briand J, Bouteau F, Rona J-P (2009) Intracellular  $Ca^{2+}$  stores could participate to abscisic acid-induced depolarization and stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 830–835. doi:10.4161/psb.4.9.9396.
- 113) Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid KAS, Geiger D, Marten I, Martinoia E, Hedrich R (2010) AtALMT12

- represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells. *The Plant Journal* **63**, 1054–1062. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04302.x.
- 114) Michell RH (2008) Inositol derivatives: evolution and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 151–161. doi:10.1038/nrm2334.
- 115) Mills RF, Doherty ML, López-Marqués RL, Weimar T, Dupree P, Palmgren MG, Pittman JK, Williams LE (2008) ECA3, a Golgi-Localized P2A-Type ATPase, Plays a Crucial Role in Manganese Nutrition in Arabidopsis. *Plant Physiology* **146**, 116–128. doi:10.1104/pp.107.110817.
- 116) Moe-Lange J, Gappel NM, Machado M, Wudick MM, Sies CSA, Schott-Verdugo SN, Bonus M, Mishra S, Hartwig T, Bezruczyk M, Basu D, Farmer EE, Gohlke H, Malkovskiy A, Haswell ES, Lercher MJ, Ehrhardt DW, Frommer WB, Kleist TJ (2021) Interdependence of a mechanosensitive anion channel and glutamate receptors in distal wound signaling. *Science Advances* **7**,. doi:10.1126/sciadv.abg4298.
- 117) Mousavi SAR, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE (2013) GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* **500**, 422–426. doi:10.1038/nature12478.
- 118) Mukherjee A (2015) Computational analysis of a cys-loop ligand gated ion channel from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Biology* **49**, 742–754. doi:10.1134/S002689331505012X.
- 119) Munnik T, Vermeer JEM (2010) Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. *Plant, Cell & Environment* **33**, 655–669. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02097.x.
- 120) Murthy SE, Dubin AE, Whitwam T, Jojoa-Cruz S, Cahalan SM, Mousavi SAR, Ward AB, Patapoutian A (2018) OSCA/TMEM63 are an evolutionarily conserved family of mechanically activated ion channels. *ELife* **7**,. doi:10.7554/eLife.41844.
- 121) Nakahiro M, Arakawa O, Narahashi T, Ukai S, Kato Y, Nishinuma K, Nishimura T (1992) Dimethyl sulfoxide (DMSO) blocks GABA-induced current in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience Letters* **138**, 5–8. doi:10.1016/0304-3940(92)90459-K.
- 122) Nardid OA, Schetinskey MI, Kucherenko Y V. (2013) Dimethyl sulfoxide at high concentrations inhibits non-selective cation channels in human erythrocytes. *General Physiology and Biophysics* **32**, 23–32. doi:10.4149/gpb\_2013004.

- 123) Naylor E, Arredouani A, Vasudevan SR, Lewis AM, Parkesh R, Mizote A, Rosen D, Thomas JM, Izumi M, Ganesan A, Galione A, Churchill GC (2009) Identification of a chemical probe for NAADP by virtual screening. *NATURE CHEMICAL BIOLOGY* **5**, doi:10.1038/nchembio.150.
- 124) Nedelyaeva OI, Shuvalov A V., Balnokin Yu V. (2020) Chloride Channels and Transporters of the CLC Family in Plants. *Russian Journal of Plant Physiology* **67**, 767–784. doi:10.1134/S1021443720050106.
- 125) Nicolai C, Sachs F (2014) Solving Ion Channel Kinetics with the QuB Software. *Biophysical Reviews and Letters* **8**, 191–211. doi:10.1142/s1793048013300053.
- 126) Nishiyama T, Sakayama H, de Vries J, Buschmann H, Saint-Marcoux D, Ullrich KK, Haas FB, Vanderstraeten L, Becker D, Lang D, Vosolsobě S, Rombauts S, Wilhelmsson PKI, Janitza P, Kern R, Heyl A, Rümpler F, Villalobos LIAC, Clay JM, Skokan R, Toyoda A, Suzuki Y, Kagoshima H, Schijlen E, Tajeshwar N, Catarino B, Hetherington AJ, Saltykova A, Bonnot C, Breuninger H, Symeonidi A, Radhakrishnan G V, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Chang C, Karol KG, Hedrich R, Ulvskov P, Glöckner G, Delwiche CF, Petrášek J, Van de Peer Y, Friml J, Beilby M, Dolan L, Kohara Y, Sugano S, Fujiyama A, Delaux PM, Quint M, Theißen G, Hagemann M, Harholt J, Dunand C, Zachgo S, Langdale J, Maumus F, Van Der Straeten D, Gould SB, Rensing SA (2018) The *Chara* Genome: Secondary Complexity and Implications for Plant Terrestrialization. *Cell* **174**, 448-464.e24. doi:10.1016/j.cell.2018.06.033.
- 127) Novikova EM, Vodeneev VA, Sukhov VS (2017) Mathematical model of action potential in higher plants with account for the involvement of vacuole in the electrical signal generation. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* **11**, 151–167. doi:10.1134/S1990747817010068.
- 128) Okazaki Y, Ishigami M, Iwasaki N (2002) Temporal relationship between cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and membrane potential during hypotonic turgor regulation in a brackish water charophyte *Lamprothamnium succinctum*. *Plant and Cell Physiology* **43**, 1027–1035. doi:10.1093/pcp/pcf127.
- 129) Okihara K, Ohkawa T, Tsutsui I, Kasai M (1991) A Ca<sup>2+</sup>- and Voltage-Dependent Cl<sup>-</sup>-sensitive Anion Channel in the *Chara* Plasmalemma: A Patch-Clamp Study. *Plant and Cell Physiology* **32**, 593–601. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a078121.

- 130) Opritov VA, Lobov SA, Pyatygin SS, Mysyagin SA (2005) Analysis of possible involvement of local bioelectric responses in chilling perception by higher plants exemplified by *Cucurbita pepo*. *Russian Journal of Plant Physiology* **52**, 801–808. doi:10.1007/S11183-005-0118-2/METRICS.
- 131) Othmer HG (1997) Signal Transduction and Second Messenger Systems. ‘Case studies in mathematical modeling - ecology, physiology and cell biology’. (Eds HG Othmer, FR Adler, MA Lewis, J Dallon) pp. 101–128. (Englewood Cliffs, NJ, Prentice Hall) doi:10.1093/acprof:oso/9780195152227.003.0016.
- 132) Padmanaban S, Chanroj S, Kwak JM, Li X, Ward JM, Sze H (2007) Participation of endomembrane cation/H<sup>+</sup> exchanger AtCHX20 in osmoregulation of guard cells. *Plant Physiology* **144**, 82–93. doi:10.1104/pp.106.092155.
- 133) Pantoja O (2021) Recent Advances in the Physiology of Ion Channels in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **72**, 463–495. doi:10.1146/annurev-arplant-081519.
- 134) Patapoutian A (2005) TRP Channels and Thermosensation. *Chemical Senses* **30**, i193–i194. doi:10.1093/CHEMSE/BJH180.
- 135) Pei D, Hua D, Deng J, Wang Z, Song C, Wang Y, Wang Y, Qi J, Kollist H, Yang S, Guo Y, Gong Z (2022) Phosphorylation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase AHA2 by BAK1 is required for ABA-induced stomatal closure in Arabidopsis. *The Plant Cell* **34**, 2708–2729. doi:10.1093/PLCELL/KOAC106.
- 136) Peiter E, Maathuis FJM, Mills LN, Knight H, Pelloux J, Hetherington AM, Sanders D (2005) The vacuolar Ca<sup>2+</sup>-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* **434**, 404–408. doi:10.1038/nature03381.
- 137) Perera IY, Hung C-Y, Brady S, Muday GK, Boss WF (2006) A Universal Role for Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Mediated Signaling in Plant Gravitropism. *Plant Physiology* **140**, 746–760. doi:10.1104/pp.105.075119.
- 138) Pertl-Obermeyer H, Lackner P, Schulze WX, Hoepflinger MC, Hoeflberger M, Foissner I, Obermeyer G (2018) Dissecting the subcellular membrane proteome reveals enrichment of H<sup>+</sup> (co-)transporters and vesicle trafficking proteins in acidic zones of *Chara* internodal cells (JL Heazlewood, Ed.). *PLOS ONE* **13**, e0201480. doi:10.1371/journal.pone.0201480.
- 139) Phipps S, Delwiche CF, Bisson MA (2021) Salinity-induced Changes in Gene Expression in the Streptophyte Alga *Chara*: The

- Critical Role of a Rare Na<sup>+</sup>-ATPase (X Johnson, Ed.). *Journal of Phycology* **57**, 1004–1013. doi:10.1111/jpy.13166.
- 140) Phipps S, Goodman CA, Delwiche CF, Bisson MA (2021) The role of ion-transporting proteins in the evolution of salt tolerance in charophyte algae. *Journal of Phycology* **57**, 1014–1025. doi:10.1111/jpy.13160.
- 141) Piñeros M, Tester M (1997) Characterization of the High-Affinity Verapamil Binding Site in a Plant Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-selective Channel. *Journal of Membrane Biology* **157**, 139–145. doi:10.1007/s002329900223.
- 142) Plieth C, Sattelmacher B, Hansen UP, Thiel G (1998) The action potential in *Chara*: Ca<sup>2+</sup> release from internal stores visualized by Mn<sup>2+</sup>-induced quenching of fura-dextran. *Plant Journal* **13**, 167–175. doi:10.1046/j.1365-313X.1998.00019.x.
- 143) Pottosin I, Dobrovinskaya O (2014) Non-selective cation channels in plasma and vacuolar membranes and their contribution to K<sup>+</sup> transport. *Journal of Plant Physiology* **171**, 732–742. doi:10.1016/j.jplph.2013.11.013.
- 144) Pottosin II, Tikhonova LI, Hedrich R, Schönknecht G (1997) Slowly activating vacuolar channels can not mediate Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release. *The Plant Journal* **12**, 1387–1398. doi:10.1046/j.1365-313x.1997.12061387.x.
- 145) Pottosin I, Wherrett T, Shabala S, Schroeder J (2009) SV channels dominate the vacuolar Ca<sup>2+</sup> release during intracellular signaling. doi:10.1016/j.febslet.2009.02.009.
- 146) Puga MI, Mateos I, Charukesi R, Wang Z, Franco-Zorrilla JM, De Lorenzo L, Irigoyen ML, Masiero S, Bustos R, Rodríguez J, Leyva A, Rubio V, Sommer H, Paz-Ares J (2014) SPX1 is a phosphate-dependent inhibitor of Phosphate Starvation Response 1 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 14947–14952. doi:10.1073/PNAS.1404654111.
- 147) Pupkis V, Buisas R, Lapeikaite I, Kisnieriene V (2021) Using Plant Cells of *Nitellopsis obtusa* for Biophysical Education. *The Biophysicist* **2**, 18–29. doi:10.35459/tbp.2019.000130.
- 148) Pyatygin SS (2008) Are there different velocity types of action potentials in higher plants? *Biophysics* **53**, 81–86. doi:10.1134/S0006350908010132.

- 149) Pyatygin SS, Opritov VA, Vodeneev VA (2008) Signaling role of action potential in higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* **55**, 285–291. doi:10.1134/s1021443708020179.
- 150) Radin I, Richardson RA, Coomey JH, Weiner ER, Bascom CS, Li T, Bezanilla M, Haswell ES (2021) Plant PIEZO homologs modulate vacuole morphology during tip growth. *Science* **373**, 586–590. doi:10.1126/science.abe6310.
- 151) Ranf S, Wünnenberg P, Lee J, Becker D, Dunkel M, Hedrich R, Scheel D, Dietrich P (2008) Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca<sup>2+</sup> signals induced by abiotic and biotic stresses. *Plant Journal* **53**, 287–299. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03342.x.
- 152) Reyer A, Häßler M, Scherzer S, Huang S, Pedersen JT, Al-Rasheid KAS, Bamberg E, Palmgren M, Dreyer I, Nagel G, Hedrich R, Becker D (2020) Channelrhodopsin-mediated optogenetics highlights a central role of depolarization-dependent plant proton pumps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**, 20920–20925. doi:10.1073/PNAS.2005626117.
- 153) Rossier MF, Python CP, Capponi AM, Schlegel W, Kwan CY, Vallotton MB (1993) Blocking T-type calcium channels with tetrandrine inhibits steroidogenesis in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* **132**, 1035–1043. doi:10.1210/endo.132.3.8382595.
- 154) Sakurai Y, Kolokoltsov AA, Chen C-C, Tidwell MW, Bauta WE, Klugbauer N, Grimm C, Wahl-Schott C, Biel M, Davey RA (2015) Two-pore channels control Ebola virus host cell entry and are drug targets for disease treatment. *Science* **347**, 995–998. doi:10.1126/science.1258758.
- 155) Salvador-Recatalà V (2016) New roles for the *GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE 3.3*, *3.5*, and *3.6* genes as on/off switches of wound-induced systemic electrical signals. *Plant Signaling & Behavior* **11**, e1161879. doi:10.1080/15592324.2016.1161879.
- 156) Scherzer S, Böhm J, Huang S, Iosip AL, Kreuzer I, Becker D, Heckmann M, Al-Rasheid KAS, Dreyer I, Hedrich R (2022) A unique inventory of ion transporters poises the Venus flytrap to fast-propagating action potentials and calcium waves. *Current Biology* **32**, 4255-4263.e5. doi:10.1016/j.cub.2022.08.051.
- 157) Scherzer S, Huang S, Iosip A, Kreuzer I, Yokawa K, Al-Rasheid KAS, Heckmann M, Hedrich R (2022) Ether anesthetics prevents

- touch-induced trigger hair calcium-electrical signals excite the Venus flytrap. *Scientific Reports* **12**, 2851. doi:10.1038/s41598-022-06915-z.
- 158) Schiøtt M, Romanowsky SM, Bækgaard L, Jakobsen MK, Palmgren MG, Harper JF (2004) A plant plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 9502–9507. doi:10.1073/pnas.0401542101.
- 159) Schöler A, Zaharieva I, Zimmermann S, Wiechen M, Manke AM, Kurz P, Plieth C, Dau H (2014) Biogenic manganese-calcium oxides on the cell walls of the algae *Chara corallina*: Elemental composition, atomic structure, and water-oxidation Catalysis. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2014**, 780–790. doi:10.1002/ejic.201300697.
- 160) Schumaker KS, Sze H (1987) Inositol 1,4,5-Trisphosphate Releases  $\text{Ca}^{2+}$  from Vacuolar Membrane Vesicles of Oat Roots. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **262**, 3944–3946.
- 161) Sharma T, Dreyer I, Riedelsberger J (2013) The role of  $\text{K}^+$  channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* **4**,. doi:10.3389/fpls.2013.00224.
- 162) Sharma A, Singh A (2023) A review on plant annexins: The calcium binding proteins with multifaceted roles in plant growth, development and stress tolerance. *South African Journal of Botany* **162**, 108–114. doi:10.1016/j.sajb.2023.08.068.
- 163) Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu FF, Sharon M, Browse J, He SY, Rizo J, Howe GA, Zheng N (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1–JAZ co-receptor. *Nature* **2010** 468:7322 **468**, 400–405. doi:10.1038/nature09430.
- 164) Shiina T, Tazawa M (1987) Demonstration and Characterization of  $\text{Ca}^{2+}$  Channel in Tonoplast-Free Cells of *Nitellopsis obtusa*. *The Journal of Membrane Biology* **96**, 263–276.
- 165) Shiina T, Tazawa M (1988)  $\text{Ca}^{2+}$ -Dependent  $\text{Cl}^-$  Efflux in Tonoplast-Free Cells of *Nitellopsis Obtusa*. *The Journal of Membrane Biology* **139**, 135–139.
- 166) Shimmen T (2007) The sliding theory of cytoplasmic streaming: fifty years of progress. *Journal of Plant Research* **120**, 31–43. doi:10.1007/s10265-006-0061-0.
- 167) Shimmen T, Mimura T, Kikuyama M, Tazawa M (1994) Characean cells as a tool for studying electrophysiological characteristics of plant cells. *Cell Structure and Function* **19**, 263–278. doi:10.1247/csf.19.263.

- 168) Stevenson-Paulik J, Bastidas RJ, Chiou S-T, Frye RA, York JD (2005) Generation of phytate-free seeds in *Arabidopsis* through disruption of inositol polyphosphate kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 12612–12617. doi:10.1073/pnas.0504172102.
- 169) Sukhov V, Sukhova E, Vodeneev V (2019) Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **146**, 63–84. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2018.11.009.
- 170) Sze H, Schumacher K, Müller ML, Padmanaban S, Taiz L (2002) A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. [http://plants.trends.com/1360-1385/02/\\$-seeFrontmatter](http://plants.trends.com/1360-1385/02/$-seeFrontmatter).
- 171) Tan X, Calderon-Villalobos LIA, Sharon M, Zheng C, Robinson C V., Estelle M, Zheng N (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**, 640–645. doi:10.1038/nature05731.
- 172) Tan Y-Q, Yang Y, Shen X, Zhu M, Shen J, Zhang W, Hu H, Wang Y-F (2023) Multiple cyclic nucleotide-gated channels function as ABA-activated Ca<sup>2+</sup> channels required for ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **35**, 239–259. doi:10.1093/plcell/koac274.
- 173) Tazawa M, Kikuyama M (2003) Is Ca<sup>2+</sup> release from internal stores involved in membrane excitation in characean cells? *Plant and Cell Physiology* **44**, 518–526. doi:10.1093/pcp/pcg065.
- 174) Tester M, MacRobbie EAC (1990) Cytoplasmic calcium affects the gating of potassium channels in the plasma membrane of *Chara corallina*: a whole-cell study using calcium-channel effectors. *Planta* **180**, 569–581. doi:10.1007/BF02411456.
- 175) Thiel G, Homann U, Plieth C (1997) Ion channel activity during the action potential in *Chara*: new insights with new techniques. *Journal of Experimental Botany* **48**, 609–622. doi:10.1093/jxb/48.Special\_Issue.609.
- 176) Thiel G, MacRobbie EAC, Hanke D (1990) Raising the intracellular level of inositol 1,4,5-trisphosphate changes plasma membrane ion transport in characean algae. *The EMBO Journal* **9**, 1737–1741. doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb08297.x.
- 177) Tian Y, Schreiber R, Kunzelmann K (2012) Anoctamins are a family of Ca<sup>2+</sup> activated Cl<sup>-</sup> channels. *Journal of Cell Science* **125**, 4991–4998. doi:10.1242/jcs.109553.



- 178) Tsutsui I, Ohkawa T (1993) N-Ethylmaleimide Blocks the H<sup>+</sup> Pump in the Plasma Membrane of *Chara corallina* Internodal Cells. *Plant and Cell Physiology* **34**, 1159–1162. doi:10.1093/OXFORDJOURNALS.PCP.A078532.
- 179) Tsutsui I, Ohkawa T, Nagai R, Kishimoto U (1987a) Role of Calcium Ion in the Excitability and Electrogenic Pump Activity of the *Chara corallina* Membrane: II. Effects of La<sup>3+</sup>, EGTA, and Calmodulin Antagonists on the Current-Voltage Relation. *The Journal of Membrane Biology* **96**, 75–84.
- 180) Tsutsui I, Ohkawa T, Nagai R, Kishimoto U (1987b) Role of calcium ion in the excitability and electrogenic pump activity of the *Chara corallina* membrane: I. Effects of La<sup>3+</sup>, verapamil, EGTA, W-7, and TFP on the action potential. *The Journal of Membrane Biology* **96**, 65–73. doi:https://doi.org/10.1007/BF01869335.
- 181) Tunçer S, Gurbanov R, Sheraj I, Solel E, Esenturk O, Banerjee S (2018) Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes. *Scientific RepoRTS /* **8**, 14828. doi:10.1038/s41598-018-33234-z.
- 182) Tyerman SD, Findlay GP (1989) Current-Voltage Curves of Single Cl<sup>-</sup> Channels which Coexist with Two Types of K<sup>+</sup> Channel in the Tonoplast of *Chara corallina*. *Journal of Experimental Botany* **40**, 105–117.
- 183) Umrath K (1930) Untersuchungen über Plasma und Plasmaströmung an Characeen. *Protoplasma* **9**, 576–597. doi:10.1007/BF01943373.
- 184) Velez-Ramirez AI, Van Ieperen W, Vreugdenhil D, Millenaar FF (2011) Plants under continuous light. *Trends in Plant Science* **16**, 310–318. doi:10.1016/j.tplants.2011.02.003.
- 185) Vincent TR, Avramova M, Canham J, Higgins P, Bilkey N, Mugford ST, Pitino M, Toyota M, Gilroy S, Miller AJ, Hogenhout SA, Sanders D (2017) Interplay of plasma membrane and vacuolar ion channels, together with BAK1, elicits rapid cytosolic calcium elevations in Arabidopsis during aphid feeding. *Plant Cell* **29**, 1460–1479. doi:10.1105/tpc.17.00136.
- 186) Vitart V, Baxter I, Doerner P, Harper JF (2001) Evidence for a role in growth and salt resistance of a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the root endodermis. *Plant Journal* **27**, 191–201. doi:10.1046/j.1365-313X.2001.01081.x.

- 187) Vodeneev V, Katicheva LA, Sukhov VS (2016) Electrical signals in higher plants: Mechanisms of generation and propagation. *Biophysics (Russian Federation)* **61**, 505–512. doi:10.1134/S0006350916030209.
- 188) Voelker C, Gomez-Porrás JL, Becker D, Hamamoto S, Uozumi N, Gambale F, Mueller-Roeber B, Czempinski K, Dreyer I (2010) Roles of tandem-pore K<sup>+</sup> channels in plants - a puzzle still to be solved. *Plant Biol* **12**, 56–63. doi:10.1111/j.1438-8677.2010.00353.x.
- 189) De Vriese K, Costa A, Beeckman T, Vanneste S (2018) Pharmacological Strategies for Manipulating Plant Ca<sup>2+</sup> Signalling. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 1–26. doi:10.3390/ijms19051506.
- 190) Wacke M, Thiel G (2001) Electrically Triggered All-or-None Ca<sup>2+</sup>-liberation during Action Potential in the Giant Alga *Chara*. *The Journal of General Physiology* **118**, 11–22. doi:10.1085/jgp.118.1.11.
- 191) Wacke M, Thiel G, Hütt MT (2003) Ca<sup>2+</sup> dynamics during membrane excitation of green alga *Chara*: Model simulations and experimental data. *Journal of Membrane Biology* **191**, 179–192. doi:10.1007/s00232-002-1054-0.
- 192) Wang X, Feng C, Tian LL, Hou C, Tian W, Hu B, Zhang Q, Ren Z, Niu Q, Song J, Kong D, Liu L, He Y, Ma L, Chu C, Luan S, Li L (2021) A transceptor–channel complex couples nitrate sensing to calcium signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **14**, 774–786. doi:10.1016/j.molp.2021.02.005.
- 193) Wang Y-F, Munemasa S, Nishimura N, Ren H-M, Robert N, Han M, Puzõrjova I, Kollist H, Lee S, Mori I, Schroeder JI (2013) Identification of Cyclic GMP-Activated Nonselective Ca<sup>2+</sup>-Permeable Cation Channels and Associated *CNGC5* and *CNGC6* Genes in *Arabidopsis* Guard Cells. *Plant Physiology* **163**, 578–590. doi:10.1104/pp.113.225045.
- 194) Wang ZF, Xie ZM, Tan YL, Li JY, Wang FL, Pei D, Li Z, Guo Y, Gong Z, Wang Y (2022) Receptor-like protein kinase BAK1 promotes K<sup>+</sup> uptake by regulating H<sup>+</sup>-ATPase AHA2 under low potassium stress. *Plant Physiology* **189**, 2227–2243. doi:10.1093/PLPHYS/KIAC237.
- 195) Ward JM, Schroeder JI (1994) Calcium-Activated K<sup>+</sup> Channels and Calcium-Induced Calcium Release by Slow Vacuolar Ion Channels in Guard Cell Vacuoles Implicated in the Control of Stomatal Closure. *The Plant Cell* **6**, 669–683.
- 196) Watanabe K, Hashimoto K, Hasegawa K, Shindo H, Tsuruda Y, Kupisz K, Koselski M, Wasko P, Trebacz K, Kuchitsu K (2024) Rapid Propagation of Ca<sup>2+</sup> Waves and Electrical Signals in the Liverwort

- Marchantia polymorpha*. *Plant And Cell Physiology*. doi:10.1093/pcp/pcad159.
- 197) White PJ (2000) Calcium channels in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**, 171–189.
- 198) Wiegand H, Meis S, Gotzsch U (1990) Inhibition by tetrandrine of calcium currents at mouse motor nerve endings. *Brain Research* **524**, 112–118. doi:10.1016/0006-8993(90)90499-2.
- 199) Williamson R, Ashley CC (1982) Free Ca<sup>2+</sup> and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*. *Nature* **296**, 647–651. doi:10.1038/296647a0.
- 200) Winter U, Kirst GO, Grabowski V, Heinemann U, Plettner I, Wiese S (1999) Salinity tolerance in *Nitellopsis obtusa*. *Australian Journal of Botany* **47**, 337–346. doi:10.1071/BT97091.
- 201) Wu Z, Liang F, Hong B, Young JC, Sussman MR, Harper JF, Sze H (2002) An Endoplasmic Reticulum-Bound Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> Pump, ECA1, Supports Plant Growth and Confers Tolerance to Mn<sup>2+</sup> Stress. doi:10.1104/pp.004440.
- 202) Xiong L, Lee BH, Ishitani M, Lee H, Zhang C, Zhu JK (2001) FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is negative regulator of abscisic acid and stress signaling in Arabidopsis. *Genes and Development* **15**, 1971–1984. doi:10.1101/gad.891901.
- 203) Zhang S, Habets M, Breuninger H, Dolan L, Offringa R, van Duijn B (2020) Evolutionary and Functional Analysis of a *Chara* Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Frontiers in Plant Science* **10**,. doi:10.3389/fpls.2019.01707.
- 204) Zhang J, Vanneste S, Brewer PB, Michniewicz M, Grones P, Kleine-Vehn J, Löffke C, Teichmann T, Bielach A, Cannoot B, Hoyerová K, Chen X, Xue HW, Benková E, Zažímalová E, Friml J (2011) Inositol trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> signaling modulates auxin transport and pin polarity. *Developmental Cell* **20**, 855–866. doi:10.1016/j.devcel.2011.05.013.
- 205) Zhang M, Wang D, Kang Y, Wu J-X, Yao F, Pan C, Yan Z, Song C, Chen L (2018) Structure of the mechanosensitive OSCA channels. *Nature Structural & Molecular Biology* **25**, 850–858. doi:10.1038/s41594-018-0117-6.
- 206) Zhang X-H, Yu X-Z, Yue D-M (2016) Phytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) to rice seedlings. *International Journal of Environmental Science and Technology* **13**, 607–614. doi:10.1007/s13762-015-0899-6.

- 207) Zhang C, Zhang Q, Liu JL, An Q, Long T, Xing Y, Cao QQ, Qin L, Fang KF (2022) Verapamil Affected Pollen Germination and Tube Elongation through Altering Calcium Dynamics, Actin Filaments and Cell Wall Components in Apple (*Malus domestica*). *Russian Journal of Plant Physiology* **69**, 1–10. doi:10.1134/S1021443722050235/FIGURES/7.
- 208) Zherelova OM (1989a) Activation of chloride channels in the plasmalemma of *Nitella syncarpa* by inositol 1,4,5-trisphosphate. *FEBS Letters* **249**, 105–107. doi:10.1016/0014-5793(89)80025-0.
- 209) Zherelova OM (1989b) Ca<sup>2+</sup> channels in *Nitellopsis obtusa* (Characeae) cell plasmalemma and regulation of their activity. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology* **94**, 141–145. doi:10.1016/0300-9629(89)90798-6.
- 210) Zherelova OM, Grishchenko VM, Chaylakhyan LM (1994) Blockers of Ca<sup>2+</sup> channels in the plasmalemma of perfused Characeae cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **107**, 475–480. doi:10.1016/1367-8280(94)90079-5.
- 211) Zherelova OM, Kataev AA, Grishchenko VM, Knyazeva EL, Permyakov SE, Permyakov EA (2009) Interaction of antitumor  $\alpha$ -lactalbumin-oleic acid complexes with artificial and natural membranes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **41**, 229–237. doi:10.1007/s10863-009-9222-x.
- 212) Zhu X, Pan T, Zhang X, Fan L, Quintero FJ, Zhao H, Su X, Li X, Villalta I, Mendoza I, Shen J, Jiang L, Pardo JM, Qiu QS (2018) K<sup>+</sup> efflux antiporters 4, 5, and 6 mediate pH and K<sup>+</sup> homeostasis in endomembrane compartments. *Plant Physiology* **178**, 1657–1678. doi:10.1104/pp.18.01053.

## PRIEDAI

**P1 lentelė.** 0,1 mM verapamilo poveikis elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrams, CC protokolais, n = 4. Pateikti verčių vidurkiai ± SD. „T“ šalia p verčių reiškia taikytą Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	Verapamilas, 0,1 mM	p
Membranos ramybės potencialas $RP$ (mV)	-221±8	-208±16	0,116 T
Membranos laidumas ramybės būsenoje $G_{RP}$ ( $S \cdot m^{-2}$ )	0,39±0,12	0,40±0,13	0,952 T
VP sužadavimo slenkstis $E_{th}$ (mV)	-89±2	-92±5	0,404 T
VP smailė (mV)	40±12	48±7	0,359 T
VP amplitudė (mV)	129±13	140±9	0,313 T
VP depoliarizacijos trukmė $t_{dep}(s)$	0,4±0,1	0,4±0,1	0,804 T
VP repoliarizacijos trukmė $t_{rep}(s)$	1±0,1	1±0,1	0,289 T

**P2 lentelė.** 0,1 mM verapamilo poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{leak}$  srovei, VC3 protokolais, n = 5. Pateikti verčių vidurkiai ± SD. „T“ šalia p verčių reiškia taikytą Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	Verapamilas, 0,1 mM	p
$I_{leak}$ (-120 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	2,3±0,7	3,5±1,4	0,249 T
$I_{leak}$ (-100 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	3,2±0,8	4,3±1,6	0,103 T
$I_{leak}$ (-80 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	3,9±1,2	4,9±1,8	0,088 T
$I_{leak}$ (-60 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	4,6±1,3	5,5±1,9	0,143 T
$I_{leak}$ (-40 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	5,2±1,6	6,4±2,2	0,140 T
$I_{leak}$ (-20 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	5,9±2,4	7,3±2,8	0,123 T
$I_{leak}$ (0 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	5,8±2,7	7,9±3	0,278 T
$I_{leak}$ (20 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	6,4±0,9	9,2±3,3	0,131 T
$I_{leak}$ (40 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	8,7±1,4	10,5±3	0,215 T
$I_{leak}$ (60 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	10,8±1,9	12,2±3,1	0,292 T

**P3 lentelė.** 0,1 mM verapamilo poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{Ca}$  srovei, VC3 protokolais, n = 5. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	Verapamilas, 0,1 mM	p
$I_{Ca}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-9,5 $\pm$ 6,4	-8,9 $\pm$ 3,2	0,623 T
$I_{Ca}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-10,6 $\pm$ 6	-7,7 $\pm$ 2,3	0,199 T
$I_{Ca}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-7,9 $\pm$ 3,6	-6,8 $\pm$ 2,7	0,070 T
$I_{Ca}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-5,9 $\pm$ 3,3	-5,6 $\pm$ 2,9	0,494 T
$I_{Ca}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-3,8 $\pm$ 3,9	-2,6 $\pm$ 2,2	0,373 T
$I_{Ca}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2,6 $\pm$ 3,2	-1 $\pm$ 2,5	0,166 W
$I_{Ca}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-0,4 $\pm$ 1,8	-0,6 $\pm$ 2,6	>0,999 W
$I_{Ca}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,3 $\pm$ 1,6	0,6 $\pm$ 2	0,261 T

**P4 lentelė.** 0,1 mM verapamilo poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{Cl}$  srovei, VC3 protokolais, n = 5. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	Verapamilas, 0,1 mM	p
$I_{Cl}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-28 $\pm$ 12	-27 $\pm$ 4	0,549 T
$I_{Cl}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-26 $\pm$ 10	-22 $\pm$ 6	0,286 T
$I_{Cl}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-23 $\pm$ 11	-17 $\pm$ 5	0,184 T
$I_{Cl}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-19 $\pm$ 11	-14 $\pm$ 4	0,275 T
$I_{Cl}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-17 $\pm$ 9	-12 $\pm$ 4	0,259 T
$I_{Cl}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-14 $\pm$ 8	-12 $\pm$ 4	0,659 T
$I_{Cl}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-12 $\pm$ 6	-12 $\pm$ 4	0,922 T
$I_{Cl}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-9 $\pm$ 5	-10 $\pm$ 4	0,908 T

**P5 lentelė.** 0,1 mM verapamilo poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{CaCl}$  srovei, VC3 protokolas, n = 5. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	Verapamilas, 0,1 mM	p
$I_{CaCl}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-38 $\pm$ 17	-36 $\pm$ 7	0,561 T
$I_{CaCl}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-36 $\pm$ 15	-30 $\pm$ 7	0,224 T
$I_{CaCl}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-31 $\pm$ 14	-24 $\pm$ 6	0,154 T
$I_{CaCl}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-25 $\pm$ 13	-20 $\pm$ 5	0,267 T
$I_{CaCl}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-21 $\pm$ 12	-15 $\pm$ 4	0,125 W
$I_{CaCl}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-17 $\pm$ 11	-13 $\pm$ 3	>0,999 W
$I_{CaCl}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-13 $\pm$ 8	-13 $\pm$ 5	0,985 T
$I_{CaCl}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-10 $\pm$ 6	10 $\pm$ 4	0,875 W

**P6 lentelė.** 0,1 mM verapamilo poveikis *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių aktyvacijos trukmei  $t_{act}$ , VC3 protokolas, n = 5. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	Verapamilas, 0,1 mM	p
$t_{act}$ (-80 mV) (s)	0,9 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 0,1	0,130 T
$t_{act}$ (-60 mV) (s)	0,9 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 0,2	0,042 T
$t_{act}$ (-40 mV) (s)	0,9 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 0,2	0,050 T
$t_{act}$ (-20 mV) (s)	0,9 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,2	0,091 T
$t_{act}$ (0 mV) (s)	0,9 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,2	0,058 W
$t_{act}$ (20 mV) (s)	1 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	0,025 T
$t_{act}$ (40 mV) (s)	1 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,2	0,120 T
$t_{act}$ (60 mV) (s)	1,1 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,2	0,208 T

**P7 lentelė.** 0,1 mM verapamilo poveikis *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių inaktyvacijos trukmei  $t_{inact}$ , VC3 protokolas, n = 5. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	Verapamilas, 0,1 mM	p
$t_{inact}$ (-80 mV) (s)	1,6 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,3	0,047 T
$t_{inact}$ (-60 mV) (s)	1,6 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,5	0,012 T
$t_{inact}$ (-40 mV) (s)	1,7 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,5	0,004 T
$t_{inact}$ (-20 mV) (s)	1,6 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,7	0,018 T
$t_{inact}$ (0 mV) (s)	1,9 $\pm$ 0,6	2,5 $\pm$ 0,8	0,227 T
$t_{inact}$ (20 mV) (s)	2,1 $\pm$ 1,2	2,8 $\pm$ 1	0,152 T
$t_{inact}$ (40 mV) (s)	2,9 $\pm$ 3	3,5 $\pm$ 1,4	0,875 W
$t_{inact}$ (60 mV) (s)	1,4 $\pm$ 0,3	3,7 $\pm$ 2	0,082 T

**P8 lentelė.** 0,1 mM verapamilo poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_K$  srovei, VC3 protokolas, n = 5. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „T“ šalia p verčių reiškia taikytą Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	Verapamilas, 0,1 mM	p
$I_K$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,5 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 1,3	0,902 T
$I_K$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,1 $\pm$ 1,2	-0,5 $\pm$ 1,2	0,178 T
$I_K$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1 $\pm$ 1,4	-0,5 $\pm$ 1,7	0,368 T
$I_K$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1 $\pm$ 1,4	-0,3 $\pm$ 1,5	0,190 T
$I_K$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,5 $\pm$ 2,9	0,4 $\pm$ 1,7	0,956 T
$I_K$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	1,2 $\pm$ 3,4	0 $\pm$ 2,3	0,266 T
$I_K$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2,4 $\pm$ 2,7	0,9 $\pm$ 1,8	0,140 T
$I_K$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2,2 $\pm$ 2,5	0,8 $\pm$ 1,8	0,200 T



**P9 lentelė.** 0,3 mM verapamilo poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{leak}$  srovei, VC3 protokolais, n = 10. Pateikti verčių vidurkiai ± SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	Verapamilas, 0,3 mM	p
$I_{leak}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2,5±0,8	3,2±1,1	0,399 T
$I_{leak}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	3,5±1,1	3,6±1	0,939 T
$I_{leak}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	4,2±1,3	4,2±1,1	0,593 T
$I_{leak}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	5±1,4	4,7±1,4	0,384 T
$I_{leak}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	5,6±1,6	5,6±1,7	0,529 T
$I_{leak}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	6,5±1,9	6,6±2	0,185 T
$I_{leak}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	8±2,7	8,4±1,9	0,547 W
$I_{leak}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	9,2±3,3	9,2±2,6	0,359 W
$I_{leak}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	11,7±4,1	11,6±2,4	0,825 T

**P10 lentelė.** 0,3 mM verapamilo poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{Ca}$  srovei, VC3 protokolais, n = 10. Pateikti verčių vidurkiai ± SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	Verapamilas, 0,3 mM	p
$I_{Ca}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-11,6±5,1	-13±6,4	>0,999 W
$I_{Ca}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-9,7±4,6	-8,2±3,1	0,143 T
$I_{Ca}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-9,7±5,9	-11,2±7,4	0,686 T
$I_{Ca}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-8,4±4,5	-7,2±5,5	0,469 W
$I_{Ca}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-5,6±2,4	-5,4±4,7	0,688 W
$I_{Ca}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2,8±3,5	-2,5±3,6	0,781 T
$I_{Ca}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,1±3,1	-5±2,5	0,833 W
$I_{Ca}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	1,1±3,6	0,4±2,5	0,937 W
$I_{Ca}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	1,8±3,6	1,7±1,2	>0,999 W

**P11 lentelė.** 0,3 mM verapamilo poveikis *Nitelloopsis obtusa*  $I_{Cl}$  srovei, VC3 protokolas, n = 10. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „T“ šalia p verčių reiškia taikytą Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	Verapamilas, 0,3 mM	p
$I_{Cl}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-47 $\pm$ 19	-41 $\pm$ 25	0,760 T
$I_{Cl}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-37 $\pm$ 13	-25 $\pm$ 8	0,389 T
$I_{Cl}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-30 $\pm$ 11	-23 $\pm$ 9	0,175 T
$I_{Cl}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-25 $\pm$ 10	-19 $\pm$ 7	0,295 T
$I_{Cl}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-19 $\pm$ 8	-16 $\pm$ 6	0,682 T
$I_{Cl}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-15 $\pm$ 6	-14 $\pm$ 7	0,605 T
$I_{Cl}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-13 $\pm$ 7	-12 $\pm$ 6	0,788 T
$I_{Cl}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-8 $\pm$ 8	-10 $\pm$ 5	0,381 T
$I_{Cl}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-4 $\pm$ 9	-7 $\pm$ 6	0,466 T

**P12 lentelė.** 0,3 mM verapamilo poveikis *Nitelloopsis obtusa*  $I_{CaCl}$  srovei, VC3 protokolas, n = 10. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „T“ šalia p verčių reiškia taikytą Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	Verapamilas, 0,3 mM	p
$I_{CaCl}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-57 $\pm$ 20	-47 $\pm$ 19	0,390 T
$I_{CaCl}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-42 $\pm$ 17	-30 $\pm$ 9	0,499 T
$I_{CaCl}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-37 $\pm$ 14	-30 $\pm$ 15	0,230 T
$I_{CaCl}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-32 $\pm$ 12	-25 $\pm$ 11	0,261 T
$I_{CaCl}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-24 $\pm$ 10	-21 $\pm$ 10	0,799 T
$I_{CaCl}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-17 $\pm$ 7	-17 $\pm$ 10	0,639 T
$I_{CaCl}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-13 $\pm$ 8	-12 $\pm$ 8	0,740 T
$I_{CaCl}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-8 $\pm$ 9	-11 $\pm$ 7	0,368 T
$I_{CaCl}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-5 $\pm$ 10	-7 $\pm$ 6	0,466 T

**P13 lentelė.** 0,3 mM verapamilo poveikis *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių aktyvacijos trukmei  $t_{act}$ , VC3 protokolais, n = 10. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	Verapamilas, 0,3 mM	p
$t_{act}$ (-100 mV) (s)	0,9 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,3	0,002 T
$t_{act}$ (-80 mV) (s)	0,9 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,5	0,016 W
$t_{act}$ (-60 mV) (s)	1 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 1,1	0,013 T
$t_{act}$ (-40 mV) (s)	1 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,8	0,002 T
$t_{act}$ (-20 mV) (s)	1 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,8	0,003 T
$t_{act}$ (0 mV) (s)	1,2 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,8	0,023 W
$t_{act}$ (20 mV) (s)	1,1 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,7	<0,001 T
$t_{act}$ (40 mV) (s)	1,2 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,9	0,009 T
$t_{act}$ (60 mV) (s)	1,2 $\pm$ 0,2	2 $\pm$ 0,7	0,015 T

**P14 lentelė.** 0,3 mM verapamilo poveikis *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių inaktyvacijos trukmei  $t_{inact}$ , VC3 protokolais, n = 10. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	Verapamilas, 0,1 mM	p
$t_{inact}$ (-100 mV) (s)	1,3 $\pm$ 0,2	3,9 $\pm$ 1,5	0,010 T
$t_{inact}$ (-80 mV) (s)	1,7 $\pm$ 0,4	5,3 $\pm$ 2,7	0,016 T
$t_{inact}$ (-60 mV) (s)	1,9 $\pm$ 0,6	5,8 $\pm$ 2,3	0,003 T
$t_{inact}$ (-40 mV) (s)	2,1 $\pm$ 0,7	8,1 $\pm$ 6,1	0,014 W
$t_{inact}$ (-20 mV) (s)	2,1 $\pm$ 0,7	8,7 $\pm$ 6,6	0,016 W
$t_{inact}$ (0 mV) (s)	2,3 $\pm$ 0,8	7,1 $\pm$ 2,7	0,004 T
$t_{inact}$ (20 mV) (s)	2,4 $\pm$ 0,8	7,8 $\pm$ 2,7	<0,001 T
$t_{inact}$ (40 mV) (s)	2,3 $\pm$ 0,7	7,3 $\pm$ 2,1	0,007 T
$t_{inact}$ (60 mV) (s)	2 $\pm$ 0,8	7,1 $\pm$ 3	0,016 T

**P15 lentelė.** 0,3 mM verapamilo poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_K$  srovei, VC3 protokolas, n = 10. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	Verapamilas, 0,1 mM	p
$I_K$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,7 $\pm$ 1	-3,3 $\pm$ 1,4	0,090 T
$I_K$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,1 $\pm$ 1	-1,8 $\pm$ 1,2	0,590 W
$I_K$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,4 $\pm$ 1,3	-1,4 $\pm$ 2,2	0,250 T
$I_K$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,2 $\pm$ 1,6	-1,7 $\pm$ 2,6	0,024 T
$I_K$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	1,1 $\pm$ 2,2	-1,9 $\pm$ 3,3	0,024 T
$I_K$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2 $\pm$ 2,8	-1,6 $\pm$ 3,4	0,009 T
$I_K$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	3,5 $\pm$ 4,3	-1,1 $\pm$ 2,7	0,017 T
$I_K$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2,9 $\pm$ 2,7	-1,2 $\pm$ 3,1	0,003 T
$I_K$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2,2 $\pm$ 2,3	0 $\pm$ 2,7	0,032 T

**P16 lentelė.** 1 mM verapamilo poveikis elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrams, CC protokolas, n = 6. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	Verapamilas, 1 mM	p
Membranos ramybės potencialas $RP$ (mV)	-212 $\pm$ 15	-112 $\pm$ 21	<0,001 T
Membranos laidumas ramybės būsenoje $G_{RP}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	0,35 $\pm$ 0,09	0,36 $\pm$ 0,06	0,552 T
VP sužadavimo slenkstis $E_{th}$ (mV)	-104 $\pm$ 12	-79 $\pm$ 24	0,125 W
VP smailė (mV)	37 $\pm$ 13	35 $\pm$ 18	0,699 T
VP amplitudė (mV)	143 $\pm$ 9	114 $\pm$ 41	0,173 T
VP depoliarizacijos trukmė $t_{dep}$ (s)	1,1 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,5	<0,001 T
VP repoliarizacijos trukmė $t_{rep}$ (s)	3,8 $\pm$ 0,9	43 $\pm$ 29	0,020 T

**P17 lentelė.** 1 mM verapamilo poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{leak}$  srovei, VC3 protokolas, n = 4. Pateikti verčių vidurkiai ± SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	Verapamilas, 1 mM	p
$I_{leak}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2,9±08	2,4±0,8	0,500 W
$I_{leak}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	3,4±1	2,8±0,8	0,340 T
$I_{leak}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	3,9±1,4	3,8±0,5	0,684 T
$I_{leak}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	4,6±1,5	4,9±0,3	0,675 T
$I_{leak}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	5,3±1,6	6,3±0,4	0,759 T
$I_{leak}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	6,4±1,4	7,6±0,5	0,500 W
$I_{leak}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	7,3±1,3	8,6±1,2	0,439 T
$I_{leak}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	8,4±1,6	10,7±1,4	0,234 T
$I_{leak}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	9,8±1,4	10,7±0,5	>0,999 W

**P18 lentelė.** 1 mM verapamilo poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{Ca}$  srovei, VC3 protokolas, n = 4. Pateikti verčių vidurkiai ± SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	Verapamilas, 1 mM	p
$I_{Ca}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-7,1±1,7	-9,5±0,5	0,500 W
$I_{Ca}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-8,3±1,2	-6,3±0,3	0,500 W
$I_{Ca}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-7±1,6	-3±1,6	0,500 W
$I_{Ca}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-5,1±1,3	-2,9±1,1	0,500 W
$I_{Ca}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2,4±2,6	-2,3±2	0,500 W
$I_{Ca}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,5±2,7	-1,7±1,7	0,500 W
$I_{Ca}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,2±2,9	-1,2±1,1	>0,999 W

**P19 lentelė.** 1 mM verapamilo poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{Cl}$  srovei, VC3 protokolais, n = 4. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	Verapamilas, 1 mM	p
$I_{Cl}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-30 $\pm$ 7	-24 $\pm$ 3	0,274 T
$I_{Cl}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-23 $\pm$ 7	-20 $\pm$ 3	0,749 T
$I_{Cl}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-19 $\pm$ 5	-10 $\pm$ 5	0,190 T
$I_{Cl}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-15 $\pm$ 4	-8 $\pm$ 5	0,152 T
$I_{Cl}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-12 $\pm$ 4	-7 $\pm$ 3	0,092 T
$I_{Cl}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-8 $\pm$ 3	-5 $\pm$ 2	0,250 W
$I_{Cl}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-4 $\pm$ 3	-4 $\pm$ 2	0,556 T
$I_{Cl}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1 $\pm$ 4	-3 $\pm$ 2	0,500 W

**P20 lentelė.** 1 mM verapamilo poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{CaCl}$  srovei, VC3 protokolais, n = 4. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	Verapamilas, 1 mM	p
$I_{CaCl}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-38 $\pm$ 7	-31 $\pm$ 5	0,500 W
$I_{CaCl}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-31 $\pm$ 7	-24 $\pm$ 7	0,541 T
$I_{CaCl}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-26 $\pm$ 5	-12 $\pm$ 5	0,113 T
$I_{CaCl}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-20 $\pm$ 4	-10 $\pm$ 5	0,151 T
$I_{CaCl}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-14 $\pm$ 5	-8 $\pm$ 4	0,192 T
$I_{CaCl}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-10 $\pm$ 4	-6 $\pm$ 3	0,529 T
$I_{CaCl}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-5 $\pm$ 5	-5 $\pm$ 3	0,500 W
$I_{CaCl}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2 $\pm$ 5	-3 $\pm$ 2	>0,999 W

**P21 lentelė.** 1 mM verapamilo poveikis *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių aktyvacijos trukmei  $t_{act}$ , VC3 protokolais,  $n = 4$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	Verapamilas, 1 mM	p
$t_{act}$ (-80 mV) (s)	0,9 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 2,6	0,215 T
$t_{act}$ (-60 mV) (s)	0,9 $\pm$ 0,1	6,1 $\pm$ 3,6	0,122 T
$t_{act}$ (-40 mV) (s)	0,9 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 2,2	0,103 T
$t_{act}$ (-20 mV) (s)	0,9 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 1,2	0,047 T
$t_{act}$ (0 mV) (s)	1 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,4	0,005 T
$t_{act}$ (20 mV) (s)	1 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,4	0,007 T
$t_{act}$ (40 mV) (s)	1,1 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,7	0,045 T
$t_{act}$ (60 mV) (s)	1,1 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,9	0,500 W

	Kontrolė	Verapamilas, 0,3 mM	p		Kontrolė	Verapamilas, 0,3 mM	p
$I$ (-120 mV) (pA)	-6,8 $\pm$ 0,7	-7,7 $\pm$ 0,6	0,02 T	$P_o$ (-120 mV)	0,23 $\pm$ 0,29	0,06 $\pm$ 0,07	0,121 W
$I$ (-100 mV) (pA)	-6,1 $\pm$ 0,7	-7,1 $\pm$ 0,6	0,014 W	$P_o$ (-100 mV)	0,16 $\pm$ 0,15	0,08 $\pm$ 0,13	0,152 W
$I$ (-80 mV) (pA)	-5,2 $\pm$ 0,6	-6,2 $\pm$ 0,8	0,014 T	$P_o$ (-80 mV)	0,15 $\pm$ 0,12	0,03 $\pm$ 0,03	0,016 W
$I$ (-60 mV) (pA)	-4,1 $\pm$ 0,9	-4,7 $\pm$ 0,8	0,206 T	$P_o$ (-60 mV)	0,18 $\pm$ 0,15	0,04 $\pm$ 0,07	0,018 W
$I$ (-40 mV) (pA)	-3 $\pm$ 0,9	-3,6 $\pm$ 1,1	0,210 W	$P_o$ (-40 mV)	0,12 $\pm$ 0,12	0,03 $\pm$ 0,03	0,018 W
$I$ (-20 mV) (pA)	-1,6 $\pm$ 0,8	-2,6 $\pm$ 1,4	0,172 T	$P_o$ (-20 mV)	0,17 $\pm$ 0,11	0,06 $\pm$ 0,06	0,027 T
$I$ (0 mV) (pA)	-1,1 $\pm$ 0,7	-1,3 $\pm$ 1,5	0,850 T	$P_o$ (0 mV)	0,22 $\pm$ 0,10	0,10 $\pm$ 0,08	0,155 T
$I$ (20 mV) (pA)	1,2 $\pm$ 0,9	0,8 $\pm$ 1	0,420 T	$P_o$ (20 mV)	0,21 $\pm$ 0,15	0,06 $\pm$ 0,08	0,101 W
$I$ (40 mV) (pA)	2,4 $\pm$ 0,9	2 $\pm$ 0,9	0,514 T	$P_o$ (40 mV)	0,25 $\pm$ 0,18	0,14 $\pm$ 0,18	0,190 W
$I$ (60 mV) (pA)	3,6 $\pm$ 1	3,5 $\pm$ 1	0,858 T	$P_o$ (60 mV)	0,29 $\pm$ 0,20	0,13 $\pm$ 0,11	0,061 T
$I$ (80 mV) (pA)	4,7 $\pm$ 1,1	3,7 $\pm$ 1	0,088 W	$P_o$ (80 mV)	0,28 $\pm$ 0,21	0,11 $\pm$ 0,10	0,064 T
$I$ (100 mV) (pA)	5,4 $\pm$ 1,5	4,7 $\pm$ 1,3	0,339 T	$P_o$ (100 mV)	0,33 $\pm$ 0,20	0,14 $\pm$ 0,13	0,066 T
$I$ (120 mV) (pA)	5,7 $\pm$ 1,5	5 $\pm$ 1,8	0,463 T	$P_o$ (120 mV)	0,28 $\pm$ 0,19	0,20 $\pm$ 0,21	0,476 T

**P1 pav.** 0,3 mM koncentracijos verapamilo tirpalo poveikis *Nitellopsis obtusa* citoplazminių lašų membranų  $K^+$  kanalų aktyvumui: srovių, tekančių per pavienius kanalus (kairėje) ir kanalų atsidarymo tikimybės (dešinėje) ties skirtingomis MP vertėmis.  $n = 8-9$ . „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų nepriklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų nepriklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ).

**P22 lentelė.** 0,1 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 0,75 % DMSO poveikis elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrams, CC protokolais, n = 5. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su kontrole ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	Tetrandrinas, 0,1 mM	DMSO, 0,75 %
Membranos rambės potencialas $RP$ (mV)	-201 $\pm$ 22	-169 $\pm$ 25	-163 $\pm$ 15
Membranos laidumas rambės būsenoje $G_{RP}$ ( $S \cdot m^{-2}$ )	0,42 $\pm$ 0,11	0,33 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,07
VP sužadavimo slenkstis $E_{th}$ (mV)	-71 $\pm$ 5	-82 $\pm$ 8	-92 $\pm$ 13
VP smailė (mV)	30 $\pm$ 4	26 $\pm$ 5	33 $\pm$ 9
VP amplitudė (mV)	101 $\pm$ 7	107 $\pm$ 10	127 $\pm$ 15
VP depoliarizacijos trukmė $t_{dep}$ (s)	1,6 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,3
VP repoliarizacijos trukmė $t_{rep}$ (s)	3,1 $\pm$ 0,5	10,7 $\pm$ 5	6,9 $\pm$ 2,5



Tetrandrinas 0,1 mM				Tetrandrinas 0,2 mM			
<b>Membranos rambybės potencialas <math>R_P</math></b>				<b>Membranos rambybės potencialas <math>R_P</math></b>			
Anova, $F(2,8) = 7,72, p=0,014$				Anova, $F(2,18) = 7,47, p=0,004$			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,168	0,005	Kontrolė		0,018	0,075
Tetrandrinas 0,1 mM	0,169		>0,999	Tetrandrinas 0,2 mM	0,018		0,753
DMSO 0,75%	0,005	>0,999		DMSO 1,5%	0,075	>0,999	
<b>Membranos laidumas rambybės būsenoje <math>G_{RP}</math></b>				<b>Membranos laidumas rambybės būsenoje <math>G_{RP}</math></b>			
Anova, $F(2,8) = 5,2, p=0,074$				Friedman test, $\chi^2(2) = 9,8, p=0,007$			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,375	0,188	Kontrolė		0,006	0,111
Tetrandrinas 0,1 mM	0,375		>0,999	Tetrandrinas 0,2 mM	0,006		0,111
DMSO 0,75%	0,188	>0,999		DMSO 1,5%	0,111	>0,999	
<b>VP sužadinimo slenkstis <math>E_{th}</math></b>				<b>VP sužadinimo slenkstis <math>E_{th}</math></b>			
Anova, $F(2,8) = 7,52, p=0,015$				Anova, $F(2,18) = 8,02, p=0,003$			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,04	0,091	Kontrolė		0,004	0,933
Tetrandrinas 0,1 mM	0,04		0,558	Tetrandrinas 0,2 mM	0,004		0,058
DMSO 0,75%	0,091	0,358		DMSO 1,5%	0,933	0,058	
<b>VP smailė</b>				<b>VP smailė</b>			
Anova, $F(2,8) = 3,13, p=0,099$				Anova, $F(2,18) = 4,53, p=0,026$			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,375	0,527	Kontrolė		0,011	0,153
Tetrandrinas 0,1 mM	0,375		0,366	Tetrandrinas 0,2 mM	0,011		>0,999
DMSO 0,75%	0,927	0,366		DMSO 1,5%	0,153	>0,999	
<b>VP amplitudė</b>				<b>VP amplitudė</b>			
Anova, $F(2,8) = 6,4, p=0,041$				Anova, $F(2,18) = 14,39, p<0,001$			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,564	0,188	Kontrolė		<0,001	0,033
Tetrandrinas 0,1 mM	0,564		0,125	Tetrandrinas 0,2 mM	<0,001		0,348
DMSO 0,75%	0,188	0,125		DMSO 1,5%	0,033	0,348	
<b>VP depolarizacijos trukmė <math>t_{dep}</math></b>				<b>VP depolarizacijos trukmė <math>t_{dep}</math></b>			
Anova, $F(2,8) = 1,2, p=0,549$				Friedman test, $\chi^2(2) = 7,8, p=0,02$			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,936	0,936	Kontrolė		0,041	0,029
Tetrandrinas 0,1 mM	0,936		0,188	Tetrandrinas 0,2 mM	0,041		>0,999
DMSO 0,75%	0,936	0,188		DMSO 1,5%	0,029	>0,999	
<b>VP repolarizacijos trukmė <math>t_{rep}</math></b>				<b>VP repolarizacijos trukmė <math>t_{rep}</math></b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 10, p=0,007$				Friedman test, $\chi^2(2) = 16,8, p<0,001$			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,188	0,188	Kontrolė		0,006	0,006
Tetrandrinas 0,1 mM	0,188		0,188	Tetrandrinas 0,2 mM	0,006		0,393
DMSO 0,75%	0,188	0,188		DMSO 1,5%	0,006	0,393	

**P2 pav.** 0,1 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 0,75 % DMSO (n = 5) bei 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO (n = 10) poveikio elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrams (CC protokolas) statistinė analizė.

**P23 lentelė.** 0,1 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 0,75 % DMSO poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{leak}$  srovei, VC3 protokolais, n = 5. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD.

	Kontrolė	Tetrandrinai, 0,1 mM	DMSO, 0,75 %
$I_{leak}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	3,5 $\pm$ 1,4	3,5 $\pm$ 1,2	2,5 $\pm$ 0,7
$I_{leak}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	4,3 $\pm$ 1,3	4,2 $\pm$ 1,3	3,3 $\pm$ 1
$I_{leak}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	4,7 $\pm$ 1,4	4,5 $\pm$ 1,7	3,7 $\pm$ 1
$I_{leak}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	5,3 $\pm$ 1,6	5,2 $\pm$ 2	4,3 $\pm$ 1
$I_{leak}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	5,9 $\pm$ 1,7	5,9 $\pm$ 2,3	4,8 $\pm$ 1
$I_{leak}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	6,4 $\pm$ 1,7	6,7 $\pm$ 2,5	5,6 $\pm$ 1,3
$I_{leak}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	7,2 $\pm$ 1,8	7,4 $\pm$ 2,6	6,4 $\pm$ 1,3
$I_{leak}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	8,1 $\pm$ 2	8,4 $\pm$ 2,8	7,7 $\pm$ 1,6
$I_{leak}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	9 $\pm$ 2	9,3 $\pm$ 2,8	8,5 $\pm$ 1,8

Tetradrinas 0,1 mM				Tetradrinas 0,2 mM			
<b>I<sub>leak</sub> (-100 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (-100 mV)</b>			
Anova, F(2,6) = 1,75, p=0,251				Friedman test, $\chi^2(2) = 7,19$ , p=0,028			
	Kontrolė	Tetradrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetradrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	0,561	Kontrolė		0,047	0,178
Tetradrinas 0,1 mM	>0,999		0,179	Tetradrinas 0,2 mM	0,047		>0,999
DMSO 0,75%	0,561	0,179		DMSO 1,5%	0,178	>0,999	
<b>I<sub>leak</sub> (-80 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (-80 mV)</b>			
Anova, F(2,8) = 2,47, p=0,146				Anova, F(2,18) = 12,21, p<0,001			
	Kontrolė	Tetradrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetradrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	0,387	Kontrolė		0,006	0,019
Tetradrinas 0,1 mM	>0,999		0,134	Tetradrinas 0,2 mM	0,006		>0,999
DMSO 0,75%	0,387	0,134		DMSO 1,5%	0,019	>0,999	
<b>I<sub>leak</sub> (-60 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (-60 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 2,8$ , p=0,247				Friedman test, $\chi^2(2) = 5,6$ , p=0,061			
	Kontrolė	Tetradrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetradrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	0,375	Kontrolė		0,082	0,111
Tetradrinas 0,1 mM	>0,999		0,375	Tetradrinas 0,2 mM	0,082		>0,999
DMSO 0,75%	0,375	0,375		DMSO 1,5%	0,111	>0,999	
<b>I<sub>leak</sub> (-40 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (-40 mV)</b>			
Anova, F(2,8) = 1,97, p=0,202				Friedman test, $\chi^2(2) = 7,4$ , p=0,025			
	Kontrolė	Tetradrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetradrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	0,13	Kontrolė		0,029	0,252
Tetradrinas 0,1 mM	>0,999		0,741	Tetradrinas 0,2 mM	0,029		>0,999
DMSO 0,75%	0,13	0,741		DMSO 1,5%	0,252	>0,999	
<b>I<sub>leak</sub> (-20 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (-20 mV)</b>			
Anova, F(2,8) = 1,79, p=0,227				Friedman test, $\chi^2(2) = 5,6$ , p=0,061			
	Kontrolė	Tetradrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetradrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	0,108	Kontrolė		0,111	0,111
Tetradrinas 0,1 mM	>0,999		0,768	Tetradrinas 0,2 mM	0,111		>0,999
DMSO 0,75%	0,108	0,768		DMSO 1,5%	0,111	>0,999	
<b>I<sub>leak</sub> (0 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (0 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 0,45$ , n.s.				Friedman test, $\chi^2(2) = 2,4$ , p=0,301			
	Kontrolė	Tetradrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetradrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		n.s.	n.s.	Kontrolė		0,966	0,696
Tetradrinas 0,1 mM	n.s.		n.s.	Tetradrinas 0,2 mM	0,966		>0,999
DMSO 0,75%	n.s.	n.s.		DMSO 1,5%	0,696	>0,999	
<b>I<sub>leak</sub> (20 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (20 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 1,6$ , 0,449				Anova, F(2,20) = 0,64, p=0,539			
	Kontrolė	Tetradrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetradrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	0,375	Kontrolė		0,762	>0,999
Tetradrinas 0,1 mM	>0,999		>0,999	Tetradrinas 0,2 mM	0,762		>0,999
DMSO 0,75%	0,375	>0,999		DMSO 1,5%	>0,999	>0,999	
<b>I<sub>leak</sub> (40 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (40 mV)</b>			
Anova, F(2,8) = 0,34, p=0,721				Anova, F(2,20) = 0,75, 0,487			
	Kontrolė	Tetradrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetradrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	>0,999	Kontrolė		>0,999	>0,999
Tetradrinas 0,1 mM	>0,999		>0,999	Tetradrinas 0,2 mM	>0,999		0,681
DMSO 0,75%	>0,999	>0,999		DMSO 1,5%	>0,999	0,681	
<b>I<sub>leak</sub> (60 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (60 mV)</b>			
Anova, F(2,8) = 0,36, 0,707				Friedman test, $\chi^2(2) = 0,25$ , 0,882			
	Kontrolė	Tetradrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetradrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	>0,999	Kontrolė		>0,999	>0,999
Tetradrinas 0,1 mM	>0,999		>0,999	Tetradrinas 0,2 mM	>0,999		0,609
DMSO 0,75%	>0,999	>0,999		DMSO 1,5%	>0,999	0,609	

**P3 pav.** 0,1 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 0,75 % DMSO (n = 5) bei 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO (n = 10) poveikio *Nitellopsis obtusa* I<sub>leak</sub> srovei (VC3 protokolas) statistinė analizė.

**P24 lentelė.** 0,1 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 0,75 % DMSO poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{Ca}$  srovei, VC3 protokolais, n = 5. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su kontrole ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	Tetrandrinas, 0,1 mM	DMSO, 0,75 %
$I_{Ca}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-7,9 $\pm$ 1,8	-7,1 $\pm$ 2,5	-6,7 $\pm$ 2
$I_{Ca}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-6 $\pm$ 1,3	-4,6 $\pm$ 1,7	-5,3 $\pm$ 1,8
$I_{Ca}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-4,7 $\pm$ 1,4	-3,3 $\pm$ 1	-4,5 $\pm$ 2,4
$I_{Ca}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-3,6 $\pm$ 1,6	-1,9 $\pm$ 1,5	-3,7 $\pm$ 1,9
$I_{Ca}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2 $\pm$ 1,6	-0,4 $\pm$ 1,5	-1,4 $\pm$ 1,6
$I_{Ca}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,3 $\pm$ 1,6	0,8 $\pm$ 1,8	-0,2 $\pm$ 1,6
$I_{Ca}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-0,6 $\pm$ 1,7	1,8 $\pm$ 2,1	1 $\pm$ 0,8
$I_{Ca}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0 $\pm$ 1,6	2,5 $\pm$ 2,4	1,6 $\pm$ 0,9

Tetrandinas 0,1 mM				Tetrandinas 0,2 mM			
<b>I<sub>Ca</sub> (-80 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub> (-100 mV)</b>			
Anova, F(2,8) = 0,29, p=0,286				Anova, F(2,4) = 1,17, p=0,399			
Kontrolė	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
		>0,999	0,608	Kontrolė		0,126	>0,999
Tetrandinas 0,1 mM			>0,999	Tetrandinas 0,2 mM		0,126	0,93
DMSO 0,75%		0,606	>0,999	DMSO 1,5%		>0,999	0,93
<b>I<sub>Ca</sub> (-60 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub> (-80 mV)</b>			
Anova, F(2,8) = 1,29, p=0,326				Anova, F(2,16) = 2,12, p=0,152			
Kontrolė	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
		0,17	>0,999	Kontrolė		0,298	>0,999
Tetrandinas 0,1 mM			>0,999	Tetrandinas 0,2 mM		0,298	0,2
DMSO 0,75%		>0,999	>0,999	DMSO 1,5%		>0,999	0,2
<b>I<sub>Ca</sub> (-40 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub> (-60 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 1,6$ , p=0,449				Friedman test, $\chi^2(2) = 3,8$ , p=0,15			
Kontrolė	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
		0,375	>0,999	Kontrolė		0,082	0,111
Tetrandinas 0,1 mM			0,936	Tetrandinas 0,2 mM		0,082	0,966
DMSO 0,75%		>0,999	0,936	DMSO 1,5%		0,111	0,966
<b>I<sub>Ca</sub> (-20 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub> (-40 mV)</b>			
Anova, F(2,8) = 3,12, p=0,1				Anova, F(2,18) = 3,9, p=0,039			
Kontrolė	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
		0,232	>0,999	Kontrolė		0,049	0,092
Tetrandinas 0,1 mM			0,174	Tetrandinas 0,2 mM		0,049	>0,999
DMSO 0,75%		>0,999	0,174	DMSO 1,5%		0,092	>0,999
<b>I<sub>Ca</sub> (0 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub> (-20 mV)</b>			
Anova, F(2,8) = 3,12, p=0,1				Anova, F(2,16) = 6,5, p=0,028			
Kontrolė	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
		0,031	0,717	Kontrolė		0,001	0,069
Tetrandinas 0,1 mM			>0,999	Tetrandinas 0,2 mM		0,001	0,816
DMSO 0,75%		0,717	>0,999	DMSO 1,5%		0,069	0,816
<b>I<sub>Ca</sub> (20 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub> (0 mV)</b>			
Anova, F(2,8) = 8,11, p=0,012				Anova, F(2,18) = 8,45, p=0,003			
Kontrolė	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
		0,014	0,248	Kontrolė		0,002	0,024
Tetrandinas 0,1 mM			>0,999	Tetrandinas 0,2 mM		0,002	>0,999
DMSO 0,75%		0,248	>0,999	DMSO 1,5%		0,024	>0,999
<b>I<sub>Ca</sub> (40 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub> (20 mV)</b>			
Anova, F(2,8) = 10,09, p=0,007				Friedman test, $\chi^2(2) = 16,55$ , p<0,001			
Kontrolė	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
		0,013	0,147	Kontrolė		0,003	0,003
Tetrandinas 0,1 mM			>0,999	Tetrandinas 0,2 mM		0,003	>0,999
DMSO 0,75%		0,147	>0,999	DMSO 1,5%		0,003	>0,999
<b>I<sub>Ca</sub> (60 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub> (40 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 5,2$ , p=0,074				Friedman test, $\chi^2(2) = 16,55$ , p<0,001			
Kontrolė	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
		0,188	0,375	Kontrolė		0,047	0,047
Tetrandinas 0,1 mM			>0,999	Tetrandinas 0,2 mM		0,047	>0,999
DMSO 0,75%		0,375	>0,999	DMSO 1,5%		0,047	>0,999

**P4 pav.** 0,1 mM tetrandino ir jo tirpiklio 0,75 % DMSO (n = 5) bei 0,2 mM tetrandino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO (n = 10) poveikio *Nitellopsis obtusa* I<sub>Ca</sub> srovei (VC3 protokolais) statistinė analizė.

**P25 lentelė.** 0,1 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 0,75 % DMSO poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{Cl}$  srovei, VC3 protokolais, n = 5. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD.

	Kontrolė	Tetrandrinas, 0,1 mM	DMSO, 0,75 %
$I_{Cl}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-11 $\pm$ 4	-12 $\pm$ 4	-12 $\pm$ 6
$I_{Cl}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-11 $\pm$ 5	-11 $\pm$ 2	-11 $\pm$ 4
$I_{Cl}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-11 $\pm$ 4	-10 $\pm$ 2	-11 $\pm$ 3
$I_{Cl}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-10 $\pm$ 4	-9 $\pm$ 2	-9 $\pm$ 2
$I_{Cl}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-8 $\pm$ 3	-8 $\pm$ 1	-8 $\pm$ 2
$I_{Cl}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-7 $\pm$ 2	-6 $\pm$ 1	-7 $\pm$ 2
$I_{Cl}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-5 $\pm$ 3	-3 $\pm$ 1	-6 $\pm$ 2
$I_{Cl}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2 $\pm$ 3	-2 $\pm$ 1	-4 $\pm$ 1

Tetrandrinas 0,1 mM				Tetrandrinas 0,2 mM			
				<b>I<sub>CI</sub> (-100 mV)</b>			
				Anova, F(2,4) = 27,79, p=0,005			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	>0,999			0,025	0,109
Tetrandrinas 0,2 mM	>0,999		>0,999		0,025		>0,999
DMSO 1,5%	>0,999	>0,999			0,109	>0,999	
				<b>I<sub>CI</sub> (-80 mV)</b>			
				Anova, F(2,16) = 9,36, p=0,002			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	>0,999			0,029	0,065
Tetrandrinas 0,1 mM	>0,999		>0,999		0,025		0,169
DMSO 0,75%	>0,999	>0,999			0,065	0,169	
				<b>I<sub>CI</sub> (-60 mV)</b>			
				Friedman test, $\chi^2(2) = 14,6, p < 0,001$			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	0,218			0,006	0,146
Tetrandrinas 0,1 mM	>0,999		>0,999		0,006		0,111
DMSO 0,75%	0,218	>0,999			0,146	0,111	
				<b>I<sub>CI</sub> (-40 mV)</b>			
				Friedman test, $\chi^2(2) = 14,6, p < 0,001$			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	>0,999			0,006	0,082
Tetrandrinas 0,1 mM	>0,999		>0,999		0,006		0,041
DMSO 0,75%	>0,999	>0,999			0,082	0,041	
				<b>I<sub>CI</sub> (-20 mV)</b>			
				Anova, F(2,16) = 12,47, p<0,001			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	>0,999			0,002	0,17
Tetrandrinas 0,1 mM	>0,999		>0,999		0,002		0,075
DMSO 0,75%	>0,999	>0,999			0,17	0,075	
				<b>I<sub>CI</sub> (0 mV)</b>			
				Anova, F(2,8) = 0,74, p=0,507			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	0,058			0,002	0,6
Tetrandrinas 0,1 mM	>0,999		>0,999		0,002		0,14
DMSO 0,75%	0,058	>0,999			0,6	0,14	
				<b>I<sub>CI</sub> (20 mV)</b>			
				Anova, F(2,20) = 7,04, p=0,005			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	0,534			0,012	0,246
Tetrandrinas 0,1 mM	>0,999		0,399		0,012		0,285
DMSO 0,75%	0,534	0,399			0,246	0,285	
				<b>I<sub>CI</sub> (40 mV)</b>			
				Anova, F(2,20) = 4,22, p=0,03			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	0,957			0,097	0,234
Tetrandrinas 0,1 mM	>0,999		0,216		0,097		>0,999
DMSO 0,75%	0,957	0,216			0,234	>0,999	
				<b>I<sub>CI</sub> (60 mV)</b>			
				Anova, F(2,14) = 3,38, p=0,063			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	>0,999			0,146	0,453
Tetrandrinas 0,1 mM	>0,999		0,071		0,146		>0,999
DMSO 0,75%	>0,999	0,071			0,453	>0,999	

**P5 pav.** 0,1 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 0,75 % DMSO (n = 5) bei 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO (n = 10) poveikio *Nitellopsis obtusa* I<sub>CI</sub> srovei (VC3 protokolas) statistinė analizė.

**P26 lentelė.** 0,1 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 0,75 % DMSO poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{CaCl}$  srovei, VC3 protokolas, n = 5. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD.

	Kontrolė	Tetrandrinas, 0,1 mM	DMSO, 0,75 %
$I_{CaCl}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-19 $\pm$ 5	-19 $\pm$ 3	-19 $\pm$ 7
$I_{CaCl}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-17 $\pm$ 5	-16 $\pm$ 2	-17 $\pm$ 6
$I_{CaCl}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-16 $\pm$ 5	-13 $\pm$ 2	-15 $\pm$ 5
$I_{CaCl}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-14 $\pm$ 5	-11 $\pm$ 1	-13 $\pm$ 4
$I_{CaCl}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-10 $\pm$ 3	-8 $\pm$ 1	-10 $\pm$ 3
$I_{CaCl}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-8 $\pm$ 3	-6 $\pm$ 1	-8 $\pm$ 3
$I_{CaCl}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-6 $\pm$ 3	-4 $\pm$ 1	-6 $\pm$ 2
$I_{CaCl}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-3 $\pm$ 4	-2 $\pm$ 1	-4 $\pm$ 2



Tetrandinas 0,1 mM				Tetrandinas 0,2 mM			
				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (-100 mV)</b>			
				Anova, F(2,4) = 126,5, p<0,001			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		>0,999	>0,999		0,025	0,017	
Tetrandinas 0,1 mM	>0,999		>0,999	0,025		0,058	
DMSO 0,75%	>0,999	>0,999		0,017	0,055		
				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (-80 mV)</b>			
				Anova, F(2,18) = 7,64, p=0,005			
				Friedman test, $\chi^2(2) = 0,5, p=0,779$			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		>0,999	>0,999		0,043	0,182	
Tetrandinas 0,1 mM	>0,999		>0,999	0,043		0,091	
DMSO 0,75%	>0,999	>0,999		0,182	0,091		
				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (-60 mV)</b>			
				Anova, F(2,8) = 0,15, p=0,865			
				Friedman test, $\chi^2(2) = 14,6, p<0,001$			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		>0,999	>0,999		0,006	0,111	
Tetrandinas 0,1 mM	>0,999		>0,999	0,006		0,111	
DMSO 0,75%	>0,999	>0,999		0,111	0,111		
				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (-40 mV)</b>			
				Anova, F(2,8) = 0,64, p=0,552			
				Friedman test, $\chi^2(2) = 16,2, p<0,001$			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		>0,999	>0,999		0,006	0,041	
Tetrandinas 0,1 mM	>0,999		>0,999	0,006		0,154	
DMSO 0,75%	>0,999	>0,999		0,041	0,154		
				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (-20 mV)</b>			
				Anova, F(2,8) = 1,16, p=0,363			
				Friedman test, $\chi^2(2) = 12,77, p<0,001$			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		>0,999	>0,999		0,001	0,097	
Tetrandinas 0,1 mM	>0,999		0,666	0,001		0,19	
DMSO 0,75%	>0,999	0,666		0,097	0,19		
				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (0 mV)</b>			
				Anova, F(2,8) = 1,02, p=0,401			
				Anova, F(2,18) = 11,27, p<0,001			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		>0,999	>0,999		<0,001	0,17	
Tetrandinas 0,1 mM	>0,999		0,81	<0,001		0,153	
DMSO 0,75%	>0,999	0,81		0,17	0,153		
				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (20 mV)</b>			
				Anova, F(2,8) = 1,54, p=0,271			
				Anova, F(2,20) = 8,67, p=0,002			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		0,828	0,48		0,008	0,122	
Tetrandinas 0,1 mM	0,828		0,48	0,008		0,285	
DMSO 0,75%	>0,999	0,48		0,122	0,285		
				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (40 mV)</b>			
				Anova, F(2,8) = 1,35, p=0,313			
				Anova, F(2,20) = 4,72, p=0,021			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		>0,999	>0,999		0,082	0,183	
Tetrandinas 0,1 mM	>0,999		0,178	0,082		>0,999	
DMSO 0,75%	>0,999	0,178		0,183	>0,999		
				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (60 mV)</b>			
				Anova, F(2,8) = 1,21, p=0,345			
				Anova, F(2,14) = 3,62, p=0,054			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		>0,999	>0,999		0,13	0,414	
Tetrandinas 0,1 mM	>0,999		0,07	0,13		>0,999	
DMSO 0,75%	>0,999	0,07		0,414	>0,999		

**P6 pav.** 0,1 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 0,75 % DMSO (n = 5) bei 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO (n = 10) poveikio *Nitellopsis obtusa* I<sub>Ca</sub>Cl srovei (VC3 protokolas) statistinė analizė.

**P27 lentelė.** 0,1 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 0,75 % DMSO poveikis *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių aktyvacijos trukmei  $t_{act}$ , VC3 protokolas, n = 5. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD.

	Kontrolė	Tetrandrinas, 0,1 mM	DMSO, 0,75 %
$t_{act}$ (-80 mV) (s)	1,5 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,2
$t_{act}$ (-60 mV) (s)	1,6 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,1
$t_{act}$ (-40 mV) (s)	1,6 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,1
$t_{act}$ (-20 mV) (s)	1,7 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,1
$t_{act}$ (0 mV) (s)	1,8 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,3	2 $\pm$ 0,2
$t_{act}$ (20 mV) (s)	1,9 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,1
$t_{act}$ (40 mV) (s)	2 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 0,2
$t_{act}$ (60 mV) (s)	2,2 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 0,6	2,2 $\pm$ 0,2

Tetrandrin 0,1 mM				Tetrandrin 0,2 mM			
				<b>t<sub>act</sub> (-100 mV)</b>			
				Anova, F(2,4) = 1,23, p=0,383			
	Kontrolė	Tetrandrin 0,2 mM	DMSO 1,5%	Kontrolė	Tetrandrin 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		0,876	0,774	Kontrolė		0,876	0,774
Tetrandrin 0,2 mM	0,876		>0,999	Tetrandrin 0,2 mM	0,876		>0,999
DMSO 1,5%	>0,999	0,774	>0,999	DMSO 1,5%	0,774	>0,999	>0,999
				<b>t<sub>act</sub> (-80 mV)</b>			
<b>t<sub>act</sub> (-80 mV)</b>				Anova, F(2,16) = 10,88, p=0,001			
Friedman test, $\chi^2(2) = 3,5, p=0,174$							
	Kontrolė	Tetrandrin 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Tetrandrin 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		0,33	>0,999	Kontrolė		0,01	0,003
Tetrandrin 0,1 mM	0,75		0,375	Tetrandrin 0,2 mM	0,01		>0,999
DMSO 0,75%	>0,999	0,375		DMSO 1,5%	0,003	>0,999	
				<b>t<sub>act</sub> (-60 mV)</b>			
<b>t<sub>act</sub> (-60 mV)</b>				Anova, F(2,18) = 7,84, p=0,004			
Anova, F(2,8) = 5,69, p=0,029							
	Kontrolė	Tetrandrin 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Tetrandrin 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		0,171	>0,999	Kontrolė		0,029	0,002
Tetrandrin 0,1 mM	0,171		0,13	Tetrandrin 0,2 mM	0,029		0,774
DMSO 0,75%	>0,999	0,13		DMSO 1,5%	0,002	0,774	
				<b>t<sub>act</sub> (-40 mV)</b>			
<b>t<sub>act</sub> (-40 mV)</b>				Anova, F(2,18) = 7,59, p=0,051			
Anova, F(2,8) = 4,48, p=0,05							
	Kontrolė	Tetrandrin 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Tetrandrin 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		0,28	0,612	Kontrolė		0,032	<0,001
Tetrandrin 0,1 mM	0,28		0,23	Tetrandrin 0,2 mM	0,032		n.s.
DMSO 0,75%	0,612	0,23		DMSO 1,5%	<0,001	n.s.	
				<b>t<sub>act</sub> (-20 mV)</b>			
<b>t<sub>act</sub> (-20 mV)</b>				Anova, F(2,16) = 12,04, p<0,001			
Anova, F(2,8) = 4,08, p=0,06							
	Kontrolė	Tetrandrin 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Tetrandrin 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		0,188	>0,999	Kontrolė		0,011	0,001
Tetrandrin 0,1 mM	0,188		0,372	Tetrandrin 0,2 mM	0,011		>0,999
DMSO 0,75%	>0,999	0,372		DMSO 1,5%	0,001	>0,999	
				<b>t<sub>act</sub> (0 mV)</b>			
<b>t<sub>act</sub> (0 mV)</b>				Anova, F(2,18) = 12,53, p<0,001			
Anova, F(2,8) = 2,79, p=0,121							
	Kontrolė	Tetrandrin 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Tetrandrin 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		0,116	0,495	Kontrolė		0,003	0,007
Tetrandrin 0,1 mM	0,116		0,11	Tetrandrin 0,2 mM	0,003		>0,999
DMSO 0,75%	0,495	0,11		DMSO 1,5%	0,007	>0,999	
				<b>t<sub>act</sub> (20 mV)</b>			
<b>t<sub>act</sub> (20 mV)</b>				Anova, F(2,20) = 11,97, p<0,001			
Anova, F(2,8) = 2,83, p=0,118							
	Kontrolė	Tetrandrin 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Tetrandrin 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		0,399	>0,999	Kontrolė		0,003	<0,001
Tetrandrin 0,1 mM	0,399		0,42	Tetrandrin 0,2 mM	0,003		>0,999
DMSO 0,75%	>0,999	0,42		DMSO 1,5%	<0,001	>0,999	
				<b>t<sub>act</sub> (40 mV)</b>			
<b>t<sub>act</sub> (40 mV)</b>				Anova, F(2,12) = 8,04, p=0,006			
Friedman test, $\chi^2(2) = 3,5, p=0,174$							
	Kontrolė	Tetrandrin 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Tetrandrin 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		>0,999	>0,999	Kontrolė		0,011	0,213
Tetrandrin 0,1 mM	>0,999		0,375	Tetrandrin 0,2 mM	0,011		0,441
DMSO 0,75%	>0,999	0,375		DMSO 1,5%	0,213	0,441	
				<b>t<sub>act</sub> (60 mV)</b>			
<b>t<sub>act</sub> (60 mV)</b>				Friedman test, $\chi^2(2) = 7, p=0,03$			
Anova, F(2,6) = 0,14, p=0,873							
	Kontrolė	Tetrandrin 0,1 mM	DMSO 0,75%	Kontrolė	Tetrandrin 0,2 mM	DMSO 1,5%	
Kontrolė		0,786	0,884	Kontrolė		0,094	>0,999
Tetrandrin 0,1 mM	0,786		0,514	Tetrandrin 0,2 mM	0,094		0,468
DMSO 0,75%	0,884	0,514		DMSO 1,5%	>0,999	0,468	

**P7 pav.** 0,1 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 0,75 % DMSO (n = 5) bei 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO (n = 10) poveikio *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių aktyvacijos trukmei  $t_{act}$  (VC3 protokolas) statistinė analizė.

**P28 lentelė.** 0,1 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 0,75 % DMSO poveikis *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių inaktyvacijos trukmei  $t_{inact}$ , VC3 protokolas, n = 5. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su kontrole ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	Tetrandrinas, 0,1 mM	DMSO, 0,75 %
$t_{inact}$ (-80 mV) (s)	1,7 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 1,3	2,7 $\pm$ 1
$t_{inact}$ (-60 mV) (s)	2,1 $\pm$ 0,4	4,6 $\pm$ 1,8	3,4 $\pm$ 1
$t_{inact}$ (-40 mV) (s)	2,7 $\pm$ 0,3	5,4 $\pm$ 2	3,7 $\pm$ 0,9
$t_{inact}$ (-20 mV) (s)	3,2 $\pm$ 0,4	6,3 $\pm$ 2,3	4 $\pm$ 1
$t_{inact}$ (0 mV) (s)	4,1 $\pm$ 1,4	6,4 $\pm$ 1,8	4,9 $\pm$ 1,4
$t_{inact}$ (20 mV) (s)	4,2 $\pm$ 1,4	6,4 $\pm$ 1,9	5,4 $\pm$ 2,1
$t_{inact}$ (40 mV) (s)	4,7 $\pm$ 1,7	5,2 $\pm$ 1,3	4,1 $\pm$ 1,6
$t_{inact}$ (60 mV) (s)	3,7 $\pm$ 3,9	2,2 $\pm$ 0,9	3,3 $\pm$ 1,9

Tetrandrinas 0,1 mM				Tetrandrinas 0,2 mM					
				<b>t<sub>inact</sub> (-100 mV)</b>					
				Anova, F(2,4) = 1,04, p=0,433					
		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%					
		Kontrolė	0,609	>0,999					
		Tetrandrinas 0,2 mM	0,609	>0,999					
		DMSO 1,5%	>0,999	>0,999					
<b>t<sub>inact</sub> (-80 mV)</b>				<b>t<sub>inact</sub> (-80 mV)</b>					
Friedman test, $\chi^2(2) = 6,5, p=0,039$				Anova, F(2,16) = 2,86, p=0,087					
		Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%			Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
		Kontrolė	0,375	0,375			Kontrolė	0,735	0,026
		Tetrandrinas 0,1 mM	0,375	>0,999			Tetrandrinas 0,2 mM	0,735	>0,999
		DMSO 0,75%	0,375	>0,999			DMSO 1,5%	0,026	>0,999
<b>t<sub>inact</sub> (-60 mV)</b>				<b>t<sub>inact</sub> (-60 mV)</b>					
Anova, F(2,8) = 12,87, p=0,003				Anova, F(2,18) = 4,2, p=0,032					
		Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%			Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
		Kontrolė	0,058	0,11			Kontrolė	0,54	0,014
		Tetrandrinas 0,1 mM	0,058	0,078			Tetrandrinas 0,2 mM	0,54	0,819
		DMSO 0,75%	0,11	0,078			DMSO 1,5%	0,014	0,819
<b>t<sub>inact</sub> (-40 mV)</b>				<b>t<sub>inact</sub> (-40 mV)</b>					
Anova, F(2,8) = 13,53, p=0,003				Anova, F(2,18) = 6,32, p=0,008					
		Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%			Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
		Kontrolė	0,054	0,091			Kontrolė	0,257	0,003
		Tetrandrinas 0,1 mM	0,054	0,091			Tetrandrinas 0,2 mM	0,257	0,753
		DMSO 0,75%	0,057	0,091			DMSO 1,5%	0,003	0,753
<b>t<sub>inact</sub> (-20 mV)</b>				<b>t<sub>inact</sub> (-20 mV)</b>					
Anova, F(2,8) = 12, p=0,026				Anova, F(2,16) = 4,6, p=0,026					
		Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%			Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
		Kontrolė	0,084	0,251			Kontrolė	0,999	0,035
		Tetrandrinas 0,1 mM	0,084	0,049			Tetrandrinas 0,2 mM	>0,999	0,257
		DMSO 0,75%	0,251	0,049			DMSO 1,5%	0,035	0,257
<b>t<sub>inact</sub> (0 mV)</b>				<b>t<sub>inact</sub> (0 mV)</b>					
Friedman test, $\chi^2(2) = 8, p=0,018$				Anova, F(2,12) = 2,09, p=0,167					
		Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%			Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
		Kontrolė	0,375	0,375			Kontrolė	0,999	0,072
		Tetrandrinas 0,1 mM	0,375	0,375			Tetrandrinas 0,2 mM	>0,999	0,348
		DMSO 0,75%	0,375	0,375			DMSO 1,5%	0,072	0,348
<b>t<sub>inact</sub> (20 mV)</b>				<b>t<sub>inact</sub> (20 mV)</b>					
Anova, F(2,6) = 4,64, p=0,06				Anova, F(2,8) = 1,78, p=0,229					
		Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%			Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
		Kontrolė	0,153	0,597			Kontrolė	0,999	0,903
		Tetrandrinas 0,1 mM	0,153	0,597			Tetrandrinas 0,2 mM	>0,999	0,423
		DMSO 0,75%	0,768	0,597			DMSO 1,5%	0,903	0,423
<b>t<sub>inact</sub> (40 mV)</b>				<b>t<sub>inact</sub> (40 mV)</b>					
Anova, F(2,4) = 7,38, p=0,045				Anova, F(2,6) = 4,2, p=0,072					
		Kontrolė	Tetrandrinas 0,1 mM	DMSO 0,75%			Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
		Kontrolė	0,164	>0,999			Kontrolė	0,342	0,921
		Tetrandrinas 0,1 mM	0,164	0,197			Tetrandrinas 0,2 mM	0,342	0,402
		DMSO 0,75%	>0,999	0,197			DMSO 1,5%	0,921	0,402

**P8 pav.** 0,1 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 0,75 % DMSO (n = 5) bei 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO (n = 10) poveikio *Nitellopsis obtusa* sužadinimo metu tekančių srovių aktyvacijos trukmei  $t_{inact}$  (VC3 protokolas) statistinė analizė.

**P29 lentelė.** 0,1 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 0,75 % DMSO poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_K$  srovei, VC3 protokolas, n = 5. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su kontrole ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	Tetrandrinas, 0,1 mM	DMSO, 0,75 %
$I_K$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1 $\pm$ 0,4	-2 $\pm$ 1,2	-1,3 $\pm$ 0,6
$I_K$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-0,9 $\pm$ 0,4	-1,7 $\pm$ 1	-1,2 $\pm$ 1,2
$I_K$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-0,9 $\pm$ 0,7	-1,4 $\pm$ 1,1	-1,1 $\pm$ 1,4
$I_K$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1 $\pm$ 1,3	-0,8 $\pm$ 1,4	-1,1 $\pm$ 2,2
$I_K$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1 $\pm$ 1,9	-0,5 $\pm$ 1,5	-0,6 $\pm$ 2,1
$I_K$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-0,7 $\pm$ 1,8	-0,1 $\pm$ 1,1	-0,7 $\pm$ 2,5
$I_K$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-0,3 $\pm$ 2,1	0,6 $\pm$ 0,9	-0,2 $\pm$ 2,3
$I_K$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,1 $\pm$ 2	1,6 $\pm$ 0,7	0,6 $\pm$ 2

Tetrandinas 0,1 mM				Tetrandinas 0,2 mM			
I <sub>K</sub> (-80 mV)				I <sub>K</sub> (-100 mV)			
Anova, F(2,6) = 7,34, p=0,024				Friedman test, $\chi^2(2) = 2,67, p=0,264$			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,27	>0,999			>0,999	>0,999
Tetrandinas 0,1 mM			0,15				0,75
DMSO 0,75%		>0,999				>0,999	
I <sub>K</sub> (-60 mV)				I <sub>K</sub> (-80 mV)			
Anova, F(2,6) = 4,36, p=0,068				Friedman test, $\chi^2(2) = 2,89, p=0,236$			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,474	>0,999			>0,999	>0,999
Tetrandinas 0,1 mM			0,212				0,609
DMSO 0,75%		>0,999				>0,999	0,609
I <sub>K</sub> (-40 mV)				I <sub>K</sub> (-60 mV)			
Anova, F(2,6) = 2,25, p=0,187				Friedman test, $\chi^2(2) = 1,4, p=0,497$			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,78	>0,999			>0,999	>0,999
Tetrandinas 0,1 mM			0,241				0,698
DMSO 0,75%		>0,999				>0,999	>0,999
I <sub>K</sub> (-20 mV)				I <sub>K</sub> (-40 mV)			
Anova, F(2,6) = 0,82, p=0,483				Anova, F(2,18) = 0,42, p=0,661			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	>0,999			>0,999	>0,999
Tetrandinas 0,1 mM			>0,999				>0,999
DMSO 0,75%		>0,999				>0,999	
I <sub>K</sub> (0 mV)				I <sub>K</sub> (-20 mV)			
Anova, F(2,6) = 0,4, p=0,685				Anova, F(2,16) = 1,82, p=0,193			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	>0,999			0,006	>0,999
Tetrandinas 0,1 mM			0,998			0,004	>0,999
DMSO 0,75%		>0,999				>0,999	>0,999
I <sub>K</sub> (20 mV)				I <sub>K</sub> (0 mV)			
Anova, F(2,6) = 0,27, p=0,769				Anova, F(2,18) = 5,68, p=0,012			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	>0,999			0,047	0,178
Tetrandinas 0,1 mM			>0,999			0,047	0,417
DMSO 0,75%		>0,999				0,178	0,417
I <sub>K</sub> (40 mV)				I <sub>K</sub> (20 mV)			
Anova, F(2,4) = 0,27, p=0,771				Friedman test, $\chi^2(2) = 17,64, p<0,001$			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	>0,999			0,003	0,003
Tetrandinas 0,1 mM			>0,999			0,003	0,441
DMSO 0,75%		>0,999				0,003	0,441
I <sub>K</sub> (60 mV)				I <sub>K</sub> (40 mV)			
Anova, F(2,6) = 0,66, p=0,549				Anova, F(2,20) = 9,5, p=0,001			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,9	>0,999			0,013	0,044
Tetrandinas 0,1 mM			>0,999			0,013	>0,999
DMSO 0,75%		>0,999				0,044	>0,999
I <sub>K</sub> (80 mV)				I <sub>K</sub> (60 mV)			
Anova, F(2,6) = 0,5, p=0,585				Anova, F(2,14) = 4,77, p=0,026			
	Kontrolė	Tetrandinas 0,1 mM	DMSO 0,75%		Kontrolė	Tetrandinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,9	>0,999			0,063	0,295
Tetrandinas 0,1 mM			>0,999			0,063	>0,999
DMSO 0,75%		>0,999				0,295	>0,999

**P9 pav.** 0,1 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 0,75 % DMSO (n = 5) bei 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO (n = 10) poveikio *Nitellopsis obtusa* I<sub>K</sub> srovei (VC3 protokolai) statistinė analizė.

**P30 lentelė.** 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{leak}$  srovei, VC3 protokolas, n = 10. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su kontrole ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	Tetrandrinas, 0,2 mM	DMSO, 1,5 %
$I_{leak}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2,3 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 0,7	1,9 $\pm$ 0,6
$I_{leak}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	3,1 $\pm$ 0,8	2,3 $\pm$ 0,6	2,4 $\pm$ 0,8
$I_{leak}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	3,5 $\pm$ 0,9	2,8 $\pm$ 0,7	2,9 $\pm$ 0,7
$I_{leak}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	4,1 $\pm$ 1	3,3 $\pm$ 0,8	3,4 $\pm$ 0,7
$I_{leak}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	4,8 $\pm$ 1	4 $\pm$ 0,9	4,1 $\pm$ 1
$I_{leak}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	5,4 $\pm$ 1,2	4,8 $\pm$ 1,4	4,9 $\pm$ 1,3
$I_{leak}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	6,4 $\pm$ 1,6	6 $\pm$ 1,8	6,1 $\pm$ 1,7
$I_{leak}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	7,4 $\pm$ 1,8	7,1 $\pm$ 2,1	7,6 $\pm$ 2,2
$I_{leak}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	8,9 $\pm$ 1,7	8,3 $\pm$ 2,9	8,8 $\pm$ 2,8

**P31 lentelė.** 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{Ca}$  srovei, VC3 protokolas, n = 10. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su kontrole ( $p < 0,5$ ).

	Kontrolė	Tetrandrinas, 0,2 mM	DMSO, 1,5 %
$I_{Ca}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-7,2 $\pm$ 3,1	-4,6 $\pm$ 2,9	-9,6 $\pm$ 5,3
$I_{Ca}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-7,6 $\pm$ 4,2	-4,5 $\pm$ 2,1	-7,6 $\pm$ 4
$I_{Ca}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-6,7 $\pm$ 4	-3,1 $\pm$ 3,4	-5,2 $\pm$ 3
$I_{Ca}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-4,7 $\pm$ 2,8	-2,5 $\pm$ 1,8	-2,8 $\pm$ 3,8
$I_{Ca}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-3,1 $\pm$ 2,2	-0,8 $\pm$ 1,8	-0,1 $\pm$ 3,8
$I_{Ca}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,3 $\pm$ 1,9	1,1 $\pm$ 2	2,1 $\pm$ 3,7
$I_{Ca}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-0,1 $\pm$ 1,7	3,2 $\pm$ 2,7	3,6 $\pm$ 4,1
$I_{Ca}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	1 $\pm$ 1,5	4,8 $\pm$ 4	6,3 $\pm$ 5,6
$I_{Ca}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2 $\pm$ 1,4	6,6 $\pm$ 5,7	8,1 $\pm$ 7,4



**P32 lentelė.** 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{Cl}$  srovei, VC3 protokolas, n = 10. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su kontrole (p<0,05). Pabrauktos vertės, rodančios statistiškai reikšmingą skirtumą (p<0,05) tarp tetrandrino ir DMSO grupių.

	Kontrolė	Tetrandrinas, 0,2 mM	DMSO, 1,5 %
$I_{Cl}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-30 $\pm$ 12	-17 $\pm$ 11	-16 $\pm$ 10
$I_{Cl}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-29 $\pm$ 13	-14 $\pm$ 8	-18 $\pm$ 11
$I_{Cl}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-25 $\pm$ 10	-11 $\pm$ 5	-16 $\pm$ 9
$I_{Cl}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-23 $\pm$ 10	<u>-9<math>\pm</math>4</u>	<u>-14<math>\pm</math>7</u>
$I_{Cl}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-18 $\pm$ 7	-7 $\pm$ 4	-12 $\pm$ 8
$I_{Cl}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-14 $\pm$ 6	-4 $\pm$ 4	-9 $\pm$ 8
$I_{Cl}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-10 $\pm$ 5	-1 $\pm$ 4	-5 $\pm$ 7
$I_{Cl}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-5 $\pm$ 6	2 $\pm$ 5	1 $\pm$ 8
$I_{Cl}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0 $\pm$ 5	5 $\pm$ 6	4 $\pm$ 9

**P33 lentelė.** 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{CaCl}$  srovei, VC3 protokolas, n = 10. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su kontrole (p<0,05).

	Kontrolė	Tetrandrinas, 0,2 mM	DMSO, 1,5 %
$I_{CaCl}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-38 $\pm$ 13	-22 $\pm$ 12	-26 $\pm$ 11
$I_{CaCl}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-36 $\pm$ 15	-19 $\pm$ 8	-25 $\pm$ 14
$I_{CaCl}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-31 $\pm$ 13	-14 $\pm$ 7	-21 $\pm$ 12
$I_{CaCl}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-27 $\pm$ 12	-11 $\pm$ 5	-17 $\pm$ 10
$I_{CaCl}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-21 $\pm$ 8	-8 $\pm$ 4	-14 $\pm$ 10
$I_{CaCl}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-16 $\pm$ 6	-4 $\pm$ 4	-9 $\pm$ 8
$I_{CaCl}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-11 $\pm$ 6	-1 $\pm$ 4	-5 $\pm$ 7
$I_{CaCl}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-5 $\pm$ 6	2 $\pm$ 5	1 $\pm$ 8
$I_{CaCl}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0 $\pm$ 6	5 $\pm$ 6	4 $\pm$ 9

**P34 lentelė.** 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO poveikis *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių aktyvacijos trukmei  $t_{act}$ , VC3 protokolais,  $n = 10$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su kontrole ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	Tetrandrinas, 0,2 mM	DMSO, 1,5 %
$t_{act}$ (-100 mV) (s)	1,2 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,8	1,9 $\pm$ 0,7
$t_{act}$ (-80 mV) (s)	1,3 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,8	1,9 $\pm$ 0,7
$t_{act}$ (-60 mV) (s)	1,4 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,8	1,9 $\pm$ 0,7
$t_{act}$ (-40 mV) (s)	1,4 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,8	2,1 $\pm$ 0,7
$t_{act}$ (-20 mV) (s)	1,5 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,6	2,2 $\pm$ 0,6
$t_{act}$ (0 mV) (s)	1,6 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 0,8
$t_{act}$ (20 mV) (s)	1,7 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,8
$t_{act}$ (40 mV) (s)	1,8 $\pm$ 0,6	2,3 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,9
$t_{act}$ (60 mV) (s)	1,8 $\pm$ 0,6	2,3 $\pm$ 0,6	2,6 $\pm$ 1,2

**P35 lentelė.** 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO poveikis *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių inaktyvacijos trukmei  $t_{inact}$ , VC3 protokolais,  $n = 10$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su kontrole ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	Tetrandrinas, 0,2 mM	DMSO, 1,5 %
$t_{inact}$ (-100 mV) (s)	1,7 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,8	2,4 $\pm$ 1,5
$t_{inact}$ (-80 mV) (s)	1,9 $\pm$ 0,4	2,8 $\pm$ 1,2	2,7 $\pm$ 1,5
$t_{inact}$ (-60 mV) (s)	2,2 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 1,5	3,1 $\pm$ 1,2
$t_{inact}$ (-40 mV) (s)	2,4 $\pm$ 0,5	3,3 $\pm$ 1,2	3,5 $\pm$ 1,2
$t_{inact}$ (-20 mV) (s)	2,7 $\pm$ 0,8	3,1 $\pm$ 1,2	3,7 $\pm$ 1,4
$t_{inact}$ (0 mV) (s)	3,1 $\pm$ 1,3	2,9 $\pm$ 1,1	3,8 $\pm$ 1
$t_{inact}$ (20 mV) (s)	3,1 $\pm$ 1	3 $\pm$ 0,8	3,4 $\pm$ 1,8
$t_{inact}$ (40 mV) (s)	3,1 $\pm$ 1	2,4 $\pm$ 0,8	2,8 $\pm$ 1,9

**P36 lentelė.** 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_K$  srovei, VC3 protokolas, n = 10. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su kontrole (p<0,05).

	Kontrolė	Tetrandrinas, 0,2 mM	DMSO, 1,5 %
$I_K$ (-100 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	-1,1 $\pm$ 0,6	-1 $\pm$ 0,9	-1 $\pm$ 0,8
$I_K$ (-80 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	-1,1 $\pm$ 0,6	-0,9 $\pm$ 1,3	-1 $\pm$ 1,9
$I_K$ (-60 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	-1,7 $\pm$ 3,5	0,5 $\pm$ 1,1	-0,3 $\pm$ 2,1
$I_K$ (-40 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	-0,6 $\pm$ 1,3	0,5 $\pm$ 1,8	0,2 $\pm$ 2,8
$I_K$ (-20 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	-0,1 $\pm$ 1,6	1,7 $\pm$ 2,1	1 $\pm$ 3,5
$I_K$ (0 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	0,3 $\pm$ 1,8	3,3 $\pm$ 2,7	2 $\pm$ 3,7
$I_K$ (20 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	1,2 $\pm$ 1,6	5,1 $\pm$ 3,6	4 $\pm$ 4,8
$I_K$ (40 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	1,5 $\pm$ 1,8	6,7 $\pm$ 4,8	5,9 $\pm$ 6,1
$I_K$ (60 mV) ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	2 $\pm$ 2,1	8 $\pm$ 5,8	7,8 $\pm$ 8,4

	Kontrolė	Tetrandrinas, 0,2 mM	DMSO, 1,5 %		Kontrolė	Tetrandrinas, 0,2 mM	DMSO, 1,5 %
$I$ (-120 mV) (pA)	-6,8 $\pm$ 0,7	-7,1 $\pm$ 1	-9,1 $\pm$ 1,6	$P_o$ (-120 mV)	0,23 $\pm$ 0,29	0,29 $\pm$ 0,20	0,17 $\pm$ 0,16
$I$ (-100 mV) (pA)	-6,1 $\pm$ 0,7	-6,3 $\pm$ 1	-8,3 $\pm$ 1,3	$P_o$ (-100 mV)	0,16 $\pm$ 0,15	0,46 $\pm$ 0,27	0,10 $\pm$ 0,11
$I$ (-80 mV) (pA)	-5,2 $\pm$ 0,6	-5,3 $\pm$ 1,2	-6,7 $\pm$ 1,2	$P_o$ (-80 mV)	0,15 $\pm$ 0,12	0,37 $\pm$ 0,33	0,09 $\pm$ 0,09
$I$ (-60 mV) (pA)	-4,1 $\pm$ 0,9	-4,2 $\pm$ 1,4	-5,1 $\pm$ 1,7	$P_o$ (-60 mV)	0,18 $\pm$ 0,15	0,35 $\pm$ 0,30	0,06 $\pm$ 0,06
$I$ (-40 mV) (pA)	-3 $\pm$ 0,9	-3 $\pm$ 1,5	-3,5 $\pm$ 1,1	$P_o$ (-40 mV)	0,12 $\pm$ 0,12	0,52 $\pm$ 0,33	0,10 $\pm$ 0,11
$I$ (-20 mV) (pA)	-1,6 $\pm$ 0,8	-2,7 $\pm$ 1	-2,2 $\pm$ 1,2	$P_o$ (-20 mV)	0,17 $\pm$ 0,11	0,39 $\pm$ 0,28	0,08 $\pm$ 0,06
$I$ (0 mV) (pA)	-1,1 $\pm$ 0,7	-0,2 $\pm$ 1,7	-0,7 $\pm$ 1,5	$P_o$ (0 mV)	0,22 $\pm$ 0,10	0,33 $\pm$ 0,24	0,10 $\pm$ 0,12
$I$ (20 mV) (pA)	1,2 $\pm$ 0,9	0,9 $\pm$ 1,8	0,7 $\pm$ 1,3	$P_o$ (20 mV)	0,21 $\pm$ 0,15	0,31 $\pm$ 0,27	0,11 $\pm$ 0,08
$I$ (40 mV) (pA)	2,4 $\pm$ 0,9	2,3 $\pm$ 1,4	7 $\pm$ 0,9	$P_o$ (40 mV)	0,25 $\pm$ 0,18	0,28 $\pm$ 0,23	0,22 $\pm$ 0,13
$I$ (60 mV) (pA)	3,6 $\pm$ 1	3,6 $\pm$ 1,1	3,6 $\pm$ 0,9	$P_o$ (60 mV)	0,29 $\pm$ 0,20	0,26 $\pm$ 0,40	0,08 $\pm$ 0,06
$I$ (80 mV) (pA)	4,7 $\pm$ 1,1	4 $\pm$ 0,7	4,4 $\pm$ 1,2	$P_o$ (80 mV)	0,28 $\pm$ 0,21	0,31 $\pm$ 0,11	0,05 $\pm$ 0,02
$I$ (100 mV) (pA)	5,4 $\pm$ 1,5	4,7 $\pm$ 0,9	5 $\pm$ 0,8	$P_o$ (100 mV)	0,33 $\pm$ 0,20	0,35 $\pm$ 0,34	0,12 $\pm$ 0,10
$I$ (120 mV) (pA)	5,7 $\pm$ 1,5	5,3 $\pm$ 1	5,9 $\pm$ 0,9	$P_o$ (120 mV)	0,28 $\pm$ 0,19	0,36 $\pm$ 0,14	0,10 $\pm$ 0,10

**P10 pav.** 0,1 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 0,75 % DMSO bei 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO poveikis *Nitellopsis obtusa* citoplazminių lašų membranų  $K^+$  kanalų aktyvumui: srovių, tekančių per pavienius kanalus (kairėje) ir kanalų atsідarymo tikimybėms (dešinėje) ties skirtingomis MP vertėmis. n = 5-9. „Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai nuo kontrolės (p<0,05).

<b>I (-120 mV)</b>				<b>P<sub>o</sub> (-120 mV)</b>			
Anova, F(2,16) = 7,74, p=0,004				Kruskal-Wallis test, $\chi^2(2) = 1,27$ , p=0,531			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,922	0,005		Kontrolė	>0,999	>0,999
Tetrandrinas 0,2 mM	>0,999		0,023		Tetrandrinas 0,2 mM	>0,999	0,685
DMSO 1,5%	0,005	0,023			DMSO 1,5%	>0,999	0,685
<b>I (-100 mV)</b>				<b>P<sub>o</sub> (-100 mV)</b>			
Kruskal-Wallis test, $\chi^2(2) = 9,55$ , p=0,008				Kruskal-Wallis test, $\chi^2(2) = 5,85$ , p=0,054			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	<0,001		Kontrolė	>0,999	>0,999
Tetrandrinas 0,2 mM	<0,001		0,06		Tetrandrinas 0,2 mM	0,201	0,057
DMSO 1,5%	0,874	0,06			DMSO 1,5%	>0,999	0,057
<b>I (-80 mV)</b>				<b>P<sub>o</sub> (-80 mV)</b>			
Anova, F(2,17) = 5,06, p=0,019				Kruskal-Wallis test, $\chi^2(2) = 4,38$ , p=0,112			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,935	0,018		Kontrolė	0,496	>0,999
Tetrandrinas 0,2 mM	0,935		0,077		Tetrandrinas 0,2 mM	0,496	0,111
DMSO 1,5%	0,018	0,077			DMSO 1,5%	>0,999	0,111
<b>I (-60 mV)</b>				<b>P<sub>o</sub> (-60 mV)</b>			
Anova, F(2,16) = 0,34, p=0,345				Kruskal-Wallis test, $\chi^2(2) = 4,38$ , p=0,112			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,991	0,34		Kontrolė	0,986	0,502
Tetrandrinas 0,2 mM	0,991		0,49		Tetrandrinas 0,2 mM	0,986	0,113
DMSO 1,5%	0,34	0,49			DMSO 1,5%	0,502	0,113
<b>I (-40 mV)</b>				<b>P<sub>o</sub> (-40 mV)</b>			
Anova, F(2,16) = 0,32, p=0,73				Kruskal-Wallis test, $\chi^2(2) = 5,55$ , p=0,062			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	0,736		Kontrolė	0,122	>0,999
Tetrandrinas 0,2 mM	>0,999		0,794		Tetrandrinas 0,2 mM	0,122	0,112
DMSO 1,5%	0,736	0,794			DMSO 1,5%	>0,999	0,112
<b>I (-20 mV)</b>				<b>P<sub>o</sub> (-20 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 1,36, p=0,289				Anova, F(2,13) = 4,34, p=0,036			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,298	0,594		Kontrolė	0,088	0,53
Tetrandrinas 0,2 mM	0,298		0,79		Tetrandrinas 0,2 mM	0,088	0,32
DMSO 1,5%	0,594	0,79			DMSO 1,5%	0,53	0,32
<b>I (0 mV)</b>				<b>P<sub>o</sub> (0 mV)</b>			
Anova, F(2,8) = 0,39, p=0,691				Anova, F(2,8) = 1,55, p=0,27			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,672	0,92		Kontrolė	0,709	0,687
Tetrandrinas 0,2 mM	0,672		0,902		Tetrandrinas 0,2 mM	0,709	0,245
DMSO 1,5%	0,92	0,902			DMSO 1,5%	0,687	0,245

**P11 pav.** 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO (n = 5-9) poveikio *Nitellopsis obtusa* citoplazminių lašų membranų K<sup>+</sup> kanalų aktyvumui: srovių, tekančių per pavienius kanalus (kairėje) ir kanalų atsідarymo tikimybėms (dešinėje) ties skirtingomis MP vertėmis statistinė analizė (tesinys kitame puslapyje).

<b>I (20 mV)</b>				<b>P<sub>s</sub> (20 mV)</b>			
Anova, F(2,15) = 0,24, p=0,793				Kruskal-Wallis test, $\chi^2(2) = 2,86$ , p=0,24			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,926	0,781		Kontrolė	>0,999	0,406
Tetrandrinas 0,2 mM	0,926		0,96		Tetrandrinas 0,2 mM	>0,999	0,423
DMSO 1,5%	0,781	0,96			DMSO 1,5%	0,406	0,423
<b>I (40 mV)</b>				<b>P<sub>s</sub> (40 mV)</b>			
Kruskal-Wallis test, $\chi^2(2) = 1,32$ , p=0,516				Anova, F(2,14) = 0,09, p=0,911			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		>0,999	>0,999		Kontrolė	0,962	0,966
Tetrandrinas 0,2 mM	>0,999		0,834		Tetrandrinas 0,2 mM	0,962	0,904
DMSO 1,5%	>0,999	0,834			DMSO 1,5%	0,966	0,904
<b>I (60 mV)</b>				<b>P<sub>s</sub> (60 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 0,004, p=0,996				Kruskal-Wallis test, $\chi^2(2) = 4,32$ , p=0,115			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,998	0,997		Kontrolė	0,535	0,164
Tetrandrinas 0,2 mM	0,998		>0,999		Tetrandrinas 0,2 mM	0,535	>0,999
DMSO 1,5%	0,997	>0,999			DMSO 1,5%	0,164	>0,999
<b>I (80 mV)</b>				<b>P<sub>s</sub> (80 mV)</b>			
Kruskal-Wallis test, $\chi^2(2) = 2,39$ , p=0,303				Anova, F(2,13) = 2,3, p=0,14			
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%		Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%
Kontrolė		0,366	>0,999		Kontrolė	0,949	0,164
Tetrandrinas 0,2 mM	0,366		>0,999		Tetrandrinas 0,2 mM	0,949	0,165
DMSO 1,5%	>0,999	>0,999			DMSO 1,5%	0,164	0,165
<b>I (100 mV)</b>							
Anova, F(2,11) = 0,24, p=0,661							
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%				
Kontrolė		0,658	0,874				
Tetrandrinas 0,2 mM	0,658		0,944				
DMSO 1,5%	0,874	0,944					
<b>I (120 mV)</b>							
Kruskal-Wallis test, $\chi^2(2) = 0,12$ , p=0,943							
	Kontrolė	Tetrandrinas 0,2 mM	DMSO 1,5%				
Kontrolė		>0,999	>0,999				
Tetrandrinas 0,2 mM	>0,999		>0,999				
DMSO 1,5%	>0,999	>0,999					

**P11 pav. (tęsinys)** 0,2 mM tetrandrino ir jo tirpiklio 1,5 % DMSO (n = 5-9) poveikio *Nitellopsis obtusa* citoplazminių lašų membranų K<sup>+</sup> kanalų aktyvumui: srovių, tekančių per pavienius kanalus (kairėje) ir kanalų atsidarymo tikimybės (dešinėje) ties skirtingomis MP vertėmis statistinė analizė.

**P37 lentelė.** 50  $\mu\text{M}$  NED-19 poveikis elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrams, CC protokolais,  $n = 7$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	NED-19, 50 $\mu\text{M}$	p
Membranos rambės potencialas $RP$ (mV)	-214 $\pm$ 14	-207 $\pm$ 17	0,245 T
Membranos laidumas rambės būsenoje $G_{RP}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	0,29 $\pm$ 0,07	0,27 $\pm$ 0,05	0,306 T
VP sužadavimo slenkstis $E_{th}$ (mV)	-90 $\pm$ 8	-81 $\pm$ 18	0,340 T
VP smailė (mV)	30 $\pm$ 10	22 $\pm$ 13	0,219 W
VP amplitudė (mV)	120 $\pm$ 11	104 $\pm$ 23	0,136 T
VP depoliarizacijos trukmė $t_{dep}$ (s)	1,4 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,2	0,214 T
VP repoliarizacijos trukmė $t_{rep}$ (s)	3,5 $\pm$ 1,1	4,5 $\pm$ 1,8	0,136 T

**P38 lentelė.** 50  $\mu\text{M}$  NED-19 poveikis poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{leak}$  srovei, VC3 protokolais,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „T“ šalia p verčių reiškia taikytą Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	NED-19, 50 $\mu\text{M}$	p
$I_{leak}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2 $\pm$ 0,6	2 $\pm$ 0,4	0,254 T
$I_{leak}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2,5 $\pm$ 0,8	2,1 $\pm$ 0,5	0,310 T
$I_{leak}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2,8 $\pm$ 0,9	2,5 $\pm$ 0,5	0,321 T
$I_{leak}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	3,3 $\pm$ 0,9	2,9 $\pm$ 0,7	0,150 T
$I_{leak}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	3,7 $\pm$ 1	3,4 $\pm$ 0,8	0,098 T
$I_{leak}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	4,6 $\pm$ 1,3	3,9 $\pm$ 1	0,065 T
$I_{leak}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	5,4 $\pm$ 1,4	4,6 $\pm$ 1,1	0,037 T
$I_{leak}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	6 $\pm$ 1,1	5,3 $\pm$ 1,2	0,005 T
$I_{leak}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	7 $\pm$ 1,2	6,1 $\pm$ 1,5	0,002 T

**P39 lentelė.** 50  $\mu\text{M}$  NED-19 poveikis poveikis *Nitelloopsis obtusa*  $I_{Ca}$  srovei, VC3 protokolais, n = 8. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	NED-19, 50 $\mu\text{M}$	p
$I_{Ca}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-7,2 $\pm$ 2,2	-	-
$I_{Ca}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-5,9 $\pm$ 1,7	-5,7 $\pm$ 1,5	0,444 T
$I_{Ca}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-5,1 $\pm$ 1,2	-4,3 $\pm$ 1,4	0,157 T
$I_{Ca}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-4 $\pm$ 0,9	-3,1 $\pm$ 1,6	0,223 T
$I_{Ca}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-3 $\pm$ 0,9	-2,2 $\pm$ 1,3	0,260 T
$I_{Ca}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,3 $\pm$ 1,7	-0,7 $\pm$ 1,1	0,389 T
$I_{Ca}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,1 $\pm$ 1	0,3 $\pm$ 0,8	0,742 W
$I_{Ca}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	1,2 $\pm$ 0,8	1 $\pm$ 0,9	0,748 T
$I_{Ca}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2,3 $\pm$ 1,3	2 $\pm$ 0,6	0,599 T

**P40 lentelė.** 50  $\mu\text{M}$  NED-19 poveikis poveikis *Nitelloopsis obtusa*  $I_{Cl}$  srovei, VC3 protokolais, n = 8. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	NED-19, 50 $\mu\text{M}$	p
$I_{Cl}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-20 $\pm$ 6	-	-
$I_{Cl}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-17 $\pm$ 5	-14 $\pm$ 6	0,116 T
$I_{Cl}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-14 $\pm$ 6	-13 $\pm$ 6	0,375 W
$I_{Cl}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-13 $\pm$ 5	-11 $\pm$ 5	0,195 W
$I_{Cl}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-11 $\pm$ 5	-8 $\pm$ 3	0,025 T
$I_{Cl}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-6 $\pm$ 7	-7 $\pm$ 3	0,742 W
$I_{Cl}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-6 $\pm$ 3	-5 $\pm$ 2	0,093 T
$I_{Cl}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-5 $\pm$ 3	-3 $\pm$ 2	0,056 T
$I_{Cl}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2 $\pm$ 2	-1 $\pm$ 2	0,065 T

**P41 lentelė.** 50  $\mu\text{M}$  NED-19 poveikis poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{CaCl}$  srovei, VC3 protokolas,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	NED-19, 50 $\mu\text{M}$	p
$I_{CaCl}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-27 $\pm$ 7	-	-
$I_{CaCl}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-23 $\pm$ 6	-19 $\pm$ 7	0,156 T
$I_{CaCl}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-19 $\pm$ 6	-17 $\pm$ 6	0,219 T
$I_{CaCl}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-17 $\pm$ 5	-14 $\pm$ 5	0,078 W
$I_{CaCl}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-14 $\pm$ 5	-10 $\pm$ 3	0,023 W
$I_{CaCl}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-8 $\pm$ 7	-7 $\pm$ 2	0,195 T
$I_{CaCl}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-7 $\pm$ 3	-5 $\pm$ 2	0,162 T
$I_{CaCl}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-5 $\pm$ 3	-3 $\pm$ 1	0,083 T
$I_{CaCl}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2 $\pm$ 2	-1 $\pm$ 2	0,065 T

**P42 lentelė.** 50  $\mu\text{M}$  NED-19 poveikis *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių aktyvacijos trukmei  $t_{act}$ , VC3 protokolas,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „T“ šalia p verčių reiškia taikytą Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	NED-19, 50 $\mu\text{M}$	p
$t_{act}$ (-100 mV) (s)	1,1 $\pm$ 0,2	-	-
$t_{act}$ (-80 mV) (s)	1,2 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,3	0,113 T
$t_{act}$ (-60 mV) (s)	1,3 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,3	0,332 T
$t_{act}$ (-40 mV) (s)	1,4 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,3	0,393 T
$t_{act}$ (-20 mV) (s)	1,4 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,3	0,080 T
$t_{act}$ (0 mV) (s)	1,6 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,4	0,441 T
$t_{act}$ (20 mV) (s)	1,7 $\pm$ 0,5	1,7 $\pm$ 0,4	0,840 T
$t_{act}$ (40 mV) (s)	1,8 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 0,6	0,293 T
$t_{act}$ (60 mV) (s)	1,9 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,5	0,466 T



**P43 lentelė.** 50  $\mu\text{M}$  NED-19 poveikis poveikis *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių inaktyvacijos trukmei  $t_{inact}$ , VC3 protokolas, n = 8. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	NED-19, 50 $\mu\text{M}$	p
$t_{inact}$ (-100 mV) (s)	1,3 $\pm$ 0,3	-	-
$t_{inact}$ (-80 mV) (s)	1,7 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 0,3	0,521 T
$t_{inact}$ (-60 mV) (s)	2 $\pm$ 0,7	2,2 $\pm$ 0,5	0,461 T
$t_{inact}$ (-40 mV) (s)	2,2 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 0,8	0,335 T
$t_{inact}$ (-20 mV) (s)	2,1 $\pm$ 0,7	2,8 $\pm$ 1	0,079 T
$t_{inact}$ (0 mV) (s)	2,5 $\pm$ 1	3,8 $\pm$ 2	0,021 T
$t_{inact}$ (20 mV) (s)	3 $\pm$ 2,4	3,9 $\pm$ 2,1	0,078 W
$t_{inact}$ (40 mV) (s)	2,8 $\pm$ 2,3	3,3 $\pm$ 1,9	0,055 W
$t_{inact}$ (60 mV) (s)	1,9 $\pm$ 0,9	2,4 $\pm$ 0,9	>0,999 W

**P44 lentelė.** 50  $\mu\text{M}$  NED-19 poveikis poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_K$  srovei, VC3 protokolas, n = 8. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „T“ šalia p verčių reiškia taikytą Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	NED-19, 50 $\mu\text{M}$	p
$I_K$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,4 $\pm$ 0,6	-	-
$I_K$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-0,9 $\pm$ 0,6	-1,3 $\pm$ 0,3	0,846 T
$I_K$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-0,7 $\pm$ 0,6	-1 $\pm$ 0,5	0,426 T
$I_K$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-0,3 $\pm$ 1	-0,8 $\pm$ 0,5	0,643 T
$I_K$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,3 $\pm$ 0,9	-0,3 $\pm$ 0,5	0,045 T
$I_K$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,8 $\pm$ 1,3	0 $\pm$ 0,6	0,045 T
$I_K$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	1,5 $\pm$ 1,8	0,5 $\pm$ 0,6	0,119 T
$I_K$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	1,9 $\pm$ 1,6	1 $\pm$ 0,5	0,116 T
$I_K$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2,7 $\pm$ 1,1	1,5 $\pm$ 0,4	0,027 T

**P45 lentelė.** 75  $\mu\text{M}$  NED-19 poveikis poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{\text{leak}}$  srovei, VC3 protokolais,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	NED-19, 75 $\mu\text{M}$	p
$I_{\text{leak}}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2,3 $\pm$ 0,6	2,5 $\pm$ 0,5	0,515 T
$I_{\text{leak}}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	3 $\pm$ 0,9	3,3 $\pm$ 0,7	0,844 W
$I_{\text{leak}}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	3,5 $\pm$ 1,2	4 $\pm$ 0,8	0,469 W
$I_{\text{leak}}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	4 $\pm$ 1,5	4,5 $\pm$ 1,1	0,296 T
$I_{\text{leak}}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	4,9 $\pm$ 1,6	6 $\pm$ 2,1	0,375 W
$I_{\text{leak}}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	5,8 $\pm$ 1,7	6,4 $\pm$ 1,5	0,461 W
$I_{\text{leak}}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	6,8 $\pm$ 1,9	7,6 $\pm$ 1,9	0,148 W
$I_{\text{leak}}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	8 $\pm$ 2	9,1 $\pm$ 2,5	0,313 W
$I_{\text{leak}}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	9,2 $\pm$ 2,2	10,1 $\pm$ 3,1	0,563 W

**P46 lentelė.** 75  $\mu\text{M}$  NED-19 poveikis poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{\text{Ca}}$  srovei, VC3 protokolais,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	NED-19, 75 $\mu\text{M}$	p
$I_{\text{Ca}}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-6,1 $\pm$ 3,6	-	-
$I_{\text{Ca}}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-8 $\pm$ 3,1	-7,6 $\pm$ 3,8	0,498 T
$I_{\text{Ca}}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-7,1 $\pm$ 2,5	-5,7 $\pm$ 3	0,031 T
$I_{\text{Ca}}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-5,7 $\pm$ 1,8	-4,4 $\pm$ 1,8	0,094 T
$I_{\text{Ca}}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-4,3 $\pm$ 1,5	-2,9 $\pm$ 2	0,089 T
$I_{\text{Ca}}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2,5 $\pm$ 1,9	-0,2 $\pm$ 2,7	0,072 T
$I_{\text{Ca}}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,3 $\pm$ 1,9	1,7 $\pm$ 2,9	0,046 T
$I_{\text{Ca}}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0 $\pm$ 2,2	3,2 $\pm$ 3,3	0,039 W
$I_{\text{Ca}}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	1,2 $\pm$ 1,7	5,3 $\pm$ 4	0,071 T

**P47 lentelė.** 75  $\mu\text{M}$  NED-19 poveikis poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{Cl}$  srovei, VC3 protokolas, n = 8. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „T“ šalia p verčių reiškia taikytą Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	NED-19, 75 $\mu\text{M}$	p
$I_{Cl}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-30 $\pm$ 11	-	-
$I_{Cl}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-26 $\pm$ 8	-26 $\pm$ 11	0,590 T
$I_{Cl}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-23 $\pm$ 6	-23 $\pm$ 7	0,702 T
$I_{Cl}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-19 $\pm$ 5	-18 $\pm$ 8	0,661 T
$I_{Cl}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-16 $\pm$ 4	-14 $\pm$ 5	0,408 T
$I_{Cl}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-13 $\pm$ 4	-12 $\pm$ 5	0,878 T
$I_{Cl}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-9 $\pm$ 2	-9 $\pm$ 4	0,716 T
$I_{Cl}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-6 $\pm$ 2	-4 $\pm$ 5	0,330 T
$I_{Cl}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-3 $\pm$ 3	1 $\pm$ 5	0,112 T

**P48 lentelė.** 75  $\mu\text{M}$  NED-19 poveikis poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{CaCl}$  srovei, VC3 protokolas, n = 8. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „T“ šalia p verčių reiškia taikytą Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	NED-19, 75 $\mu\text{M}$	p
$I_{CaCl}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-37 $\pm$ 12	-	-
$I_{CaCl}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-34 $\pm$ 11	-34 $\pm$ 10	0,389 T
$I_{CaCl}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-30 $\pm$ 9	-29 $\pm$ 8	0,527 T
$I_{CaCl}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-25 $\pm$ 7	-22 $\pm$ 9	0,435 T
$I_{CaCl}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-20 $\pm$ 6	-17 $\pm$ 7	0,245 T
$I_{CaCl}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-15 $\pm$ 5	-13 $\pm$ 6	0,449 T
$I_{CaCl}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-11 $\pm$ 3	-9 $\pm$ 5	0,293 T
$I_{CaCl}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-7 $\pm$ 3	-4 $\pm$ 5	0,207 T
$I_{CaCl}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-4 $\pm$ 3	1 $\pm$ 5	0,112 T

**P49 lentelė.** 75  $\mu$ M NED-19 poveikis *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių aktyvacijos trukmei  $t_{act}$ , VC3 protokolas, n = 8. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	NED-19, 75 $\mu$ M	p
$t_{act}$ (-100 mV) (s)	1 $\pm$ 0,1	-	-
$t_{act}$ (-80 mV) (s)	1 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,2	0,156 W
$t_{act}$ (-60 mV) (s)	1 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,2	0,006 T
$t_{act}$ (-40 mV) (s)	1 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,2	0,001 T
$t_{act}$ (-20 mV) (s)	1,1 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,2	0,003 T
$t_{act}$ (0 mV) (s)	1,1 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,2	0,008 W
$t_{act}$ (20 mV) (s)	1,1 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,2	0,014 W
$t_{act}$ (40 mV) (s)	1,3 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,3	0,004 T
$t_{act}$ (60 mV) (s)	1,6 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,5	0,102 T

**P50 lentelė.** 75  $\mu$ M NED-19 poveikis poveikis *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių inaktyvacijos trukmei  $t_{inact}$ , VC3 protokolas, n = 8. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „T“ šalia p verčių reiškia taikytą Studento t kriterijų priklausomoms imtims. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	NED-19, 75 $\mu$ M	p
$t_{inact}$ (-100 mV) (s)	1,5 $\pm$ 0,4	-	-
$t_{inact}$ (-80 mV) (s)	1,5 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,6	0,013 T
$t_{inact}$ (-60 mV) (s)	1,7 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,4	0,015 T
$t_{inact}$ (-40 mV) (s)	1,8 $\pm$ 0,4	2,7 $\pm$ 0,5	<0,001 T
$t_{inact}$ (-20 mV) (s)	2,1 $\pm$ 0,5	3 $\pm$ 0,4	0,006 T
$t_{inact}$ (0 mV) (s)	2,7 $\pm$ 0,8	4 $\pm$ 1,2	0,019 T
$t_{inact}$ (20 mV) (s)	3 $\pm$ 1,3	4,6 $\pm$ 2	0,031 T
$t_{inact}$ (40 mV) (s)	3,6 $\pm$ 1,7	4,5 $\pm$ 2,8	0,100 T
$t_{inact}$ (60 mV) (s)	1,5 $\pm$ 0,4	-	-

**P51 lentelė.** 75  $\mu\text{M}$  NED-19 poveikis poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_K$  srovei, VC3 protokolas, n = 8. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų priklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų priklausomoms imtims.

	Kontrolė	NED-19, 75 $\mu\text{M}$	p
$I_K$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,2 $\pm$ 1,2	-	-
$I_K$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,4 $\pm$ 1,4	-0,8 $\pm$ 2,4	0,578 W
$I_K$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2 $\pm$ 1,9	-1,5 $\pm$ 1,7	0,212 T
$I_K$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2,2 $\pm$ 2	-1,7 $\pm$ 2,6	0,611 T
$I_K$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2,5 $\pm$ 2,3	-0,6 $\pm$ 4,4	0,170 T
$I_K$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2,2 $\pm$ 2,2	-1,1 $\pm$ 3,6	0,355 T
$I_K$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,6 $\pm$ 1,8	-0,3 $\pm$ 3,7	0,233 T
$I_K$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,2 $\pm$ 1,8	0,8 $\pm$ 4,4	0,185 T
$I_K$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-0,8 $\pm$ 1,1	2,8 $\pm$ 5	0,118 T

	Kontrolė	NED-19, 75 $\mu\text{M}$	p		Kontrolė	NED-19, 75 $\mu\text{M}$	p	
$I$ (-120 mV) (pA)	-6,8 $\pm$ 0,7	-6,3 $\pm$ 1,2	0,281 T		$P_o$ (-120 mV)	0,23 $\pm$ 0,29	0,33 $\pm$ 0,32	0,442 W
$I$ (-100 mV) (pA)	-6,1 $\pm$ 0,7	-5,7 $\pm$ 0,5	0,397 W		$P_o$ (-100 mV)	0,16 $\pm$ 0,15	0,33 $\pm$ 0,28	0,175 T
$I$ (-80 mV) (pA)	-5,2 $\pm$ 0,6	-4,9 $\pm$ 0,5	0,306 T		$P_o$ (-80 mV)	0,15 $\pm$ 0,12	0,28 $\pm$ 0,31	0,541 W
$I$ (-60 mV) (pA)	-4,1 $\pm$ 0,9	-3,7 $\pm$ 0,4	0,322 T		$P_o$ (-60 mV)	0,18 $\pm$ 0,15	0,24 $\pm$ 0,32	0,837 W
$I$ (-40 mV) (pA)	-3 $\pm$ 0,9	-2,4 $\pm$ 0,5	0,108 T		$P_o$ (-40 mV)	0,12 $\pm$ 0,12	0,31 $\pm$ 0,32	0,321 W
$I$ (-20 mV) (pA)	-1,6 $\pm$ 0,8	-1,2 $\pm$ 0,4	0,199 T		$P_o$ (-20 mV)	0,17 $\pm$ 0,11	0,31 $\pm$ 0,34	0,380 T
$I$ (0 mV) (pA)	-1,1 $\pm$ 0,7	0,5 $\pm$ 0,1	0,056 T		$P_o$ (0 mV)	0,22 $\pm$ 0,10	0,18	-
$I$ (20 mV) (pA)	1,2 $\pm$ 0,9	1,6 $\pm$ 0,3	0,219 T		$P_o$ (20 mV)	0,21 $\pm$ 0,15	0,27 $\pm$ 0,29	0,659 T
$I$ (40 mV) (pA)	2,4 $\pm$ 0,9	2,9 $\pm$ 0,3	0,135 T		$P_o$ (40 mV)	0,25 $\pm$ 0,18	0,36 $\pm$ 0,32	0,432 T
$I$ (60 mV) (pA)	3,6 $\pm$ 1	4,1 $\pm$ 0,5	0,243 T		$P_o$ (60 mV)	0,29 $\pm$ 0,20	0,25 $\pm$ 0,17	0,630 T
$I$ (80 mV) (pA)	4,7 $\pm$ 1,1	5,1 $\pm$ 1,2	0,260 W		$P_o$ (80 mV)	0,28 $\pm$ 0,21	0,28 $\pm$ 0,15	0,992 T
$I$ (100 mV) (pA)	5,4 $\pm$ 1,5	5,3 $\pm$ 1,6	0,933 T		$P_o$ (100 mV)	0,33 $\pm$ 0,20	0,13 $\pm$ 0,17	0,316 T
$I$ (120 mV) (pA)	5,7 $\pm$ 1,5	5,2 $\pm$ 1,6	0,714 T		$P_o$ (120 mV)	0,28 $\pm$ 0,19	0,11 $\pm$ 0,15	0,294 T

**P12 pav.** 75  $\mu\text{M}$  koncentracijos NED-19 tirpalo poveikis *Nitellopsis obtusa* citoplazminių lašų membranų  $\text{K}^+$  kanalų aktyvumui: srovių, tekančių per pavienius kanalus (kairėje) ir kanalų atsidarymo tikimybės (dešinėje) ties skirtingomis MP vertėmis. n = 8-9. „W“ šalia p verčių reiškia taikytą Wilcoxon kriterijų nepriklausomoms imtims, „T“ – Studento t kriterijų nepriklausomoms imtims.

**P52 lentelė.** 150  $\mu\text{M}$  inozitolio 1,4,5-trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ) poveikis elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrams, CC, VC1 ir VC2 protokolai,  $n = 4$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistškai reikšmingi skirtumai, palyginus su Kontrolė-1 ( $p < 0,05$ ). Pabrauktos vertės, rodančios statistškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp  $\text{IP}_3$  ir Kontrolės-2 grupių.

	Kontrolė-1	$\text{IP}_3$ , 150 $\mu\text{M}$	Kontrolė-2
Membranos ramybės potencialas $R_P$ (mV)	-207 $\pm$ 25	-200 $\pm$ 27	-189 $\pm$ 40
Membranos laidumas ramybės būsenoje $G_{RP}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	0,33 $\pm$ 0,07	0,3 $\pm$ 0,14	0,53 $\pm$ 0,4
VP sužadavimo slenkstis $E_{th}$ (mV)	-93 $\pm$ 14	-101 $\pm$ 9	-80 $\pm$ 11
VP smailė (mV)	25 $\pm$ 8	<u>26<math>\pm</math>5</u>	<u>45<math>\pm</math>4</u>
VP amplitudė (mV)	118 $\pm$ 21	126 $\pm$ 13	125 $\pm$ 15
VP depoliarizacijos trukmė $t_{dep}$ (s)	1,5 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,3
VP repoliarizacijos trukmė $t_{rep}$ (s)	3,9 $\pm$ 0,5	5,8 $\pm$ 1,9	4,3 $\pm$ 1,9
Maksimalus membranos laidumas sužadavimo metu $G_{max}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	3,7 $\pm$ 1,3	3,9 $\pm$ 1,4	5 $\pm$ 1,6
Membranos laidumas ties -250 mV $G_{-250\text{ mV}}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	0,39 $\pm$ 0,07	0,38 $\pm$ 0,1	0,85 $\pm$ 0,91
Membranos laidumas ties 50 mV $G_{50\text{ mV}}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	0,83 $\pm$ 0,34	0,86 $\pm$ 0,2	0,98 $\pm$ 0,57
Sužadavimo srovės amplitudė $I_{trans}$ ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-40 $\pm$ 8	-49 $\pm$ 21	-69 $\pm$ 30
Sužadavimo srovės aktyvacijos trukmė $t_{act\_trans}$ (s)	1,2 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,1
Sužadavimo srovės inaktyvacijos trukmė $t_{inact\_trans}$ (s)	2,3 $\pm$ 0,8	2,3 $\pm$ 0,7	2,2 $\pm$ 0,6

IP <sub>3</sub> 75 μM				IP <sub>3</sub> 150 μM			
<b>Membranos rambybės potencialas RP</b>				<b>Membranos rambybės potencialas RP</b>			
Anova, F(2,10) = 1,37, p=0,298				Anova, F(2,5) = 0,9, p=0,456			
	Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,681	0,624	Kontrolė-1		>0,999	>0,999
IP <sub>3</sub> 75 μM	0,681		>0,999	IP <sub>3</sub> 150 μM	>0,999		>0,999
Kontrolė-2	0,624	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	
<b>Membranos laidumas rambybės būsenoje G<sub>RP</sub></b>				<b>Membranos laidumas rambybės būsenoje G<sub>RP</sub></b>			
Anova, F(2,10) = 5,89, p=0,020				Friedman test, $\chi^2(2) = 1,5, p=0,472$			
	Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	0,108	Kontrolė-1		>0,999	>0,999
IP <sub>3</sub> 75 μM	>0,999		0,025	IP <sub>3</sub> 150 μM	>0,999		>0,999
Kontrolė-2	0,108	0,025		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	
<b>VP sužadavimo slenkstis E<sub>th</sub></b>				<b>VP sužadavimo slenkstis E<sub>th</sub></b>			
Anova, F(2,10) = 7,21, p=0,011				Friedman test, $\chi^2(2) = 6, p=0,05$			
	Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,072	0,299	Kontrolė-1		>0,999	0,375
IP <sub>3</sub> 75 μM	0,072		0,182	IP <sub>3</sub> 150 μM	>0,999		0,375
Kontrolė-2	0,299	0,182		Kontrolė-2	0,375	0,375	
<b>VP smailė</b>				<b>VP smailė</b>			
Anova, F(2,10) = 6,28, p=0,017				Anova, F(2,5) = 26,01, p=0,001			
	Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,098	>0,999	Kontrolė-1		>0,999	0,027
IP <sub>3</sub> 75 μM	0,098		0,038	IP <sub>3</sub> 150 μM	>0,999		0,002
Kontrolė-2	>0,999	0,038		Kontrolė-2	0,027	0,002	
<b>VP amplitudė</b>				<b>VP amplitudė</b>			
Anova, F(2,10) = 10,17, p=0,004				Friedman test, $\chi^2(2) = 0,5, p=0,779$			
	Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,987	0,043	Kontrolė-1		>0,999	>0,999
IP <sub>3</sub> 75 μM	0,987		0,016	IP <sub>3</sub> 150 μM	>0,999		>0,999
Kontrolė-2	0,043	0,016		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	

**P13 pav.** 75 μM (n = 6-8) ir 150 μM (n=4) inozitolio 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) poveikio elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrams (CC, VC1 ir VC2 protokolais) statistinė analizė (tęsinys kitame puslapyje).

IP <sub>3</sub> 75 μM				IP <sub>3</sub> 150 μM			
<b>VP depolarizacijos trukmė <math>t_{dep}</math></b>				<b>VP depolarizacijos trukmė <math>t_{dep}</math></b>			
Anova, $F(2,10) = 2,97, p=0,097$				Friedman test, $\chi^2(2) = 2, p=0,368$			
	Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,432	>0,999	Kontrolė-1		>0,999	>0,999
IP <sub>3</sub> 75 μM	0,432		0,318	IP <sub>3</sub> 150 μM	>0,999		>0,999
Kontrolė-2	>0,999	0,318		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	
<b>VP repolarizacijos trukmė <math>t_{rep}</math></b>				<b>VP repolarizacijos trukmė <math>t_{rep}</math></b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 5,33, p=0,069$				Anova, $F(2,5) = 3,34, p=0,106$			
	Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,939	>0,999	Kontrolė-1		0,396	>0,999
IP <sub>3</sub> 75 μM	0,939		0,094	IP <sub>3</sub> 150 μM	0,396		0,186
Kontrolė-2	>0,999	0,094		Kontrolė-2	>0,999	0,186	
<b>Maksimalus membranos laidumas sužadinimo metu <math>G_{max}</math></b>				<b>Maksimalus membranos laidumas sužadinimo metu <math>G_{max}</math></b>			
Anova, $F(2,14) = 0,66, p=0,534$				Anova, $F(2,5) = 3,6, p=0,094$			
	Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,75	0,097	Kontrolė-1		>0,999	0,51
IP <sub>3</sub> 75 μM	0,75		0,422	IP <sub>3</sub> 150 μM	>0,999		0,141
Kontrolė-2	0,097	0,422		Kontrolė-2	0,51	0,141	
<b>Membranos laidumas ties -250 mV <math>G_{250 mV}</math></b>				<b>Membranos laidumas ties -250 mV <math>G_{250 mV}</math></b>			
Anova, $F(2,14) = 1,34, p=0,292$				Anova, $F(2,5) = 0, p>0,999$			
	Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,795	>0,999	Kontrolė-1		>0,999	>0,999
IP <sub>3</sub> 75 μM	0,795		0,438	IP <sub>3</sub> 150 μM	>0,999		>0,999
Kontrolė-2	>0,999	0,438		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	
<b>Membranos laidumas ties 50 mV <math>G_{50 mV}</math></b>				<b>Membranos laidumas ties 50 mV <math>G_{50 mV}</math></b>			
Anova, $F(2,14) = 0,97, p=0,404$				Anova, $F(2,5) = 0,19, p=0,830$			
	Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999	Kontrolė-1		>0,999	>0,999
IP <sub>3</sub> 75 μM	>0,999		0,786	IP <sub>3</sub> 150 μM	>0,999		>0,999
Kontrolė-2	>0,999	0,786		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	
<b>Sužadinimo srovės amplitudė <math>I_{trans}</math></b>				<b>Sužadinimo srovės amplitudė <math>I_{trans}</math></b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 2,57, p=0,286$				Anova, $F(2,5) = 2,42, p=0,17$			
	Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,891	0,468	Kontrolė-1		>0,999	0,465
IP <sub>3</sub> 75 μM	0,891		>0,999	IP <sub>3</sub> 150 μM	>0,999		0,774
Kontrolė-2	0,468	>0,999		Kontrolė-2	0,465	0,774	
<b>Sužadinimo srovės aktyvacijos trukmė <math>t_{act,trans}</math></b>				<b>Sužadinimo srovės aktyvacijos trukmė <math>t_{act,trans}</math></b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 1,74, p=0,419$				Anova, $F(2,5) = 0,62, p=0,57$			
	Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,483	>0,999	Kontrolė-1		>0,999	>0,999
IP <sub>3</sub> 75 μM	0,483		>0,999	IP <sub>3</sub> 150 μM	>0,999		0,933
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	0,933	
<b>Sužadinimo srovės inaktyvacijos trukmė <math>t_{inact,trans}</math></b>				<b>Sužadinimo srovės inaktyvacijos trukmė <math>t_{inact,trans}</math></b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 0,25, p=0,883$				Friedman test, $\chi^2(2) = 0,5, p=0,779$			
	Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>3</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999	Kontrolė-1		>0,999	>0,999
IP <sub>3</sub> 75 μM	>0,999		>0,999	IP <sub>3</sub> 150 μM	>0,999		>0,999
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	

**P13 pav. (tęsinys)** 75 μM (n = 6-8) ir 150 μM (n=4) inozitolio 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) poveikio elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrams (CC, VC1 ir VC2 protokolas) statistinė analizė.



**P53 lentelė.** 25  $\mu\text{M}$  fosfolipazės C blokatoriaus U73122 ir jo tirpiklio 1 % DMSO poveikis elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrams, CC, VC1 ir VC2 protokolai, n = 4. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistškai reikšmingi skirtumai, palyginus su kontrole ( $p < 0,05$ ).

	Kontrolė	U73122, 25 $\mu\text{M}$	DMSO, 1 %
Membranos rambybės potencialas $R_P$ (mV)	-205 $\pm$ 23	-172 $\pm$ 31	-188 $\pm$ 39
Membranos laidumas rambybės būsenoje $G_{RP}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	0,35 $\pm$ 0,17	0,34 $\pm$ 0,11	0,3 $\pm$ 0,09
VP sužadavimo slenkstis $E_{th}$ (mV)	-100 $\pm$ 13	-100 $\pm$ 6	-100 $\pm$ 10
VP smailė (mV)	29 $\pm$ 10	14 $\pm$ 15	13 $\pm$ 17
VP amplitudė (mV)	129 $\pm$ 16	115 $\pm$ 11	114 $\pm$ 16
VP depoliarizacijos trukmė $t_{dep}$ (s)	1,5 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,3
VP repoliarizacijos trukmė $t_{rep}$ (s)	4,2 $\pm$ 1,9	8,2 $\pm$ 4,9	5,2 $\pm$ 2,9
Maksimalus membranos laidumas sužadavimo metu $G_{max}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	4,98 $\pm$ 2,93	3,94 $\pm$ 3,24	3,74 $\pm$ 2,79
Membranos laidumas ties -250 mV $G_{-250\text{ mV}}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	0,4 $\pm$ 0,14	0,4 $\pm$ 0,08	0,37 $\pm$ 0,09
Membranos laidumas ties 50 mV $G_{50\text{ mV}}$ ( $\text{S}\cdot\text{m}^{-2}$ )	1 $\pm$ 0,44	1,5 $\pm$ 0,81	1,2 $\pm$ 0,55
Sužadavimo srovės amplitudė $I_{trans}$ ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-56 $\pm$ 33	-35 $\pm$ 12	-38 $\pm$ 27
Sužadavimo srovės aktyvacijos trukmė $t_{act\_trans}$ (s)	1,1 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,7	0,8 $\pm$ 0,4
Sužadavimo srovės inaktyvacijos trukmė $t_{inact\_trans}$ (s)	1,9 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 1,9	2,2 $\pm$ 0,8

U73122 25 µM			
<b>Membranos rambybės potencialas RP</b>			
Anovos, F(2,6) = 9,62, p=0,013			
	Kontrolė	U73122 25 µM	DMSO 1%
Kontrolė		0,049	0,423
U73122 25 µM		0,049	0,33
DMSO 1%		0,423	0,33
<b>Membranos laidumas rambybės būsenoje G<sub>ap</sub></b>			
Anovos, F(2,6) = 0,7, p=0,534			
	Kontrolė	U73122 25 µM	DMSO 1%
Kontrolė		>0,999	>0,999
U73122 25 µM		>0,999	>0,999
DMSO 1%		>0,999	>0,999
<b>VP sužadinimo slenkstis E<sub>th</sub></b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 0, p > 0,999$			
	Kontrolė	U73122 25 µM	DMSO 1%
Kontrolė		>0,999	>0,999
U73122 25 µM		>0,999	>0,999
DMSO 1%		>0,999	>0,999
<b>VP smailė</b>			
Anovos, F(2,6) = 3,24, p=0,111			
	Kontrolė	U73122 25 µM	DMSO 1%
Kontrolė		0,281	0,13
U73122 25 µM		0,281	>0,999
DMSO 1%		0,13	>0,999
<b>VP amplitudė</b>			
Anovos, F(2,6) = 2,79, p=0,139			
	Kontrolė	U73122 25 µM	DMSO 1%
Kontrolė		0,367	0,245
U73122 25 µM		0,367	>0,999
DMSO 1%		0,245	>0,999

U73122 25 µM			
<b>VP depolarizacijos trukmė t<sub>dep</sub></b>			
Anovos, F(2,6) = 3,62, p=0,093			
	Kontrolė	U73122 25 µM	DMSO 1%
Kontrolė		0,549	>0,999
U73122 25 µM		0,549	0,345
DMSO 1%		>0,999	0,345
<b>VP repolarizacijos trukmė t<sub>rep</sub></b>			
Anovos, F(2,6) = 5,11, p=0,051			
	Kontrolė	U73122 25 µM	DMSO 1%
Kontrolė		0,309	0,525
U73122 25 µM		0,309	0,33
DMSO 1%		0,525	0,33
<b>Maksimalus membranos laidumas sužadinimo metu G<sub>max</sub></b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 4,5, p = 0,105$			
	Kontrolė	U73122 25 µM	DMSO 1%
Kontrolė		0,75	0,373
U73122 25 µM		0,75	>0,999
DMSO 1%		0,373	>0,999
<b>Membranos laidumas ties -250 mV G<sub>250 mV</sub></b>			
Anovos, F(2,6) = 0,44, p=0,865			
	Kontrolė	U73122 25 µM	DMSO 1%
Kontrolė		>0,999	>0,999
U73122 25 µM		>0,999	0,966
DMSO 1%		>0,999	0,966
<b>Membranos laidumas ties 50 mV G<sub>50 mV</sub></b>			
Anovos, F(2,6) = 5, p = 0,037			
	Kontrolė	U73122 25 µM	DMSO 1%
Kontrolė		0,232	0,342
U73122 25 µM		0,232	0,369
DMSO 1%		0,342	0,369

U73122 25 µM			
<b>Sužadinimo srovės amplitudė I<sub>trans</sub></b>			
Anovos, F(2,6) = 3,38, p=0,104			
	Kontrolė	U73122 25 µM	DMSO 1%
Kontrolė		0,543	0,048
U73122 25 µM		0,543	>0,999
DMSO 1%		0,048	>0,999
<b>Sužadinimo srovės aktyvacijos trukmė t<sub>act, trans</sub></b>			
Anovos, F(2,6) = 5,76, p=0,04			
	Kontrolė	U73122 25 µM	DMSO 1%
Kontrolė		0,281	0,537
U73122 25 µM		0,281	0,268
DMSO 1%		0,537	0,268
<b>Sužadinimo srovės inaktyvacijos trukmė t<sub>inact, trans</sub></b>			
Anovos, F(2,6) = 1,88, p=0,233			
	Kontrolė	U73122 25 µM	DMSO 1%
Kontrolė		0,729	>0,999
U73122 25 µM		0,729	0,768
DMSO 1%		>0,999	0,768

**P14 pav.** 25 µM fosfolipazės C blokatoriaus U73122 ir jo tirpiklio 1 % DMSO poveikio (n = 4) elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrams (CC, VC1 ir VC2 protokolais) statistinė analizė.

IP <sub>6</sub> 75 μM				IP <sub>6</sub> 150 μM			
<b>Membranos ramybės potencialas RP</b>				<b>Membranos ramybės potencialas RP</b>			
Anovą, F(2,12) = 2,84, p=0,098				Friedman test, $\chi^2(2) = 7$ , p=0,03			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,08	0,6	Kontrolė-1		>0,999	0,117
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,08		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		0,234
Kontrolė-2	0,6	>0,999		Kontrolė-2	0,117	0,234	
<b>Membranos laidumas ramybės būsenoje G<sub>RP</sub></b>				<b>Membranos laidumas ramybės būsenoje G<sub>RP</sub></b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 1,56$ , p=0,459				Anovą, F(2,14) = 4,24, p=0,036			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999	Kontrolė-1		>0,999	0,096
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		0,025
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	0,096	0,025	
<b>VP sužadinimo slenkstis E<sub>th</sub></b>				<b>VP sužadinimo slenkstis E<sub>th</sub></b>			
Anovą, F(2,16) = 15,67, p<0,001				Anovą, F(2,14) = 70,38, p<0,001			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,046	0,366	Kontrolė-1		<0,001	0,057
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,046		<0,001	IP <sub>6</sub> 150 μM	<0,001		<0,001
Kontrolė-2	0,366	<0,001		Kontrolė-2	0,057	<0,001	
<b>VP smailė</b>				<b>VP smailė</b>			
Anovą, F(2,16) = 3,74, p=0,047				Anovą, F(2,14) = 26,33, p<0,001			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,227	>0,999	Kontrolė-1		0,001	0,732
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,227		0,001	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,001		<0,001
Kontrolė-2	>0,999	0,001		Kontrolė-2	0,732	<0,001	
<b>VP amplitudė</b>				<b>VP amplitudė</b>			
Anovą, F(2,16) = 2,89, p=0,085				Anovą, F(2,14) = 7,95, p=0,005			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	0,954	Kontrolė-1		0,083	0,918
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		0,006	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,083		0,027
Kontrolė-2	0,954	0,006		Kontrolė-2	0,918	0,027	

**P15 pav.** 75 μM (n = 9) ir 150 μM (n=3-8) inozitolio heksakisfosfato (IP<sub>6</sub>) poveikio elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrams (CC, VC1 ir VC2 protokolais) statistinė analizė (tęsinys kitame puslapyje).

IP <sub>6</sub> 75 μM				IP <sub>6</sub> 150 μM			
<b>VP depolarizacijos trukmė <math>t_{dep}</math></b>				<b>VP depolarizacijos trukmė <math>t_{dep}</math></b>			
Anova, F(2,16) = 1,55, p=0,242				Friedman test, $\chi^2(2) = 7,75$ , p=0,021			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	0,546	Kontrolė-1		0,047	0,369
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		0,098	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,047		0,106
Kontrolė-2	0,546	0,098		Kontrolė-2	0,369	0,106	
<b>VP repolarizacijos trukmė <math>t_{rep}</math></b>				<b>VP repolarizacijos trukmė <math>t_{rep}</math></b>			
Anova, F(2,16) = 5,41, p=0,16				Friedman test, $\chi^2(2) = 6,75$ , p=0,034			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,273	>0,999	Kontrolė-1		0,047	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,273		0,002	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,047		0,047
Kontrolė-2	>0,999	0,002		Kontrolė-2	>0,999	0,047	
<b>Maksimalus membranos laidumas sužadinimo metu <math>G_{max}</math></b>				<b>Maksimalus membranos laidumas sužadinimo metu <math>G_{max}</math></b>			
Anova, F(2,6) = 5,89, p=0,038				Anova, F(2,6) = 5,89, p=0,038			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,579	0,99	Kontrolė-1		0,579	0,99
IP <sub>6</sub> 150 μM	0,579		0,006	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,579		0,006
Kontrolė-2	0,99	0,006		Kontrolė-2	0,99	0,006	
<b>Membranos laidumas ties -250 mV <math>G_{250\text{ mV}}</math></b>				<b>Membranos laidumas ties -250 mV <math>G_{250\text{ mV}}</math></b>			
Anova, F(2,6) = 0,21, p=0,818				Anova, F(2,6) = 0,21, p=0,818			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,801	0,641	Kontrolė-1		0,801	0,641
IP <sub>6</sub> 150 μM	0,801		0,319	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,801		0,319
Kontrolė-2	0,641	0,319		Kontrolė-2	0,641	0,319	
<b>Membranos laidumas ties 50 mV <math>G_{50\text{ mV}}</math></b>				<b>Membranos laidumas ties 50 mV <math>G_{50\text{ mV}}</math></b>			
Anova, F(2,6) = 3,32, p=0,107				Anova, F(2,6) = 3,32, p=0,107			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,161	0,631	Kontrolė-1		0,161	0,631
IP <sub>6</sub> 150 μM	0,161		0,134	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,161		0,134
Kontrolė-2	0,631	0,134		Kontrolė-2	0,631	0,134	
<b>Sužadinimo srovės amplitudė <math>I_{trans}</math></b>				<b>Sužadinimo srovės amplitudė <math>I_{trans}</math></b>			
Anova, F(2,4) = 13,83, p=0,016				Anova, F(2,4) = 13,83, p=0,016			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,72	0,242	Kontrolė-1		0,72	0,242
IP <sub>6</sub> 150 μM	0,72		0,049	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,72		0,049
Kontrolė-2	0,242	0,049		Kontrolė-2	0,242	0,049	
<b>Sužadinimo srovės aktyvacijos trukmė <math>t_{act,trans}</math></b>				<b>Sužadinimo srovės aktyvacijos trukmė <math>t_{act,trans}</math></b>			
Anova, F(2,4) = 4,2, p=0,104				Anova, F(2,4) = 4,2, p=0,104			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,077	>0,999	Kontrolė-1		0,077	>0,999
IP <sub>6</sub> 150 μM	0,077		0,774	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,077		0,774
Kontrolė-2	>0,999	0,774		Kontrolė-2	>0,999	0,774	
<b>Sužadinimo srovės inaktyvacijos trukmė <math>t_{inact,trans}</math></b>				<b>Sužadinimo srovės inaktyvacijos trukmė <math>t_{inact,trans}</math></b>			
Anova, F(2,4) = 4,72, p=0,089				Anova, F(2,4) = 4,72, p=0,089			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,246	0,792	Kontrolė-1		0,246	0,792
IP <sub>6</sub> 150 μM	0,246		0,792	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,246		0,792
Kontrolė-2	0,792	0,792		Kontrolė-2	0,792	0,792	

**P15 pav. (tęsinys)** 75 μM (n = 9) ir 150 μM (n=3-8) inozitolio heksakisfosfato (IP<sub>6</sub>) poveikio elektrinių *Nitellopsis obtusa* signalų parametrams (CC, VC1 ir VC2 protokolais) statistinė analizė.

**P54 lentelė.** 75  $\mu\text{M}$  inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{\text{leak}}$  srovei, VC3 protokolas,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD.

	Kontrolė-1	$\text{IP}_6$ , 75 $\mu\text{M}$	Kontrolė-2
$I_{\text{leak}}$ (-120 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2,4 $\pm$ 1,3	2,2 $\pm$ 0,9	2,6 $\pm$ 1,7
$I_{\text{leak}}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	3,4 $\pm$ 1,3	2,9 $\pm$ 1,1	3,4 $\pm$ 2,1
$I_{\text{leak}}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	4,1 $\pm$ 1,6	3,7 $\pm$ 1,3	4,2 $\pm$ 2,2
$I_{\text{leak}}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	5 $\pm$ 2,2	4,5 $\pm$ 1,7	5,2 $\pm$ 3,2
$I_{\text{leak}}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	5,8 $\pm$ 2,6	5,1 $\pm$ 2,1	6,2 $\pm$ 3,7
$I_{\text{leak}}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	6,6 $\pm$ 3	6 $\pm$ 2,4	6,8 $\pm$ 4,3
$I_{\text{leak}}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	7,7 $\pm$ 3,5	7 $\pm$ 2,6	7,7 $\pm$ 5,2
$I_{\text{leak}}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	9,1 $\pm$ 4,2	7,7 $\pm$ 2,7	8,6 $\pm$ 4,9
$I_{\text{leak}}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	10,4 $\pm$ 4,5	9,2 $\pm$ 3,1	9,9 $\pm$ 5,4
$I_{\text{leak}}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	11,8 $\pm$ 5,2	10,3 $\pm$ 3,3	10,9 $\pm$ 5,9

IP <sub>6</sub> 75 μM				IP <sub>6</sub> 150 μM			
<b>I<sub>leak</sub> (-120 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (-120 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 1,33, p=0,513$				Anova, $F(2,6) = 1,25, p=0,351$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999	Kontrolė-1		>0,999	0,642
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		0,468	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		>0,999
Kontrolė-2	>0,999	0,468		Kontrolė-2	0,642	>0,999	
<b>I<sub>leak</sub> (-100 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (-100 mV)</b>			
Anova, $F(2,16) = 0,9, p=0,427$				Anova, $F(2,12) = 2,41, p=0,132$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,633	>0,999	Kontrolė-1		0,426	0,171
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,633		0,429	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,426		>0,999
Kontrolė-2	>0,999	0,429		Kontrolė-2	0,171	>0,999	
<b>I<sub>leak</sub> (-80 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (-80 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 2, p=0,368$				Anova, $F(2,14) = 2,4, p=0,127$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999	Kontrolė-1		0,252	0,248
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		0,164	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,252		>0,999
Kontrolė-2	>0,999	0,164		Kontrolė-2	0,248	>0,999	
<b>I<sub>leak</sub> (-60 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (-60 mV)</b>			
Anova, $F(2,16) = 0,42, p=0,661$				Anova, $F(2,14) = 1,48, p=0,262$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999	Kontrolė-1		0,57	0,248
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		0,972	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,57		>0,999
Kontrolė-2	>0,999	0,972		Kontrolė-2	0,248	>0,999	
<b>I<sub>leak</sub> (-40 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (-40 mV)</b>			
Anova, $F(2,16) = 0,85, p=0,446$				Anova, $F(2,14) = 0,63, p=0,545$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,783	>0,999	Kontrolė-1		0,957	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,783		0,552	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,957		>0,999
Kontrolė-2	>0,999	0,552		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	
<b>I<sub>leak</sub> (-20 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (-20 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 0, p>0,999$				Anova, $F(2,14) = 0,87, p=0,441$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999	Kontrolė-1		0,414	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,414		>0,999
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	
<b>I<sub>leak</sub> (0 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (0 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 0, p>0,999$				Anova, $F(2,14) = 1,66, p=0,226$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999	Kontrolė-1		0,085	0,367
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,085		>0,999
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	0,367	>0,999	
<b>I<sub>leak</sub> (20 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (20 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 1,35, p=0,508$				Anova, $F(2,12) = 1,15, p=0,35$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999	Kontrolė-1		0,057	0,356
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,057		0,761
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	0,356	0,761	
<b>I<sub>leak</sub> (40 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (40 mV)</b>			
Anova, $F(2,16) = 0,48, p=0,628$				Anova, $F(2,12) = 1,15, p=0,395$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,927	>0,999	Kontrolė-1		0,088	0,951
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,927		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,088		>0,999
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	0,951	>0,999	
<b>I<sub>leak</sub> (60 mV)</b>				<b>I<sub>leak</sub> (60 mV)</b>			
Anova, $F(2,16) = 0,54, p=0,591$				Anova, $F(2,12) = 0,77, p=0,484$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,9	>0,999	Kontrolė-1		0,153	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,9		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,153		>0,999
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	

**P16 pav.** 75 μM (n = 8) ir 150 μM (n=8) inozitolio heksakisfosfato (IP<sub>6</sub>) poveikio *Nitellopsis obtusa* I<sub>leak</sub> srovei (VC3 protokolas) statistinė analizė.

**P55 lentelė.** 75  $\mu\text{M}$  inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{Ca}$  srovei, VC3 protokolas,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su Kontrolė-1 ( $p < 0,05$ ). Pabrauktos vertės, rodančios statistiškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp  $\text{IP}_3$  ir Kontrolės-2 grupių.

	Kontrolė-1	$\text{IP}_6$ , 75 $\mu\text{M}$	Kontrolė-2
$I_{Ca}$ (-120 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-	-9,2 $\pm$ 2,7	-
$I_{Ca}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-10,8 $\pm$ 2,6	-5,9 $\pm$ 1,1	-8,7 $\pm$ 3,4
$I_{Ca}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-8,3 $\pm$ 2,2	-5,2 $\pm$ 1,7	-6,5 $\pm$ 2,2
$I_{Ca}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-6,1 $\pm$ 1,7	<u>-4,2<math>\pm</math>1,8</u>	-5,2 $\pm$ 1,5
$I_{Ca}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-4,5 $\pm$ 1,4	-4 $\pm$ 1,6	-5,1 $\pm$ 2,1
$I_{Ca}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-3,6 $\pm$ 1,9	-3,7 $\pm$ 2	-4,3 $\pm$ 2,3
$I_{Ca}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2,3 $\pm$ 2	<u>-1,5<math>\pm</math>2,6</u>	-3,4 $\pm$ 2,7
$I_{Ca}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-0,7 $\pm$ 2,7	<u>0<math>\pm</math>2,9</u>	-1,4 $\pm$ 3
$I_{Ca}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,7 $\pm$ 3,1	<u>1,5<math>\pm</math>3,4</u>	0,2 $\pm$ 4
$I_{Ca}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2,4 $\pm$ 3,7	2,7 $\pm$ 3,9	1,8 $\pm$ 4,9

IP <sub>6</sub> 75 μM				IP <sub>6</sub> 150 μM			
<b>I<sub>Ca</sub> (-100 mV)</b>							
Friedman test, $\chi^2(2) = 3$ , p=0,223							
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2				
Kontrolē-1		>0,999	>0,999				
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		>0,999				
Kontrolē-2	>0,999	>0,999					
<b>I<sub>Ca</sub> (-80 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub> (-80 mV)</b>			
Anova, F(2,12) = 4,9, p=0,028				Anova, F(2,12) = 12,22, p=0,001			
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2		IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolē-2	
Kontrolē-1		0,05	0,72		0,008	0,111	
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,05		0,384		0,008	0,221	
Kontrolē-2	0,72	0,384			0,111	0,221	
<b>I<sub>Ca</sub> (-60 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub> (-60 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 4,34, p=0,06				Anova, F(2,14) = 8,51, p=0,004			
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2		IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolē-2	
Kontrolē-1		0,173	0,738		0,014	>0,999	
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,173		0,016		0,014	0,072	
Kontrolē-2	0,738	0,016			>0,999	0,072	
<b>I<sub>Ca</sub> (-40 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub> (-40 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 1,45, p=0,267				Anova, F(2,14) = 10,57, p=0,002			
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2		IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolē-2	
Kontrolē-1		>0,999	>0,999		0,023	0,216	
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		0,117		0,023	0,068	
Kontrolē-2	>0,999	0,117			0,216	0,068	
<b>I<sub>Ca</sub> (-20 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub> (-20 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 0,65, p=0,535				Anova, F(2,14) = 15,37, p<0,001			
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2		IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolē-2	
Kontrolē-1		>0,999	>0,999		0,012	0,336	
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		0,645		0,012	0,017	
Kontrolē-2	>0,999	0,645			0,336	0,017	
<b>I<sub>Ca</sub> (0 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub> (0 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 7,47, p=0,006				Friedman test, $\chi^2(2) = 12,25$ , p=0,002			
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2		IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolē-2	
Kontrolē-1		0,594	0,264		0,023	>0,999	
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,594		0,001		0,023	0,023	
Kontrolē-2	0,264	0,001			>0,999	0,023	
<b>I<sub>Ca</sub> (20 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub> (20 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 8,17, p=0,004				Anova, F(2,12) = 11,92, p=0,001			
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2		IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolē-2	
Kontrolē-1		0,232	0,288		0,019	>0,999	
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,232		0,012		0,019	0,017	
Kontrolē-2	0,288	0,012			>0,999	0,017	
<b>I<sub>Ca</sub> (40 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub> (40 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 6,25$ , p=0,044				Anova, F(2,12) = 6,54, p=0,012			
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2		IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolē-2	
Kontrolē-1		0,444	0,585		0,062	0,783	
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,444		0,047		0,062	0,099	
Kontrolē-2	0,585	0,047			0,783	0,099	
<b>I<sub>Ca</sub> (60 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub> (60 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 4,71$ , p=0,095				Anova, F(2,10) = 17,44, p<0,001			
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2		IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolē-2	
Kontrolē-1		>0,999	>0,999		0,01	>0,999	
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		0,444		0,01	0,029	
Kontrolē-2	>0,999	0,444			>0,999	0,029	

**P17 pav.** 75 μM (n = 8) ir 150 μM (n=8) inozitolio heksakisfosfato (IP<sub>6</sub>) poveikio *Nitellopsis obtusa* I<sub>Ca</sub> srovei (VC3 protokolas) statistinė analizė.



**P56 lentelė.** 75  $\mu\text{M}$  inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{\text{Cl}}$  srovei, VC3 protokolas,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su Kontrolė-1 ( $p < 0,05$ ). Pabrauktos vertės, rodančios statistiškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp  $\text{IP}_3$  ir Kontrolės-2 grupių.

	Kontrolė-1	$\text{IP}_6$ , 75 $\mu\text{M}$	Kontrolė-2
$I_{\text{Cl}}$ (-120 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-	-27 $\pm$ 8	-
$I_{\text{Cl}}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-22 $\pm$ 1	-24 $\pm$ 9	-33 $\pm$ 13
$I_{\text{Cl}}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-22 $\pm$ 7	-21 $\pm$ 8	-26 $\pm$ 7
$I_{\text{Cl}}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-21 $\pm$ 6	-19 $\pm$ 6	-22 $\pm$ 8
$I_{\text{Cl}}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-19 $\pm$ 5	-14 $\pm$ 4	-18 $\pm$ 7
$I_{\text{Cl}}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-16 $\pm$ 5	-12 $\pm$ 4	-15 $\pm$ 7
$I_{\text{Cl}}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-13 $\pm$ 3	-10 $\pm$ 3	-13 $\pm$ 7
$I_{\text{Cl}}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-10 $\pm$ 3	-8 $\pm$ 4	-10 $\pm$ 6
$I_{\text{Cl}}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-6 $\pm$ 4	<u>-4<math>\pm</math>4</u>	-7 $\pm$ 4
$I_{\text{Cl}}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2 $\pm$ 6	-1 $\pm$ 5	-4 $\pm$ 5

IP <sub>6</sub> 75 μM				IP <sub>6</sub> 150 μM			
<b>I<sub>CI</sub> (-100 mV)</b>							
Friedman test, $\chi^2(2) = 4$ , p=0,135							
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2				
Kontrolė-1		>0,999	>0,999				
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		>0,999				
Kontrolė-2	>0,999	>0,999					
<b>I<sub>CI</sub> (-80 mV)</b>				<b>I<sub>CI</sub> (-80 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 3,71$ , p=0,135				Anova, F(2,10) = 1,31, p=0,313			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	0,468			0,637	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		0,891		IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999	>0,999
Kontrolė-2	0,468	0,891			Kontrolė-2	>0,999	>0,999
<b>I<sub>CI</sub> (-60 mV)</b>				<b>I<sub>CI</sub> (-60 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 4,75$ , p=0,093				Friedman test, $\chi^2(2) = 0,25$ , p=0,882			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,234	>0,999			>0,999	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,234		0,444		IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999	>0,999
Kontrolė-2	>0,999	0,444			Kontrolė-2	>0,999	>0,999
<b>I<sub>CI</sub> (-40 mV)</b>				<b>I<sub>CI</sub> (-40 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 7,75$ , p=0,021				Friedman test, $\chi^2(2) = 1$ , p=0,607			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,023	>0,999			>0,999	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,023		0,164		IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999	>0,999
Kontrolė-2	>0,999	0,164			Kontrolė-2	>0,999	>0,999
<b>I<sub>CI</sub> (-20 mV)</b>				<b>I<sub>CI</sub> (-20 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 4,19, p=0,037				Friedman test, $\chi^2(2) = 3,25$ , p=0,197			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,044	>0,999			0,327	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,044		0,091		IP <sub>6</sub> 150 μM	0,327	>0,999
Kontrolė-2	>0,999	0,091			Kontrolė-2	>0,999	>0,999
<b>I<sub>CI</sub> (0 mV)</b>				<b>I<sub>CI</sub> (0 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 2,5, p=0,118				Friedman test, $\chi^2(2) = 1,75$ , p=0,417			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,088	>0,999			0,75	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,088		0,216		IP <sub>6</sub> 150 μM	0,75	>0,999
Kontrolė-2	>0,999	0,216			Kontrolė-2	>0,999	>0,999
<b>I<sub>CI</sub> (20 mV)</b>				<b>I<sub>CI</sub> (20 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 1,78, p=0,204				Friedman test, $\chi^2(2) = 7,71$ , p=0,021			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,327	>0,999			0,234	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,327		0,28		IP <sub>6</sub> 150 μM	0,234	0,047
Kontrolė-2	>0,999	0,28			Kontrolė-2	n.s.	0,047
<b>I<sub>CI</sub> (40 mV)</b>				<b>I<sub>CI</sub> (40 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 11,57, p=0,001				Friedman test, $\chi^2(2) = 6$ , p=0,05			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,004	>0,999			>0,999	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,004		0,003		IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999	0,047
Kontrolė-2	>0,999	0,003			Kontrolė-2	>0,999	0,047
<b>I<sub>CI</sub> (60 mV)</b>				<b>I<sub>CI</sub> (60 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 2,03, p=0,168				Anova, F(2,12) = 16,76, p<0,001			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,432	>0,999			0,025	0,357
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,432		0,603		IP <sub>6</sub> 150 μM	0,025	0,008
Kontrolė-2	>0,999	0,603			Kontrolė-2	0,357	0,008

**P18 pav.** 75 μM (n = 8) ir 150 μM (n=8) inozitolio heksakisfosfato (IP<sub>6</sub>) poveikio *Nitellopsis obtusa* I<sub>CI</sub> srovei (VC3 protokolas) statistinė analizė.

**P57 lentelė.** 75  $\mu\text{M}$  inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{\text{CaCl}}$  srovei, VC3 protokolas,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su Kontrolė-1 ( $p < 0,05$ ). Pabrauktos vertės, rodančios statistiškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp  $\text{IP}_3$  ir Kontrolės-2 grupių.

	Kontrolė-1	$\text{IP}_6$ , 75 $\mu\text{M}$	Kontrolė-2
$I_{\text{CaCl}}$ (-120 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-	-36 $\pm$ 11	-
$I_{\text{CaCl}}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-33 $\pm$ 3	-30 $\pm$ 9	-42 $\pm$ 16
$I_{\text{CaCl}}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-31 $\pm$ 7	-26 $\pm$ 8	-32 $\pm$ 8
$I_{\text{CaCl}}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-27 $\pm$ 6	-23 $\pm$ 7	-27 $\pm$ 9
$I_{\text{CaCl}}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-23 $\pm$ 5	-18 $\pm$ 5	-23 $\pm$ 9
$I_{\text{CaCl}}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-19 $\pm$ 5	-15 $\pm$ 5	-20 $\pm$ 9
$I_{\text{CaCl}}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-15 $\pm$ 4	-12 $\pm$ 5	-16 $\pm$ 9
$I_{\text{CaCl}}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-11 $\pm$ 4	-9 $\pm$ 5	-12 $\pm$ 7
$I_{\text{CaCl}}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-7 $\pm$ 5	<u>-5<math>\pm</math>4</u>	-8 $\pm$ 5
$I_{\text{CaCl}}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2 $\pm$ 6	-1 $\pm$ 5	-4 $\pm$ 5

IP <sub>6</sub> 75 μM				IP <sub>6</sub> 150 μM			
<b>I<sub>Ca</sub>Cl (-100 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (-80 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 3, p=0,223$				Anova, $F(2,10) = 0,08, p=0,924$			
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2		Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolē-2
Kontrolē-1		>0,999	>0,999	Kontrolē-1		>0,999	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		>0,999
Kontrolē-2	>0,999	>0,999		Kontrolē-2	>0,999	>0,999	
<b>I<sub>Ca</sub>Cl (-80 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (-60 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 6, p=0,05$				Friedman test, $\chi^2(2) = 2,25, p=0,325$			
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2		Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolē-2
Kontrolē-1		0,468	>0,999	Kontrolē-1		0,75	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,468		0,468	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,75		>0,999
Kontrolē-2	>0,999	0,468		Kontrolē-2	>0,999	>0,999	
<b>I<sub>Ca</sub>Cl (-60 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (-40 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 7, p=0,03$				Friedman test, $\chi^2(2) = 7,75, p=0,021$			
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2		Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolē-2
Kontrolē-1		0,047	>0,999	Kontrolē-1		0,327	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,047		0,444	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,327		>0,999
Kontrolē-2	>0,999	0,444		Kontrolē-2	>0,999	>0,999	
<b>I<sub>Ca</sub>Cl (-40 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (-20 mV)</b>			
Anova, $F(2,14) = 4,01, p=0,042$				Friedman test, $\chi^2(2) = 6,25, p=0,044$			
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2		Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolē-2
Kontrolē-1		0,043	>0,999	Kontrolē-1		0,023	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,043		0,083	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,023		0,583
Kontrolē-2	>0,999	0,083		Kontrolē-2	>0,999	0,583	
<b>I<sub>Ca</sub>Cl (-20 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (0 mV)</b>			
Anova, $F(2,14) = 4,01, p=0,042$				Friedman test, $\chi^2(2) = 3,6, p=0,055$			
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2		Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolē-2
Kontrolē-1		0,043	>0,999	Kontrolē-1		0,077	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,043		0,083	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,077		0,069
Kontrolē-2	>0,999	0,083		Kontrolē-2	>0,999	0,069	
<b>I<sub>Ca</sub>Cl (0 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (20 mV)</b>			
Anova, $F(2,14) = 3,6, p=0,055$				Friedman test, $\chi^2(2) = 7, p=0,03$			
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2		Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolē-2
Kontrolē-1		0,077	>0,999	Kontrolē-1		0,07	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,077		0,069	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,07		0,164
Kontrolē-2	>0,999	0,069		Kontrolē-2	>0,999	0,164	
<b>I<sub>Ca</sub>Cl (20 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (40 mV)</b>			
Anova, $F(2,14) = 3,68, p=0,052$				Friedman test, $\chi^2(2) = 10,57, p=0,005$			
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2		Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolē-2
Kontrolē-1		0,13	>0,999	Kontrolē-1		0,047	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,13		0,076	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,047		0,047
Kontrolē-2	>0,999	0,076		Kontrolē-2	>0,999	0,047	
<b>I<sub>Ca</sub>Cl (40 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (60 mV)</b>			
Anova, $F(2,14) = 13,32, p<0,001$				Friedman test, $\chi^2(2) = 6, p=0,05$			
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2		Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolē-2
Kontrolē-1		0,029	>0,999	Kontrolē-1		>0,999	0,891
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,029		0,002	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		0,047
Kontrolē-2	>0,999	0,002		Kontrolē-2	0,891	0,047	
<b>I<sub>Ca</sub>Cl (60 mV)</b>				<b>I<sub>Ca</sub>Cl (60 mV)</b>			
Anova, $F(2,14) = 3,52, p=0,058$				Anova, $F(2,12) = 11,97, p<0,001$			
	Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolē-2		Kontrolē-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolē-2
Kontrolē-1		0,893	0,714	Kontrolē-1		0,008	0,585
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,303		0,136	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,008		0,004
Kontrolē-2	0,714	0,136		Kontrolē-2	0,585	0,004	

**P19 pav.** 75 μM (n = 8) ir 150 μM (n=8) inozitolio heksakisfosfato (IP<sub>6</sub>) poveikio *Nitellopsis obtusa* I<sub>CaCl</sub> srovei (VC3 protokolas) statistinė analizė.

P58 lentelė. 75  $\mu\text{M}$  inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikis *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių aktyvacijos trukmei  $t_{act}$ , VC3 protokolas,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su Kontrolė-1 ( $p < 0,05$ ). Pabrauktos vertės, rodančios statistiškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp  $\text{IP}_3$  ir Kontrolės-2 grupių.

	Kontrolė-1	$\text{IP}_6$ , 75 $\mu\text{M}$	Kontrolė-2
$t_{act}$ (-120 mV) (s)	-	1,2 $\pm$ 0,2	-
$t_{act}$ (-100 mV) (s)	0,9 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,1
$t_{act}$ (-80 mV) (s)	1,1 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1
$t_{act}$ (-60 mV) (s)	1,1 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2
$t_{act}$ (-40 mV) (s)	1,2 $\pm$ 0,2	<u>1,3<math>\pm</math>0,2</u>	1,2 $\pm$ 0,1
$t_{act}$ (-20 mV) (s)	1,2 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,1
$t_{act}$ (0 mV) (s)	1,2 $\pm$ 0,2	<u>1,4<math>\pm</math>0,2</u>	1,2 $\pm$ 0,2
$t_{act}$ (20 mV) (s)	1,3 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,2
$t_{act}$ (40 mV) (s)	1,4 $\pm$ 0,3	<u>1,5<math>\pm</math>0,3</u>	1,3 $\pm$ 0,2
$t_{act}$ (60 mV) (s)	0,4 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,3

IP <sub>6</sub> 75 μM				IP <sub>6</sub> 150 μM			
<b>t<sub>act</sub> (-100 mV)</b>				<b>t<sub>act</sub> (-80 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 3, p = 0,223$				Anova, F(2,12) = 3,68, p = 0,057			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999	Kontrolė-1		0,038	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		>0,999	IP <sub>6</sub> 75 μM	0,038		0,117
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	0,117	
<b>t<sub>act</sub> (-80 mV)</b>				<b>t<sub>act</sub> (-60 mV)</b>			
Anova, F(2,12) = 5,22, p = 0,02				Friedman test, $\chi^2(2) = 12, p = 0,002$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,046	>0,999	Kontrolė-1		0,023	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,046		0,156	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,023		0,042
Kontrolė-2	>0,999	0,156		Kontrolė-2	>0,999	0,042	
<b>t<sub>act</sub> (-60 mV)</b>				<b>t<sub>act</sub> (-40 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 6,21, p = 0,012				Anova, F(2,14) = 17,84, p < 0,001			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,12	>0,999	Kontrolė-1		0,006	0,044
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,12		0,005	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,006		0,022
Kontrolė-2	>0,999	0,005		Kontrolė-2	0,044	0,022	
<b>t<sub>act</sub> (-40 mV)</b>				<b>t<sub>act</sub> (-20 mV)</b>			
Anova, F(2,12) = 2,59, p = 0,110				Friedman test, $\chi^2(2) = 13, p = 0,002$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,139	>0,999	Kontrolė-1		0,023	0,123
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,139		0,284	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,023		0,023
Kontrolė-2	>0,999	0,284		Kontrolė-2	0,123	0,023	
<b>t<sub>act</sub> (-20 mV)</b>				<b>t<sub>act</sub> (0 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 11,62, p = 0,001				Friedman test, $\chi^2(2) = 12,45, p = 0,002$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,004	>0,999	Kontrolė-1		0,042	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,004		0,021	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,042		0,023
Kontrolė-2	>0,999	0,021		Kontrolė-2	>0,999	0,023	
<b>t<sub>act</sub> (0 mV)</b>				<b>t<sub>act</sub> (20 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 3,68, p = 0,091				Friedman test, $\chi^2(2) = 11,19, p = 0,004$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,171	>0,999	Kontrolė-1		0,064	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,171		0,154	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,064		0,067
Kontrolė-2	>0,999	0,154		Kontrolė-2	>0,999	0,067	
<b>t<sub>act</sub> (20 mV)</b>				<b>t<sub>act</sub> (40 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 10,62, p = 0,002				Friedman test, $\chi^2(2) = 7, p = 0,03$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,01	0,75	Kontrolė-1		>0,999	0,094
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,01		0,02	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		>0,999
Kontrolė-2	0,75	0,02		Kontrolė-2	0,094	>0,999	
<b>t<sub>act</sub> (40 mV)</b>				<b>t<sub>act</sub> (60 mV)</b>			
Anova, F(2,10) = 4,97, p = 0,032				Anova, F(2,10) = 4,97, p = 0,032			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,181	>0,999	Kontrolė-1		0,181	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,181		0,136	IP <sub>6</sub> 75 μM	0,181		0,136
Kontrolė-2	>0,999	0,136		Kontrolė-2	>0,999	0,136	

**P20 pav.** 75 μM (n = 8) ir 150 μM (n=8) inozitolio heksakisfosfato (IP<sub>6</sub>) poveikio *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių aktyvacijos trukmei  $t_{act}$  (VC3 protokolas) statistinė analizė.

**P59 lentelė.** 75  $\mu$ M inozitolio heksakisfosfato (IP<sub>6</sub>) poveikis *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių inaktyvacijos trukmei  $t_{inact}$ , VC3 protokolas, n = 8. Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su Kontrolė-1 ( $p < 0,05$ ). Pabrauktos vertės, rodančios statistiškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp IP<sub>3</sub> ir Kontrolės-2 grupių.

	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> , 75 $\mu$ M	Kontrolė-2
$t_{inact}$ (-120 mV) (s)	-	2 $\pm$ 0,6	-
$t_{inact}$ (-100 mV) (s)	1,3 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,7	2,3 $\pm$ 1,1
$t_{inact}$ (-80 mV) (s)	1,6 $\pm$ 0,4	<u>2,5<math>\pm</math>0,8</u>	1,9 $\pm$ 0,7
$t_{inact}$ (-60 mV) (s)	1,8 $\pm$ 0,4	<u>2,7<math>\pm</math>0,8</u>	2,2 $\pm$ 0,9
$t_{inact}$ (-40 mV) (s)	2,1 $\pm$ 0,4	<u>2,8<math>\pm</math>1</u>	2,2 $\pm$ 0,9
$t_{inact}$ (-20 mV) (s)	2,2 $\pm$ 0,6	2,6 $\pm$ 0,8	2,3 $\pm$ 1
$t_{inact}$ (0 mV) (s)	2,4 $\pm$ 0,8	3,2 $\pm$ 1,1	2,3 $\pm$ 0,8
$t_{inact}$ (20 mV) (s)	2,3 $\pm$ 0,9	3,7 $\pm$ 3,2	2,3 $\pm$ 1,1
$t_{inact}$ (40 mV) (s)	1,5 $\pm$ 0,8	2,9 $\pm$ 1,5	2,6 $\pm$ 1,2
$t_{inact}$ (60 mV) (s)	1,6 $\pm$ 0,8	2 $\pm$ 0,4	1,9 $\pm$ 0,5

IP <sub>6</sub> 75 μM				IP <sub>6</sub> 150 μM			
<b>t<sub>inact</sub> (-100 mV)</b>				<b>t<sub>inact</sub> (-80 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 4, p=0,135$				Anova, $F(2,10) = 6,38, p=0,016$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999	Kontrolė-1		0,121	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		0,193
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	0,193	
<b>t<sub>inact</sub> (-80 mV)</b>				<b>t<sub>inact</sub> (-60 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 10,57, p=0,005$				Friedman test, $\chi^2(2) = 12,45, p=0,002$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,047	>0,999	Kontrolė-1		0,023	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,047		0,047	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,023		0,042
Kontrolė-2	>0,999	0,047		Kontrolė-2	>0,999	0,042	
<b>t<sub>inact</sub> (-60 mV)</b>				<b>t<sub>inact</sub> (-40 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 13, p=0,002$				Friedman test, $\chi^2(2) = 12,25, p=0,002$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,023	0,75	Kontrolė-1		0,023	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,023		0,023	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,023		0,042
Kontrolė-2	0,75	0,023		Kontrolė-2	>0,999	0,042	
<b>t<sub>inact</sub> (-40 mV)</b>				<b>t<sub>inact</sub> (-20 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 12,25, p=0,002$				Friedman test, $\chi^2(2) = 12, p=0,003$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,023	>0,999	Kontrolė-1		0,042	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,023		0,041	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,042		0,023
Kontrolė-2	>0,999	0,041		Kontrolė-2	>0,999	0,023	
<b>t<sub>inact</sub> (-20 mV)</b>				<b>t<sub>inact</sub> (0 mV)</b>			
Anova, $F(2,14) = 1,09, p=0,362$				Anova, $F(2,14) = 4,25, p=0,036$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		n.s.	>0,999	Kontrolė-1		0,061	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	n.s.		n.s.	IP <sub>6</sub> 75 μM	0,061		0,137
Kontrolė-2	n.s.	n.s.		Kontrolė-2	>0,999	0,137	
<b>t<sub>inact</sub> (0 mV)</b>				<b>t<sub>inact</sub> (20 mV)</b>			
Anova, $F(2,14) = 4,25, p=0,036$				Friedman test, $\chi^2(2) = 9,75, p=0,008$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,061	>0,999	Kontrolė-1		0,047	0,938
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,061		0,137	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,047		0,023
Kontrolė-2	>0,999	0,137		Kontrolė-2	0,938	0,023	
<b>t<sub>inact</sub> (20 mV)</b>				<b>t<sub>inact</sub> (40 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 3, p=0,223$				Friedman test, $\chi^2(2) = 11,19, p=0,004$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,234	>0,999	Kontrolė-1		0,047	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,234		0,75	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,047		0,047
Kontrolė-2	>0,999	0,75		Kontrolė-2	>0,999	0,047	
<b>t<sub>inact</sub> (40 mV)</b>				<b>t<sub>inact</sub> (60 mV)</b>			
Anova, $F(2,8) = 1,02, p=0,402$				Anova, $F(2,6) = 21,86, p=0,002$			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,728	>0,999	Kontrolė-1		0,042	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,728		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,042		0,033
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	0,033	
<b>t<sub>inact</sub> (60 mV)</b>							
Anova, $F(2,4) = 0,22, p=0,808$							
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2				
Kontrolė-1		>0,999	>0,999				
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		>0,999				
Kontrolė-2	>0,999	>0,999					

**P21 pav.** 75 μM (n = 8) ir 150 μM (n=8) inozitolio heksakisfosfato (IP<sub>6</sub>) poveikio *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių aktyvacijos trukmei  $t_{INAct}$  (VC3 protokolas) statistinė analizė.



**P60 lentelė.** 75  $\mu\text{M}$  inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_K$  srovei, VC3 protokolais,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD.

	Kontrolė-1	$\text{IP}_6$ , 75 $\mu\text{M}$	Kontrolė-2
$I_K$ (-120 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	c	-1,8 $\pm$ 1,4	-
$I_K$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2,2 $\pm$ 2,5	-1,8 $\pm$ 1,5	-2,6 $\pm$ 3,3
$I_K$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,8 $\pm$ 2,3	-1,6 $\pm$ 1,7	-1,7 $\pm$ 2,7
$I_K$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,4 $\pm$ 2,7	-1,5 $\pm$ 2	-1,7 $\pm$ 3,4
$I_K$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,1 $\pm$ 3,1	-1,2 $\pm$ 2,1	-0,6 $\pm$ 1,7
$I_K$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-0,1 $\pm$ 3	-0,5 $\pm$ 2,1	-0,1 $\pm$ 1,9
$I_K$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,5 $\pm$ 3,4	0 $\pm$ 3,1	0,6 $\pm$ 2,3
$I_K$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	1,4 $\pm$ 4,2	0,6 $\pm$ 3,6	2,1 $\pm$ 3,3
$I_K$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	1,5 $\pm$ 4,9	1,2 $\pm$ 4,1	1,8 $\pm$ 4,3
$I_K$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	1,7 $\pm$ 5,2	1,5 $\pm$ 4,8	2,2 $\pm$ 5,2

IP <sub>6</sub> 75 μM				IP <sub>6</sub> 150 μM			
<b>I<sub>K</sub> (-100 mV)</b>				<b>I<sub>K</sub> (-100 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 3$ , p=0,223				Friedman test, $\chi^2(2) = 4,33$ , p=0,115			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999	Kontrolė-1		0,188	0,939
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,188		0,281
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	0,939	0,281	
<b>I<sub>K</sub> (-80 mV)</b>				<b>I<sub>K</sub> (-80 mV)</b>			
Anova, F(2,12) = 0,04, p=0,957				Friedman test, $\chi^2(2) = 9$ , p=0,011			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999	Kontrolė-1		0,164	0,234
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,164		0,047
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	0,234	0,047	
<b>I<sub>K</sub> (-60 mV)</b>				<b>I<sub>K</sub> (-60 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 0,04, p=0,963				Friedman test, $\chi^2(2) = 9$ , p=0,011			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999	Kontrolė-1		0,234	0,047
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,234		0,07
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	0,047	0,07	
<b>I<sub>K</sub> (-40 mV)</b>				<b>I<sub>K</sub> (-40 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 0,47, p=0,634				Friedman test, $\chi^2(2) = 14,25$ , p<0,001			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999	Kontrolė-1		0,444	0,023
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		0,129	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,444		0,023
Kontrolė-2	>0,999	0,129		Kontrolė-2	0,023	0,023	
<b>I<sub>K</sub> (-20 mV)</b>				<b>I<sub>K</sub> (-20 mV)</b>			
Anova, F(2,14) = 0,62, p=0,551				Friedman test, $\chi^2(2) = 5,25$ , p=0,072			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999	Kontrolė-1		0,444	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		0,3	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,181		0,226
Kontrolė-2	>0,999	0,3		Kontrolė-2	>0,999	0,226	
<b>I<sub>K</sub> (0 mV)</b>				<b>I<sub>K</sub> (0 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 4,75$ , p=0,093				Anova, F(2,12) = 3,88, p=0,05			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,585	>0,999	Kontrolė-1		0,33	>0,999
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,585		0,117	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,33		0,411
Kontrolė-2	>0,999	0,117		Kontrolė-2	>0,999	0,411	
<b>I<sub>K</sub> (20 mV)</b>				<b>I<sub>K</sub> (20 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 1,75$ , p=0,417				Anova, F(2,12) = 2,83, p=0,099			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999	Kontrolė-1		0,942	0,942
IP <sub>6</sub> 75 μM	>0,999		0,75	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		>0,999
Kontrolė-2	>0,999	0,75		Kontrolė-2	0,942	>0,999	
<b>I<sub>K</sub> (40 mV)</b>				<b>I<sub>K</sub> (40 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 1,75$ , p=0,417				Anova, F(2,12) = 0,74, p=0,497			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,164	>0,999	Kontrolė-1		0,552	0,552
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,164		0,444	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		>0,999
Kontrolė-2	>0,999	0,444		Kontrolė-2	0,552	>0,999	
<b>I<sub>K</sub> (60 mV)</b>				<b>I<sub>K</sub> (60 mV)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 1,75$ , p=0,417				Anova, F(2,12) = 0,78, p=0,482			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 75 μM	Kontrolė-2		Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		0,164	>0,999	Kontrolė-1		0,552	0,552
IP <sub>6</sub> 75 μM	0,164		0,444	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		>0,999
Kontrolė-2	>0,999	0,444		Kontrolė-2	0,552	>0,999	

**P22 pav.** 75 μM (n = 8) ir 150 μM (n=8) inozitolio heksakisfosfato (IP<sub>6</sub>) poveikio *Nitellopsis obtusa* I<sub>K</sub> srovei (VC3 protokolas) statistinė analizė.

**P61 lentelė.** 150  $\mu\text{M}$  inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{\text{leak}}$  srovei, VC3 protokolas,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD.

	Kontrolė-1	$\text{IP}_6$ , 150 $\mu\text{M}$	Kontrolė-2
$I_{\text{leak}}$ (-120 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	1,8 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,7
$I_{\text{leak}}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	2,4 $\pm$ 0,6	2,6 $\pm$ 0,8	2,7 $\pm$ 0,8
$I_{\text{leak}}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	3,1 $\pm$ 0,8	3,4 $\pm$ 1	3,4 $\pm$ 0,9
$I_{\text{leak}}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	3,8 $\pm$ 1,1	4,1 $\pm$ 1,4	4,2 $\pm$ 1,2
$I_{\text{leak}}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	4,6 $\pm$ 1,4	4,9 $\pm$ 1,6	4,8 $\pm$ 1,1
$I_{\text{leak}}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	5,3 $\pm$ 1,7	5,7 $\pm$ 1,6	5,8 $\pm$ 1,5
$I_{\text{leak}}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	5,6 $\pm$ 1,5	6,9 $\pm$ 2	7,2 $\pm$ 3
$I_{\text{leak}}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	6,4 $\pm$ 1,7	7,9 $\pm$ 2,4	7,8 $\pm$ 3,9
$I_{\text{leak}}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	7,4 $\pm$ 1,8	9,1 $\pm$ 2,8	9,5 $\pm$ 5,3
$I_{\text{leak}}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	8,7 $\pm$ 2,1	10,4 $\pm$ 3,3	11,5 $\pm$ 7,5

**P62 lentelė.** 150  $\mu\text{M}$  inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{\text{Ca}}$  srovei, VC3 protokolas,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su Kontrolė-1 ( $p < 0,05$ ). Pabrauktos vertės, rodančios statistiškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp  $\text{IP}_3$  ir Kontrolės-2 grupių.

	Kontrolė-1	$\text{IP}_6$ , 150 $\mu\text{M}$	Kontrolė-2
$I_{\text{Ca}}$ (-120 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-	-7,6 $\pm$ 1,8	-
$I_{\text{Ca}}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-9,4 $\pm$ 3,7	-5,2 $\pm$ 1,8	-
$I_{\text{Ca}}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-8,4 $\pm$ 2,4	-4,6 $\pm$ 1,7	-5,8 $\pm$ 1,3
$I_{\text{Ca}}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-6,4 $\pm$ 1,9	-4 $\pm$ 1,6	-5,8 $\pm$ 1,4
$I_{\text{Ca}}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-5,5 $\pm$ 1,4	-2,8 $\pm$ 2,4	-4,8 $\pm$ 0,9
$I_{\text{Ca}}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-4,3 $\pm$ 1,8	<u>-1<math>\pm</math>2,1</u>	-3,7 $\pm$ 1,2
$I_{\text{Ca}}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-2,8 $\pm$ 1,9	<u>0,3<math>\pm</math>1,6</u>	-2,6 $\pm$ 1,3
$I_{\text{Ca}}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-1,1 $\pm$ 1,6	<u>1,1<math>\pm</math>1,7</u>	-1 $\pm$ 1,5
$I_{\text{Ca}}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,3 $\pm$ 1	1,7 $\pm$ 1,9	-0,3 $\pm$ 1,4
$I_{\text{Ca}}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,7 $\pm$ 1,2	<u>2,5<math>\pm</math>1,7</u>	0,6 $\pm$ 1,2

**P63 lentelė.** 150  $\mu\text{M}$  inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{Cl}$  srovei, VC3 protokolas,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistškai reikšmingi skirtumai, palyginus su Kontrolė-1 ( $p < 0,05$ ). Pabrauktos vertės, rodančios statistškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp  $\text{IP}_3$  ir Kontrolės-2 grupių.

	Kontrolė-1	$\text{IP}_6$ , 150 $\mu\text{M}$	Kontrolė-2
$I_{Cl}$ (-120 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-	-37 $\pm$ 8	-
$I_{Cl}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-29 $\pm$ 8	-37 $\pm$ 17	-
$I_{Cl}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-27 $\pm$ 11	-31 $\pm$ 12	-25 $\pm$ 7
$I_{Cl}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-23 $\pm$ 8	-24 $\pm$ 10	-25 $\pm$ 13
$I_{Cl}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-20 $\pm$ 7	-19 $\pm$ 9	-20 $\pm$ 11
$I_{Cl}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-17 $\pm$ 6	-15 $\pm$ 7	-17 $\pm$ 9
$I_{Cl}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-13 $\pm$ 5	-12 $\pm$ 7	-13 $\pm$ 7
$I_{Cl}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-10 $\pm$ 4	<u>-7<math>\pm</math>5</u>	-12 $\pm$ 6
$I_{Cl}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-4 $\pm$ 8	<u>-2<math>\pm</math>5</u>	-9 $\pm$ 5
$I_{Cl}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-3 $\pm$ 4	<u>3<math>\pm</math>4</u>	-5 $\pm$ 3

**P64 lentelė.** 150  $\mu\text{M}$  inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_{CaCl}$  srovei, VC3 protokolas,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistškai reikšmingi skirtumai, palyginus su Kontrolė-1 ( $p < 0,05$ ). Pabrauktos vertės, rodančios statistškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp  $\text{IP}_3$  ir Kontrolės-2 grupių.

	Kontrolė-1	$\text{IP}_6$ , 150 $\mu\text{M}$	Kontrolė-2
$I_{CaCl}$ (-120 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-	-45 $\pm$ 8	-
$I_{CaCl}$ (-100 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-38 $\pm$ 10	-42 $\pm$ 18	-
$I_{CaCl}$ (-80 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-35 $\pm$ 11	-35 $\pm$ 13	-30 $\pm$ 8
$I_{CaCl}$ (-60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-29 $\pm$ 8	-28 $\pm$ 11	-31 $\pm$ 14
$I_{CaCl}$ (-40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-26 $\pm$ 7	-22 $\pm$ 10	-25 $\pm$ 11
$I_{CaCl}$ (-20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-21 $\pm$ 7	-16 $\pm$ 7	-20 $\pm$ 10
$I_{CaCl}$ (0 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-16 $\pm$ 6	-12 $\pm$ 7	-16 $\pm$ 8
$I_{CaCl}$ (20 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-11 $\pm$ 5	<u>-8<math>\pm</math>5</u>	-13 $\pm$ 5
$I_{CaCl}$ (40 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-4 $\pm$ 8	<u>-2<math>\pm</math>6</u>	-10 $\pm$ 4
$I_{CaCl}$ (60 mV) ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	-3 $\pm$ 4	<u>3<math>\pm</math>4</u>	-5 $\pm$ 3

**P65 lentelė.** 150  $\mu\text{M}$  inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikis *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių aktyvacijos trukmei  $t_{act}$ , VC3 protokolais,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su Kontrolė-1 ( $p < 0,05$ ). Pabrauktos vertės, rodančios statistiškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp  $\text{IP}_3$  ir Kontrolės-2 grupių.

	Kontrolė-1	$\text{IP}_6$ , 150 $\mu\text{M}$	Kontrolė-2
$t_{act}$ (-120 mV) (s)	-	1,5 $\pm$ 0,3	-
$t_{act}$ (-100 mV) (s)	1,2 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,3	-
$t_{act}$ (-80 mV) (s)	1,1 $\pm$ 0,3	<u>1,5<math>\pm</math>0,3</u>	1,2 $\pm$ 0,2
$t_{act}$ (-60 mV) (s)	1,2 $\pm$ 0,3	<u>1,5<math>\pm</math>0,4</u>	1,2 $\pm$ 0,3
$t_{act}$ (-40 mV) (s)	1,2 $\pm$ 0,3	<u>1,5<math>\pm</math>0,4</u>	1,3 $\pm$ 0,3
$t_{act}$ (-20 mV) (s)	1,3 $\pm$ 0,3	<u>1,6<math>\pm</math>0,4</u>	1,3 $\pm$ 0,3
$t_{act}$ (0 mV) (s)	1,4 $\pm$ 0,3	<u>1,7<math>\pm</math>0,5</u>	1,4 $\pm$ 0,3
$t_{act}$ (20 mV) (s)	1,4 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,7	1,4 $\pm$ 0,4
$t_{act}$ (40 mV) (s)	1,5 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,8	1,4 $\pm$ 0,4
$t_{act}$ (60 mV) (s)	1,5 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,2

**P66 lentelė.** 150  $\mu\text{M}$  inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikis *Nitellopsis obtusa* sužadavimo metu tekančių srovių inaktyvacijos trukmei  $t_{inact}$ , VC3 protokolais,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD.

	Kontrolė-1	$\text{IP}_6$ , 150 $\mu\text{M}$	Kontrolė-2
$t_{inact}$ (-120 mV) (s)	-	2,8 $\pm$ 1,6	-
$t_{inact}$ (-100 mV) (s)	1,6 $\pm$ 0,5	2,7 $\pm$ 2	-
$t_{inact}$ (-80 mV) (s)	1,5 $\pm$ 0,6	3,3 $\pm$ 2,5	1,7 $\pm$ 0,5
$t_{inact}$ (-60 mV) (s)	1,8 $\pm$ 0,8	<u>3,8<math>\pm</math>2,9</u>	1,8 $\pm$ 0,6
$t_{inact}$ (-40 mV) (s)	2,1 $\pm$ 1	<u>5<math>\pm</math>4,6</u>	2,1 $\pm$ 0,9
$t_{inact}$ (-20 mV) (s)	2,4 $\pm$ 1,1	<u>5,5<math>\pm</math>4,7</u>	2,3 $\pm$ 1,2
$t_{inact}$ (0 mV) (s)	2,8 $\pm$ 1,7	<u>6<math>\pm</math>4,5</u>	2,6 $\pm$ 1,4
$t_{inact}$ (20 mV) (s)	3,3 $\pm$ 1,8	<u>6,9<math>\pm</math>4,3</u>	2,6 $\pm$ 1,4
$t_{inact}$ (40 mV) (s)	3,8 $\pm$ 2,7	<u>5,7<math>\pm</math>1,9</u>	3,9 $\pm$ 4,1
$t_{inact}$ (60 mV) (s)	-	2,8 $\pm$ 1,6	-

**P67 lentelė.** 150  $\mu\text{M}$  inozitolio heksakisfosfato ( $\text{IP}_6$ ) poveikis *Nitellopsis obtusa*  $I_K$  srovei, VC3 protokolas,  $n = 8$ . Pateikti verčių vidurkiai  $\pm$  SD. Pilku fonu išskirti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginus su Kontrolė-1 ( $p < 0,05$ ). Pabrauktos vertės, rodančios statistiškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp  $\text{IP}_3$  ir Kontrolės-2 grupių.

	Kontrolė-1	$\text{IP}_6$ , 150 $\mu\text{M}$	Kontrolė-2
$I_K$ (-120 mV) ( $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	-	-2,4 $\pm$ 2,3	-
$I_K$ (-100 mV) ( $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	-1,8 $\pm$ 1,7	-2,2 $\pm$ 2,3	-
$I_K$ (-80 mV) ( $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	-1,3 $\pm$ 1,4	-2,7 $\pm$ 3	-1,7 $\pm$ 1,5
$I_K$ (-60 mV) ( $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	-1,6 $\pm$ 1,6	<u>-3,8<math>\pm</math>3,9</u>	-1,4 $\pm$ 1,5
$I_K$ (-40 mV) ( $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	-1,8 $\pm$ 1,6	-3,4 $\pm$ 3,3	-1,4 $\pm$ 1,8
$I_K$ (-20 mV) ( $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	-1,8 $\pm$ 1,9	<u>-2,7<math>\pm</math>2,5</u>	-0,8 $\pm$ 2,3
$I_K$ (0 mV) ( $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	-1,1 $\pm$ 1,8	-1,9 $\pm$ 2,2	-0,9 $\pm$ 1,8
$I_K$ (20 mV) ( $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	-0,2 $\pm$ 1,7	-0,7 $\pm$ 2,1	-0,1 $\pm$ 1,8
$I_K$ (40 mV) ( $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	0 $\pm$ 1,3	0 $\pm$ 2,1	0,1 $\pm$ 1,6
$I_K$ (60 mV) ( $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	0,1 $\pm$ 1,3	0,1 $\pm$ 2,3	0,3 $\pm$ 1,1

<b>IP<sub>6</sub> 150 μM</b>				<b>v(7 min)</b>			
Anova, F(2,6) = 0,31, p=0,74				Anova, F(2,6) = 2,64, p=0,15			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	
Kontrolė-1		>0,999	0,972		0,441	0,441	0,612
IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM		0,622	>0,999
Kontrolė-2	0,972	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	
<b>v(-3 min)</b>				<b>v(8 min)</b>			
Anova, F(2,6) = 0,19, p=0,187				Anova, F(2,6) = 0,11, p=0,9			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	
Kontrolė-1		>0,999	>0,999		>0,999	>0,999	
IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		0,36	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999	>0,999	
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	
<b>v(-2 min)</b>				<b>v(9 min)</b>			
Anova, F(2,6) = 0,001, p=0,999				Anova, F(2,6) = 0,73, p=0,522			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	
Kontrolė-1		>0,999	>0,999		>0,999	>0,999	
IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999	>0,999	
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	
<b>v(-1 min)</b>				<b>v(10 min)</b>			
Anova, F(2,6) = 5,72, p=0,041				Anova, F(2,6) = 8,54, p=0,018			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	
Kontrolė-1		>0,999	0,175		0,155	>0,999	
IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		0,312	IP <sub>6</sub> 150 μM	0,155		0,08
Kontrolė-2	0,175	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	0,08	
<b>v(0 min)</b>				<b>v(11 min)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 0,5, p=0,779$				Anova, F(2,6) = 0,18, p=0,838			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	
Kontrolė-1		0,75	>0,999		>0,999	>0,999	
IP <sub>6</sub> 150 μM	0,75		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999	>0,999	
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	
<b>v(1 min)</b>				<b>v(12 min)</b>			
Anova, F(2,6) = 1,02, p=0,415				Anova, F(2,6) = 0,14, p=0,868			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	
Kontrolė-1		>0,999	0,996		>0,999	>0,999	
IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999	>0,999	
Kontrolė-2	0,996	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	
<b>v(2 min)</b>				<b>v(13 min)</b>			
Anova, F(2,6) = 0,58, p=0,591				Anova, F(2,6) = 0,46, p=0,652			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	
Kontrolė-1		>0,999	>0,999		>0,999	>0,999	
IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999	>0,999	
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	
<b>v(3 min)</b>				<b>v(14 min)</b>			
Friedman test, $\chi^2(2) = 0,5, p=0,779$				Anova, F(2,6) = 0,19, p=0,829			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	
Kontrolė-1		>0,999	>0,999		>0,999	>0,999	
IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		>0,999	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999	>0,999	
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	
<b>v(4 min)</b>				<b>v(15 min)</b>			
Anova, F(2,6) = 0,42, p=0,674				Anova, F(2,6) = 0,95, p=0,44			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	
Kontrolė-1		>0,999	>0,999		>0,999	>0,999	
IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		0,927	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999	>0,999	
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	
<b>v(5 min)</b>				<b>v_max</b>			
Anova, F(2,6) = 0,62, p=0,568				Anova, F(2,6) = 0,07, p=0,929			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2	
Kontrolė-1		>0,999	>0,999		>0,999	>0,999	
IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		0,843	IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999	>0,999	
Kontrolė-2	>0,999	>0,999		Kontrolė-2	>0,999	>0,999	

<b>t</b>			
Anova, F(2,6) = 0,27, p=0,775			
	Kontrolė-1	IP <sub>6</sub> 150 μM	Kontrolė-2
Kontrolė-1		>0,999	>0,999
IP <sub>6</sub> 150 μM	>0,999		>0,999
Kontrolė-2	>0,999	>0,999	

**P23 pav.** 150 μM (n=4) inozitolio heksakisfosfato (IP<sub>6</sub>) poveikio *Nitellopsis obtusa* ciklozės greičio parametrams statistinė analizė.

## SUMMARY

### ABBREVIATIONS

AP – action potential

APW – Artificial pond water – control solution

DMSO – dimethyl sulfoxide, solvent

$E_{th}$  – action potential excitation threshold

HEPES – (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, buffer

IP<sub>3</sub> – inositol 1,4,5-trisphosphate

IP<sub>6</sub> – inositol hexakisphosphate

MP – membrane potential

NED-19 – Ca<sup>2+</sup> channel blocker

PLC – phospholipase C

RP – membrane resting potential

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethane, buffer

U73122 – inhibitor of phospholipase C



## 1. INTRODUCTION

To survive in a constantly changing environment, plants must perceive alterations in external conditions and respond by adapting to them (Conde *et al.*, 2011). For example, owing to changes in lighting, plants activate or inhibit their photosynthetic processes at various levels (Velez-Ramirez *et al.*, 2011). Certain external stimuli, such as injuries caused by herbivores, salinity stress, and desiccation, require a systemic response from the entire organism (Fromm, Lautner, 2007). Thus, it is imperative to transmit information from the locally affected locus to other parts of the plant body and initiate appropriate responses, including modulation of photosynthetic activity, respiration, gene expression, and stress hormone synthesis. (Sukhov *et al.*, 2019). Chemical signals are diffusion-limited and cannot ensure high velocity of signal transmission (Pyatygin, 2008). To combat this issue, plants employ electrical signals – propagating waves of transient membrane potential (MP) polarisation. (Sukhov *et al.*, 2019). If an external stimulus is harmful, a variation potential is generated, if not – a plant generates an action potential (AP) – a spike-like propagating wave of transient membrane depolarisation characterised by its constant shape (Vodeneev *et al.*, 2016).

Despite a long history of research on plant electrical signalling (Burdon-Sanderson, 1873), the generation mechanism of plant APs has not been completely deciphered at the molecular level. In contrast to animals, the depolarisation phase in plants is governed by the activity of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cl}^-$  channels, while repolarisation is ensured by  $\text{K}^+$  efflux (Beilby, 2007).

While some genes responsible for the production of ion channels governing plant electrical excitation are already known (Cuin *et al.*, 2018), the complete molecular mechanism of plant AP generation has been proposed only recently in Venus flytrap (Iosip *et al.*, 2020; Scherzer, Böhm, *et al.*, 2022; Hedrich, Kreuzer, 2023). However, APs generated by this peculiar plant are distinct by their physiological implications from those of other species, implying differences in the mechanism of electrogenesis. There is a particular lack of knowledge about the initiation phase: the initial depolarisation of the MP is caused by  $\text{Ca}^{2+}$  influx into the cytoplasm (Lunevsky *et al.*, 1983), however, the molecular identity of these  $\text{Ca}^{2+}$  channels is unknown (Kisnieriene *et al.*, 2022). In higher plants, this function is attributed to plant glutamate receptors (GLR) (Mousavi *et al.*, 2013; Salvador-Recatalà, 2016; Hedrich, Kreuzer, 2023). In contrast, the genome of Characean algae *Chara braunii* does not possess GLR genes, despite other algae of the same family showing prominent excitability and modulation by amino acids (Lapeikaitė *et al.*, 2019, 2020).

A mathematical Thiel-Beilby model was constructed to explain MP dynamics during the electrical excitation of Characean cells. The model is based on the paradigm of animal systems, where membrane depolarisation is initiated by  $\text{Ca}^{2+}$  channels which are activated by a second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) (Biskup *et al.*, 1999; Wacke, Thiel, 2001; Wacke *et al.*, 2003; Beilby, Al Khazaaly, 2016, 2017; Kisnieriene *et al.*, 2019). While the model replicates the empirical data well, some of the core experimental results justifying the involvement of  $\text{IP}_3$  have not been reproduced (Tazawa, Kikuyama, 2003). Moreover, none of the sequenced plant genomes possess homologues of the animal  $\text{IP}_3$  receptor genes (Krinke *et al.*, 2007; Edel, Kudla, 2015). It has been hypothesised that the true second messenger in plants is not  $\text{IP}_3$  but its fully phosphorylated form,  $\text{IP}_6$  (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2000, 2003; Munnik, Vermeer, 2010). However, it remains unknown whether this molecule is involved in plant electrical excitability.

The role of  $\text{Ca}^{2+}$  in plant electrogenesis is firmly established; however, the characteristics of Characean  $\text{Ca}^{2+}$  channels responsible for the initiation of AP generation are still scarcely documented, particularly their susceptibility to certain ion channel blockers, as well as the identity and role of potential activating second messengers such as  $\text{IP}_3$  or  $\text{IP}_6$ .

### 1.1. Aim and objectives

The aim of this study was to determine the role of  $\text{Ca}^{2+}$  transport systems in the electrophysiological responses of the Characean macroalga *Nitellopsis obtusa* by modulating the activity of these systems.

The objectives:

- to characterise the effect of  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers verapamil, tetrandrine, NED-19 and  $\text{La}^{3+}$  on the electrophysiological parameters of *Nitellopsis obtusa*;
- to describe the effect of potential second messengers inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) and inositol hexakisphosphate ( $\text{IP}_6$ ) on the initiation and generation of *Nitellopsis obtusa* action potentials.

## 1.2. Statements to be defended

- $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers verapamil and NED-19 depolarise *Nitellopsis obtusa* action potential excitation threshold, but also exhibit non-specific effects.
- Inositol hexakisphosphate ( $\text{IP}_6$ ) hyperpolarises *Nitellopsis obtusa* action potential excitation threshold.
- Inositol hexakisphosphate ( $\text{IP}_6$ ) better fits the role of the hypothetical second messenger in the mathematical Thiel-Beilby model of the Characean algae action potential generation than inositol 1,4,5- trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ).

## 2. METHODS

### 2.1. Characean macroalgae *Nitellopsis obtusa*

Mature *Nitellopsis obtusa* (N.A. Desvaux) J. Groves macroalgae were collected during autumn months from lake Stanka (Trakai district). Thalii of the macroalgae were kept in glass aquaria in controlled conditions (temperature  $21 \pm 1$  °C, illumination with  $9,5 \pm 0,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intensity white light, 12 / 12 h photoperiod).

Before the experiments, internodal cells were mechanically cut from a thallus without damaging the nodes and kept overnight in the control APW solution under white light (illumination intensity  $9,5 \pm 0,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

### 2.2. Solutions

Artificial pond water (APW) was used as the control solution. It consisted of 0,1 mM KCl, 1 mM NaCl, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,2 was ensured with the buffer system consisting of 3 mM HEPES and 1,5 mM TRIS.

Substances of interest and their concentrations:

- potential Ca<sup>2+</sup> channel blockers:
  - verapamil (0,1 mM, 0,3 mM, 1 mM);
  - tetrandrine (0,1 mM and 0,2 mM), dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (0,75 % and 1,5 %, respectively);
  - NED-19 (50 μM and 75 μM), dissolved in DMSO (0,09 % and 0,13 %, respectively);
  - LaCl<sub>3</sub> (0,5 mM);
- potential Ca<sup>2+</sup> channel activators:
  - D-*myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) trisodium salt (75 μM and 150 μM);
  - D-*myo*-inositol hexakisphosphate (IP<sub>6</sub>) dodecasodium salt (75 μM and 150 μM);
- phospholipase C (PLC) inhibitor U73122 (25 μM), dissolved in 1 % DMSO.

The substances were dissolved in the control solution APW.

When investigating the effect of LaCl<sub>3</sub>, the additional Cl<sup>-</sup> in the solution (0,5 mM LaCl<sub>3</sub> results in additional 1,5 mM Cl<sup>-</sup> ions) was not taken into account since it should not affect the selected electrophysiological parameters (including the action potential excitation threshold) considerably (Katsuhara, Tazawa, 1986; Lapeikaitė *et al.*, 2020).

Na<sup>+</sup> ions in the vicinity of Characean algae affect their electrophysiological parameters (Winter *et al.*, 1999; Kisnieriene *et al.*, 2019). Since IP<sub>3</sub> and IP<sub>6</sub> sodium salts were used, the solutions were prepared by adjusting the final Na<sup>+</sup> concentration to be standard (1 mM). Cl<sup>-</sup> concentration was adjusted by adding HCl, while maintaining pH at 7.2. One exception was the preparation of the 150 μM IP<sub>6</sub> solution, since dissolving its sodium salt results in a 1,8 mM Na<sup>+</sup> concentration in the solution. In this case, a modified control solution was employed, in which Na<sup>+</sup> concentration was 1,8 mM, while other ion concentrations as well as pH were kept standard. No differences were observed between the selected electrophysiological parameters in the modified and standard control solutions.

The substances were purchased from Sigma Aldrich.

### 2.3. Electrophysiological investigation of the internodal cells

Electrophysiological investigation of the single internodal *Nitellopsis obtusa* cells was carried out according to the literature (Lapeikaitė *et al.*, 2019, 2020) employing two-electrode current clamp / voltage clamp modes.

An internodal cell was immobilised in the plexiglass recording chamber and filled with the control solution. The electrical stimulation was ensured via a separate pair of external Ag/AgCl electrodes. The electrodes also were used to clamp the voltage in the central part of the recording chamber, which was isolated with vaseline.

Micropipettes were made from borosilicate glass capillaries (WPI, Sarasota, FL, USA) using a puller „P-1000“ (Sutter Instrument, Co., Novato, CA, USA). The micropipettes were filled with a 3 M KCl solution. A microelectrode using a micromanipulator „PatchMan“ (Eppendorf) was inserted into the vacuole of the cell in the central part of the recording chamber. The reference electrode, filled with 1 % agar in a 3 M KCl solution, was placed in the vicinity of the cell. The signal was amplified by „TEC-10CX“ amplifier and digitized by ADC „Digidata 1440A“, controlled by PC with „pCLAMP 10.2“ software (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The isolated central cell region (5 mm in length) was constantly perfused with a perfusion pump (~1 ml/min; Scientifica PPS).

1,5 h after the cell impalement, the current clamp mode was employed to carry out the **CC protocol** and evaluate the dynamics of the MP. 1 kHz discretization frequency was used to electrically excite the internodal cell twice in 5 min interval by passing a ramp current (0,02 μA/s) via the external

electrodes. The stimulation was ceased once the AP excitation threshold was reached. The parameters investigated were as follows:

- membrane resting potential  $RP$  (mV): evaluated before each stimulated AP;
- membrane conductance at rest  $G_{RP}$  (S/m<sup>2</sup>): the cell was stimulated by a short rectangular hyperpolarising current stimulus (2 s, 50 nA),  $G_{RP}$  was calculated according to the Ohm's law;
- AP excitation threshold  $E_{th}$  (mV) was evaluated as the MP value, when the depolarisation velocity exceeded 60 mV/s (Lapeikaitė *et al.*, 2020);
- AP peak (mV);
- AP amplitude (mV) was calculated as the difference between the AP peak and the AP excitation threshold;
- AP depolarisation duration  $t_{dep}$  (s) was evaluated as a time period required for the MP to depolarise from the AP excitation threshold to the AP peak value;
- AP repolarisation duration  $t_{rep}$  (s) was evaluated as a time period required for the MP to repolarise 90 mV from the AP peak.

When the investigation employing the current clamp mode was completed, the experiments were continued using the voltage clamp mode: the MP was clamped at -180 mV (unless stated otherwise) and depending on the objectives, one or several protocols (described below) were initiated.

**VC1 protocol** is suitable for determining the membrane conductance in the desired range of MP values (Tsutsui *et al.*, 1987a; Tsutsui, Ohkawa, 1993). Using 1 kHz discretisation frequency, the MP was ramped from -300 mV to 150 mV at a velocity of 3 mV/s. The MP was modulated by short rectangular impulses (50 ms, 10 mV), which allowed the determination of the membrane conductance according to the Ohm's law in all the investigated MP range. Statistical analysis was employed to evaluate three parameters – maximal membrane conductance during excitation  $G_{max}$  (S/m<sup>2</sup>), as well as membrane conductance values at -250 mV ( $G_{-250\text{ mV}}$ ) and at 50 mV ( $G_{50\text{ mV}}$ ).

**VC2 protocol** was used to evaluate Cl<sup>-</sup> and Ca<sup>2+</sup> current dynamics during excitation when MP was clamped at the resting potential (Zherelova *et al.*, 2009). Using 10 kHz discretisation frequency, the cell MP was initially clamped at the resting potential. The cell was then excited employing a

400 ms duration rectangular impulse by clamping the MP at 50 mV and subsequently re-clamping it at the resting MP (Zherelova *et al.*, 2009). For the statistical analysis, several parameters were chosen: the amplitude of the excitation transient  $I_{trans}$  ( $\mu\text{A}/\text{m}^2$ ) and its activation and inactivation durations,  $t_{act\_trans}$  (s) and  $t_{inact\_trans}$  (s), respectively.  $t_{act\_trans}$  (s) was evaluated as a time period between the initiation of the stimulation until the maximal value of the excitation current was reached;  $t_{inact\_trans}$  (s) was evaluated as a time period required for the current to decrease by 63 % from its maximal value.

**VC3 protocol** was employed to evaluate the dynamics of the excitation transient, while the MP was clamped at selected values. Using 100 Hz discretisation frequency, the MP was clamped at -180 mV. In 3 min intervals, the MP was clamped at selected MP values from -120 mV to 60 mV in 20 mV steps using rectangular 15 s duration impulses. Subsequently, I/V curves of the excitation transient components were constructed. The parameters investigated were as follows:

- non-selective leak current  $I_{leak}$ , ( $\mu\text{A}/\text{m}^2$ ), observed several tens of milliseconds after the stimulation start (Lunevsky *et al.*, 1983);
- inward  $\text{Ca}^{2+}$  current  $I_{Ca}$  ( $\mu\text{A}/\text{m}^2$ ), observed several hundreds of milliseconds after the stimulation start; it activates the  $\text{Cl}^-$  current.
- inward  $\text{Cl}^-$  current  $I_{Cl}$  ( $\mu\text{A}/\text{m}^2$ ): activated by the  $I_{Ca}$  current;
- $I_{Cl}$  activation duration  $t_{act}$  (s) which corresponds to the VC2 protocol parameter  $t_{act\_trans}$ .
- $I_{Cl}$  inactivation duration  $t_{inact}$  (s) which corresponds to the VC2 protocol parameter  $t_{inact\_trans}$ .
- total  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cl}^-$  current  $I_{CaCl}$  ( $\mu\text{A}/\text{m}^2$ );
- $I_K$  current ( $\mu\text{A}/\text{m}^2$ ), evaluated before the end of the stimulus impulse (Lunevsky *et al.*, 1983; Kourie, 1994).

After the CC protocol in the current clamp mode and one or several protocols in the voltage clamp mode (VC1, VC2, VC3) were carried out, the central cell region was incubated in a solution containing the desired substance for 30 min, ensuring constant perfusion. The same protocols were then followed.

During the experiments with higher DMSO concentrations ( $\geq 0,75$  %), at first, the cell was incubated in DMSO solution for 30 min, and the protocol

set was carried out (double control). Only then the cell was incubated in a solution containing the desired substance dissolved in DMSO.

After the protocol set investigating the effect of  $IP_3$  and  $IP_6$  was employed, the cell was incubated in the control solution for 30 min, and the protocol set was repeated.

#### 2.4. Internodal cell viability assay

Cell viability was determined according to the turgor pressure – a cell was considered dead if it was no longer turgid.

During the investigation, the cells in groups of 15 were placed in the control solution as well as in verapamil solutions of 0,1 mM, 0,3 mM and 1 mM in the recording chamber. The cell turgidity was mechanically determined every 30 min. Each experiment was repeated four times. The temporal dynamics of the viable cell percentage were approximated using the Boltzmann function to determine the parameter  $t_{1/2}$  (min) which signifies the time period after which half of the cells die.

#### 2.5. Statistical analysis

Data were analysed using software pClamp 10.2 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA), MicroCal OriginPro 2018 (OriginLab, Northampton, MA, USA), and programming language R (library *rstatix* 0.7.2). The sample sizes are presented in **Table 2.1**.  $n$  denotes the number of investigated internodal cells.



**Table 2.1.** Sample sizes.  $n$  denotes the number of investigated internodal cells.

Substance and concentration	Protocols			
	CC protocol	VC1 protocol	VC2 protocol	VC3 protocol
Verapamil, 0,1 mM	4			5
Verapamil, 0,3 mM	10			10
Verapamil, 1 mM	6			4
Tetrandrine, 0,1 mM	5			5
Tetrandrine, 0,2 mM	10			10
NED-19, 50 $\mu$ M	7			8
NED-19, 75 $\mu$ M	8			8
LaCl <sub>3</sub> , 0,5 mM	5	6	6	
IP <sub>3</sub> , 75 $\mu$ M	6	8	8	
IP <sub>3</sub> , 150 $\mu$ M	4	4	4	
IP <sub>6</sub> , 75 $\mu$ M	9			8
IP <sub>6</sub> , 150 $\mu$ M	8	4	3	8
U73122, 25 $\mu$ M	4	4	4	

During the internodal cell viability assay, each group (control; 0,1, mM, 0,3 mM, 1 mM verapamil concentrations) consisted of 15 cells.

Specific statistical tests were used to determine the statistical significance of the differences between the groups.

Each experiment (excluding the viability assay) was carried out by determining selected parameters under control conditions, and then the same cell was exposed to a desired substance; thus, paired tests were selected. Data analysis of the effect of tetrandrine, IP<sub>3</sub>, IP<sub>6</sub> and U73122 employed repeated-measures ANOVA and the *post-hoc* Bonferroni test. Alternatively,

Friedman test and the *post-hoc* Bonferroni test were used, as determined by the distributions of the data (Shapiro-Wilk test). The analysis of the effect of other substances required Student paired t-test or paired Wilcoxon test, according to the data distributions (Shapiro-Wilk test).

Data from the cell viability test were analysed using Student two sample t-test (dispersion was evaluated using Student t-test for dispersion), or Wilcoxon test for independent samples, according to the data distributions (Shapiro-Wilk test).

In all cases, the differences were considered significant at  $p < 0,05$ . The data are represented as means  $\pm$  SD.

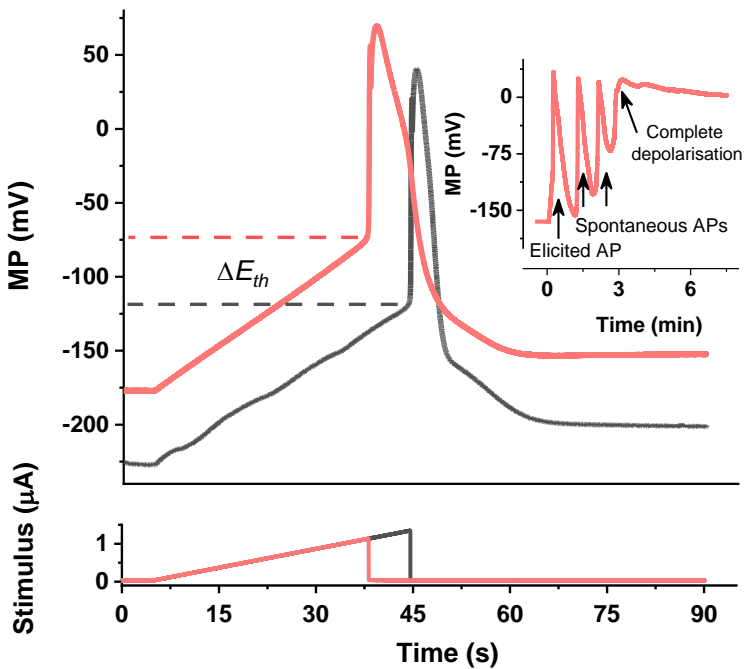
### 3. RESULTS

#### 3.1. Investigation of the effect of Ca<sup>2+</sup> channel blockers

Four Ca<sup>2+</sup> channel blockers – verapamil, tetrandrine, NED-19 and La<sup>3+</sup> – were selected to investigate the role of Ca<sup>2+</sup> channels in the electrical excitability of *Nitellopsis obtusa*.

##### 3.1.1. Investigation of the effect of verapamil

Internodal cells of *Nitellopsis obtusa* were incubated for 30 min in either 0,1 mM, 0,3 mM, or 1 mM verapamil solution.



**Fig. 3.1.** A representative example of the effect of 0,3 mM verapamil on the electrically-elicited APs of *Nitellopsis obtusa*. The inset shows a typical case of the temporal MP alterations when after an electrically-elicited AP the cell generated several spontaneous APs before complete and irreversible MP depolarisation.

The application of the CC protocol in the current clamp mode did not reveal any electrophysiological effects caused by 0,1 mM verapamil. Nonetheless, higher concentrations were effective in modulating the selected parameters (**Fig. 3.1**). 0,3 mM verapamil depolarised membrane resting potential RP by 40 mV, while 1 mM concentration – by 100 mV. 0,3 mM

verapamil depolarised the AP excitation threshold  $E_{th}$  by 10 mV, but the effect of the larger concentration (depolarisation by 20 mV) was not significant owing to the variability of the parameter values and small sample size. Despite the effect on the AP excitation value, verapamil did not alter the AP amplitude, regardless of the concentration applied. Verapamil prolonged APs by lengthening both their depolarisation and repolarisation durations. 0,3 mM concentration prolonged the AP depolarisation duration by 30 %, whereas 1 mM concentration caused a twofold prolongation. Similarly, 0,3 mM concentration prolonged the AP repolarisation duration by almost twofold, while 1 mM concentration caused more than a tenfold prolongation. No effect on the membrane conductance at rest was observed.

The effect of verapamil was investigated in the voltage clamp mode using the VC3 protocol. Regardless of the applied concentration, verapamil did not alter any of the amplitudes of the components of the excitation transient at any of the selected MP values. Although 0,3 mM verapamil decreased  $K^+$  current  $I_K$  values at several MP values, the results obtained after the cells were challenged with 1 mM verapamil did not confirm this trend.

Despite not having a significant effect on the amplitudes of the components of the excitation transient, verapamil altered its kinetics by prolonging both the current  $I_{Cl}$  activation duration  $t_{act}$  and the inactivation duration  $t_{inact}$ . 0,1 mM verapamil prolonged  $t_{act}$  values only at certain MP values (at -60 mV, -40 mV, and at 20 mV), while 0,1 mM concentration affected the parameter in the entire investigated MP range (from -100 mV to 60 mV) – the  $t_{act}$  duration was prolonged twofold. The highest used concentration of verapamil significantly prolonged the parameter at the MP values from -20 mV to 40 mV. At other voltages, significance was hindered by the variability of the parameter values and small sample size; however, at all MP values,  $t_{act}$  on average was prolonged by at least 2,5-fold.

Similarly, verapamil prolonged the  $I_{Cl}$  current inactivation values  $t_{inact}$ . The effect of 0,1 mM verapamil was significant at a MP range from -80 mV to 20 mV, while 0,3 mM verapamil prolonged the parameter values in the entire investigated MP range (from -100 mV to 60 mV) – in this case, the  $t_{inact}$  values were prolonged 3,5-fold. Owing to the slowed dynamics of the excitation transients, the employed VC3 protocol was not suitable for adequate evaluation of the  $t_{inact}$  (as well as  $I_K$ ) values, when the *Nitellopsis obtusa* cells were exposed to 1 mM verapamil solution. The selected stimulus duration was too short to allow the excitation transient to reach its steady-state value. Preliminary observations suggest that the effect of the 1 mM verapamil is qualitatively similar to the effect of its lower concentrations.

It must be stressed that verapamil not only affected the parameters of the electrical signalling but was also toxic to *Nitellopsis obtusa* cells. The membrane potential of the majority of the cells (10 out of 12), affected by the 0,3 mM verapamil solution, completely and irreversibly depolarised after several hours of exposure. To quantify this cytotoxic effect, a cell viability assay was performed. All *Nitellopsis obtusa* cells, placed in the control solution, survived during the observation period of 5 hours. All the cells incubated in verapamil solutions died, but the effect depended on the verapamil concentration. On average, half of the internodal cells, exposed to 0,1 verapamil, died after  $2,57 \pm 0,63$  h, exposition to 0,3 mM verapamil was half-lethal after  $1,57 \pm 0,2$  h, and exposition to 1 mM verapamil was half-lethal after 0,25 h.

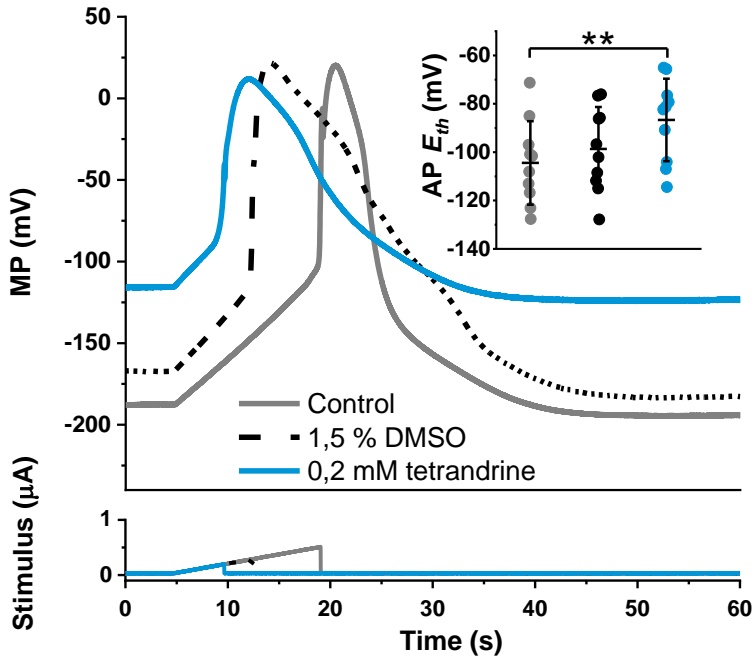
In summary, 0,1 mM verapamil affected only certain parameters, 0,3 mM concentration was effective, and after cell exposition to 1 mM concentration, cytotoxic effects were more apparent than electrophysiological alterations of the selected parameters. Verapamil depolarises the AP excitation threshold but does not affect its amplitude. The amplitudes of the components of the excitation transient are not altered, but the kinetics of the  $I_{Cl}$  current are prolonged together with the temporal characteristics of APs.

### 3.1.2. Investigation of the effect of tetrandrine

Internodal cells of *Nitellopsis obtusa* were incubated for 30 min in either 0,1 mM tetrandrine (dissolved in 0,75 % DMSO), or 0,2 mM tetrandrine (dissolved in 1,5 % DMSO) solutions. As tetrandrine is a hydrophobic substance, it was dissolved in a solvent DMSO.

Although the initial analysis of the current clamp data (CC protocol) pointed to tetrandrine affecting the parameters of *Nitellopsis obtusa* electrical signalling, further examination revealed that these effects were caused by DMSO. For instance, even when compared to the control, 0,1 mM tetrandrine depolarised the membrane resting potential by 30 mV, the effect was caused by 0,75 % DMSO, which, compared to the control, depolarised the membrane resting potential by more than 30 mV.

While the initial analysis indicated that 0,2 mM tetrandrine solution affected all of the selected parameters determined by the CC protocol, the parameter values did not differ from the values acquired after cells were incubated in 1,5 % DMSO (**Fig. 3.2**).



**Fig. 3.2.** A representative example of the effect of 0,2 mM tetrandrine and its solvent 1,5 % DMSO on the electrically-elicited APs of *Nitellopsis obtusa*. The inset shows AP excitation threshold  $E_{th}$  values under different conditions. Asterisks indicate a statistically significant difference ( $p < 0,05$ ).  $n=10$ .

Compared to the control, the AP amplitude was reduced by 25 mV in the presence of 1,5 % DMSO. Exposure to 0,2 mM tetrandrine decreased the AP amplitude even further by 15 mV, but the effect between the substances was not different. AP depolarisation and repolarisation durations were increased by 1,5 % DMSO treatment. The same pattern was observed after cell incubation in 0,2 mM tetrandrine solution, although there was no difference between this effect and the one caused by 1,5 % DMSO.

Investigation of the alterations in the parameters of the excitation transients employing the voltage clamp mode (VC3 protocol) did not reveal any consistent effect of either 0,1 mM tetrandrine, or 0,75 % DMSO solutions at any of the selected MP values.

All the effects on the excitation transients induced by cell exposure to 0,2 mM tetrandrine solution can be attributed to the effect of 1,5 % DMSO. DMSO increased the amplitudes of the  $K^+$  current  $I_K$  at 20 mV and at 40 mV, but tetrandrine had no effect. A similar trend was observed when the leak current  $I_{leak}$  values were analysed.

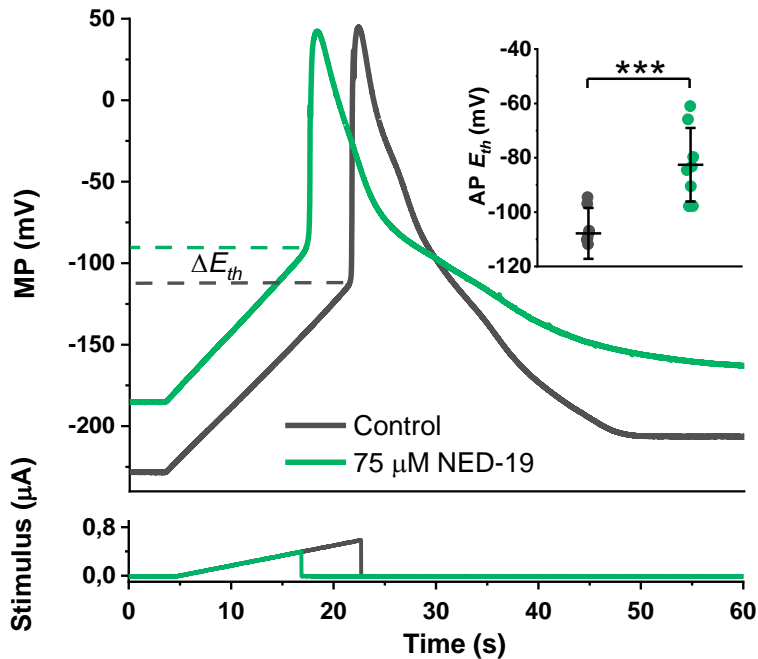
A more robust effect, which was significant at a wider MP range, was observed for  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cl}^-$  current amplitudes as well as on the  $\text{Cl}^-$  current temporal characteristics. 1,5 % DMSO induced reversal potential of the  $\text{Ca}^{2+}$  current  $I_{\text{Ca}}$ ,  $\text{Cl}^-$  current  $I_{\text{Cl}}$  as well as their resultant current  $I_{\text{CaCl}}$  shifts to the negative MP direction. However, this effect did not differ between tetrandrine and DMSO. Similarly, the activation durations of the  $I_{\text{Cl}}$  current  $t_{\text{act}}$  were prolonged by DMSO, but tetrandrine was no more effective than DMSO. Cell exposure to 1,5 % DMSO but not 0,2 mM tetrandrine increased  $I_{\text{Cl}}$  current inactivation durations  $t_{\text{inact}}$  in an MP range from -80 mV to -20 mV.

In summary, the results do not support tetrandrine as a substance altering the electrophysiological parameters of *Nitellopsis obtusa*: all the observed effects were induced by cell exposure to DMSO. 1,5 % DMSO decreases the AP amplitude, prolongs AP depolarisation and repolarisation durations, as well as the activation and inactivation durations of the excitation transients. In addition, DMSO increases the  $\text{K}^+$  component of the excitation transients and shifts the reversal potential of the  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cl}^-$  currents in the negative direction.

### 3.1.3. Investigation of the effect of NED-19

Internodal cells of *Nitellopsis obtusa* were incubated for 30 min in either 50  $\mu\text{M}$ , or 75  $\mu\text{M}$  NED-19 solutions. Before dissolving NED-19 in the control solution, it was dissolved in DMSO. Since DMSO concentrations used were low (<0,15 %), the effect of DMSO on the electrophysiological parameters was not considered.

Experiments employing the current clamp mode (CC protocol) did not reveal any effect of 50  $\mu\text{M}$  NED-19 on the selected electrophysiological parameters, however, 75  $\mu\text{M}$  NED-19 was sufficient (**Fig. 3.3**). Cell incubation for 30 min in 75  $\mu\text{M}$  NED-19 solution depolarised the membrane resting potential by more than 30 mV without affecting the membrane conductance at rest. This concentration of NED-19 also depolarised the AP excitation threshold by 25 mV, which also decreased the AP amplitude. The AP depolarization duration was not affected, but the repolarization duration was prolonged by one third.



**Fig. 3.3.** A representative example of the effect of 75  $\mu\text{M}$  NED-19 on the electrically-elicited APs of *Nitellopsis obtusa*. Insert shows AP excitation threshold  $E_{th}$  values under different conditions. Asterisks indicate a statistically significant difference ( $p < 0,05$ ).  $n=8$ .

The effect of NED-19 in the voltage clamp mode was investigated by employing the VC3 protocol. No consistent effect was observed on the amplitudes of the excitation transient components. While 50  $\mu\text{M}$  NED-19 decreased the leakage current  $I_{leak}$  amplitudes in the MP range from 20 mV to 60 mV, the effect was absent when the cells were incubated in the higher concentration of NED-19.

While 50  $\mu\text{M}$  NED-19 concentration was not potent enough to affect the temporal dynamics of the excitation transient, 75  $\mu\text{M}$  NED-19 increased both the  $I_{Cl}$  current activation duration (MP range from -60 to 40 mV) and its inactivation duration (MP range from -80 mV to 20 mV) by 30 % for both parameters.

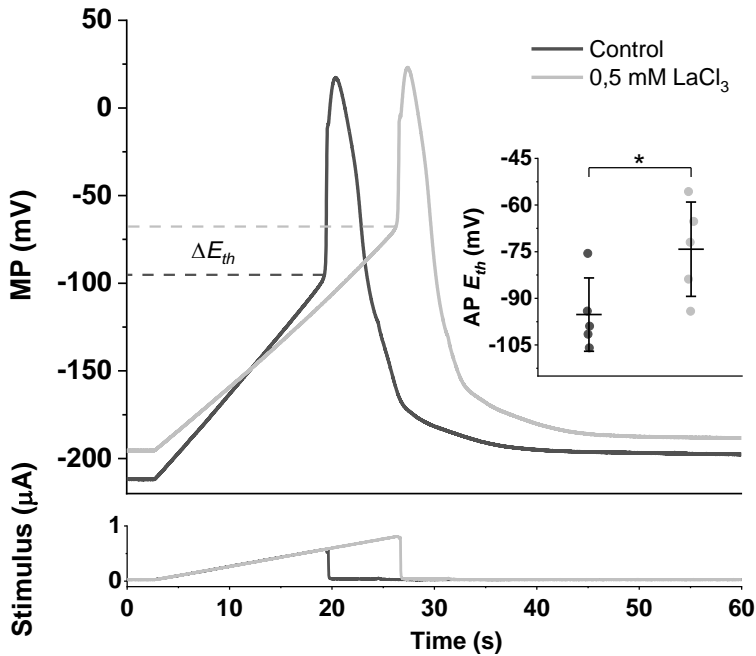
In summary, 50  $\mu\text{M}$  NED-19 concentration was not effective in altering the electrophysiological parameters of *Nitellopsis obtusa*. In contrast, 75  $\mu\text{M}$  NED-19 depolarised the membrane resting potential and AP excitation threshold, thus decreasing AP amplitude. NED-19 also prolonged the temporal characteristics of both APs and excitation transients.



### 3.1.4. Investigation of the effect of lanthanum

Internodal cells of *Nitellopsis obtusa* were incubated for 30 min in 0,5 mM  $\text{LaCl}_3$  solution to examine the effects of this classical  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker on the selected electrophysiological parameters.

$\text{La}^{3+}$  decreased the maximal membrane conductance during excitation  $G_{max}$  as well as the AP amplitude (Fig. 3.4). The AP peak value was not affected; however, the AP excitation threshold was depolarised by 20 mV. None of the other selected parameters, including the membrane resting potential, were altered.



**Fig. 3.4.** A representative example of the effect of 0,5 mM  $\text{LaCl}_3$  on the electrically-elicited APs of *Nitellopsis obtusa*. Insert shows AP excitation threshold  $E_{th}$  values under different conditions. Asterisk indicates a statistically significant difference ( $p < 0,05$ ).  $n = 5$ .

### 3.2. Investigation of the effect of inositol phosphates

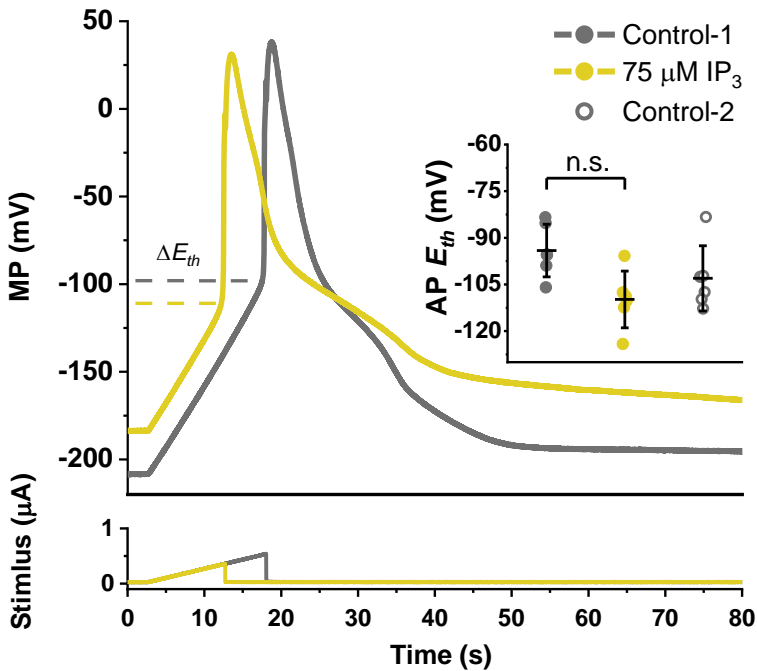
To investigate whether inositol phosphates are involved in *Nitellopsis obtusa* electrical signalling, the cells were challenged with inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) and inositol hexakisphosphate ( $\text{IP}_6$ ). In addition, U73122 - a blocker of phospholipase C (PLC) which synthesises  $\text{IP}_3$  - was applied. To examine whether an inositol phosphate can fulfil the second

messenger function, cells affected by the substances were re-incubated in the control solution.

### 3.2.1. Investigation of the effect of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)

Internodal cells of *Nitellopsis obtusa* were incubated for 30 min in either 75 μM or 150 μM inositol 1,4,5-phosphate (IP<sub>3</sub>) solutions as well as in 25 μM U73122 (dissolved in 1 % DMSO) solution to examine their effects on the electrophysiological parameters.

Neither of the selected concentrations of IP<sub>3</sub> affected any of the selected electrophysiological parameters (**Fig. 3.5**). However, some of the internodal cells displayed a slightly hyperpolarised AP excitation threshold after incubation with IP<sub>3</sub>, although this effect was not significant. Under control conditions, *Nitellopsis obtusa* internodal cells virtually never generate spontaneous AP trains. After incubation in IP<sub>3</sub>, 1 cell out of 9 (75 μM IP<sub>3</sub> concentration) and 1 cell out of 4 (75 μM IP<sub>3</sub> concentration) generated a train of spontaneous APs.



**Fig. 3.5.** A representative example of the effect of 75 μM inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) on the electrically-elicited APs of *Nitellopsis obtusa*. Insert shows AP excitation threshold  $E_{th}$  values under different conditions. n=6.

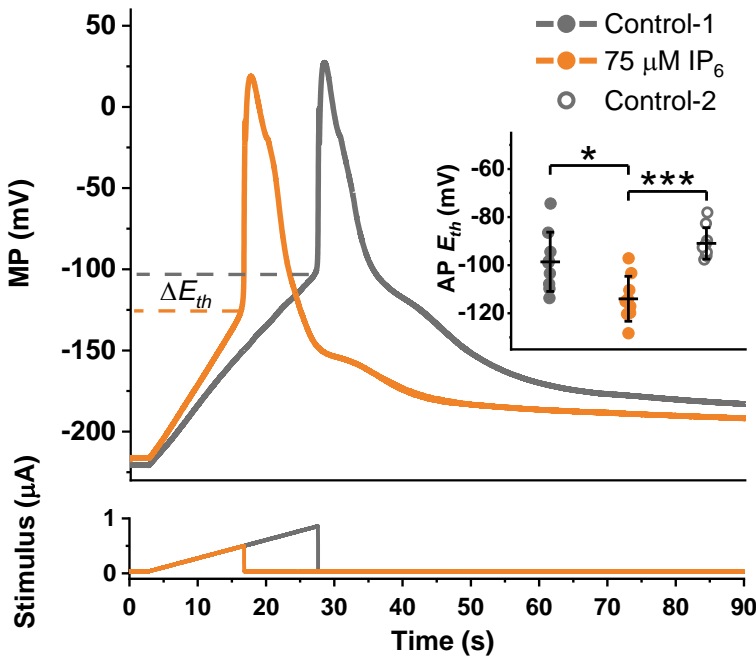
While U73122 seemingly depolarised the membrane resting potential by 30 mV, the same effect was achieved by DMSO. An investigation employing the voltage clamp mode VC2 protocol revealed that 1 % DMSO diminished the excitation transient amplitude by 30 %.

In summary, despite some implications, IP<sub>3</sub> cannot be confirmed as a bioactive substance, which enhances *Nitellopsis obtusa* excitability.

### 3.2.2. Investigation of the effect of inositol hexakisphosphate (IP<sub>6</sub>)

Internodal cells of *Nitellopsis obtusa* were incubated for 30 min in either 75 μM, or 150 μM IP<sub>6</sub> solutions.

In contrast to the same concentrations of IP<sub>3</sub>, both 75 μM and 150 μM IP<sub>6</sub> solutions hyperpolarised the AP excitation threshold (Fig. 3.6). The effect depended on the concentration because the lower concentration induced a depolarisation by 15 mV, while the higher – by 40 mV. Regardless of the concentration, this effect was reversible.



**Fig. 3.6.** A representative example of the effect of 75 μM inositol hexakisphosphate (IP<sub>6</sub>) on the electrically-elicited APs of *Nitellopsis obtusa*. Insert shows AP excitation threshold  $E_{th}$  values in different conditions. Asterisks indicate a statistically significant difference ( $p < 0,05$ ).  $n = 9$ .

While the cells affected by 75  $\mu\text{M}$   $\text{IP}_6$  exhibited a trend of AP peak reduction by 10 mV, 150  $\mu\text{M}$   $\text{IP}_6$  decreased the parameter by 20 mV. Regardless of the concentration, AP amplitudes and the maximal membrane conductance during excitation were not altered. While the cell incubation in the lower  $\text{IP}_6$  concentration did not affect the AP repolarisation duration, the higher concentration reversibly prolonged this parameter twofold.

Further investigations in voltage clamp mode VC3 protocol revealed that  $\text{IP}_6$  does not affect the amplitudes of the leak current  $I_{leak}$  and  $\text{K}^+$  current  $I_K$ . While 75  $\mu\text{M}$   $\text{IP}_6$  was not effective, 150  $\mu\text{M}$   $\text{IP}_6$  solution shifted the  $\text{Ca}^{2+}$  current  $I_{Ca}$  reversal potential in the negative direction. Although  $\text{IP}_6$  also affected the  $\text{Cl}^-$  current  $I_{Cl}$  and the combined  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cl}^-$  current  $I_{CaCl}$  current amplitudes at some MP values, this effect was not prominent.

$\text{IP}_6$  reversibly prolonged the temporal characteristics of the excitation transient. 75  $\mu\text{M}$   $\text{IP}_6$  increased the  $I_{Cl}$  current activation duration  $t_{act}$  only at certain MP values, the higher concentration was effective in a range from -80 mV to 0 mV. Similarly, cell incubation in 150  $\mu\text{M}$   $\text{IP}_6$  solution prolonged the inactivation duration  $t_{inact}$  in a range of MP values from -60 mV to 40 mV.

## 4. DISCUSSION

Ca<sup>2+</sup> ions are vital for a number of plant physiological processes, including the generation of electrical signals which transmit information to distal parts of the plant body (White, 2000). Investigations of the electrical signalling of Characean algae have revealed that the first component of the inward excitation transient represents Ca<sup>2+</sup> current (Beilby, Coster, 1979; Lunevsky *et al.*, 1983; Shiina, Tazawa, 1987; Zherelova, 1989b).

However, electrophysiological research on plant Ca<sup>2+</sup> channels is complicated by the necessity to distinguish Ca<sup>2+</sup> current from the Cl<sup>-</sup> current which flows in the same direction (Beilby, Coster, 1979; Lunevsky *et al.*, 1983). Investigations via the patch clamp technique have revealed several ion channel populations, however, Ca<sup>2+</sup> channels have not been unequivocally distinguished. (Katsuhara *et al.*, 1991; Laver, Walker, 1991; Homann, Thiel, 1994; Berecki *et al.*, 1999). The genome of the Characean *Chara braunii* has been sequenced relatively recently, thus, research is no longer limited by the inability to utilise comparative genomic data and employ genomic editing techniques (Nishiyama *et al.*, 2018; Beilby, 2019).

Since structural data of the Characean Ca<sup>2+</sup> channels are not available yet, functional techniques must be employed to characterise the role of these channels in the generation of plant electrical signals.

### 4.1. The effect of Ca<sup>2+</sup> channel blockers on the *Nitellopsis obtusa* cells

One of the strategies for ion channel characterisation is the utilisation of ion channel blockers. Characean Ca<sup>2+</sup> channels are blocked by metal ions such as Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> (Lunevsky *et al.*, 1983), however, side-effects on other ion transport systems can also be observed. (Kisnierienė *et al.*, 2016). Organic Ca<sup>2+</sup> channel blockers, such as nifedipine, may exert a similar electrophysiological effect. However, some substances that target specific ion channels in animals, may display both specific and non-specific effects on plant systems (Tester, MacRobbie, 1990; Zherelova *et al.*, 1994). Thus, the identification of specific plant Ca<sup>2+</sup> channel blockers would allow a more in-depth description of these channels, while offering means to explore the effect of Ca<sup>2+</sup> currents on a variety of physiological processes.

In this study, four Ca<sup>2+</sup> channel blockers were employed: verapamil, tetrandrine, NED-19, and La<sup>3+</sup>.

Verapamil, NED-19 and  $\text{La}^{3+}$  after 30 min incubation depolarised *Nitellopsis obtusa* AP excitation threshold  $E_{th}$ . Since during the AP generation,  $\text{Ca}^{2+}$  channels are activated first (Lunevsky *et al.*, 1983); also,  $\text{Ca}^{2+}$  channel activators hyperpolarise the  $E_{th}$  (Lapeikaitė *et al.*, 2019, 2020), this parameter can be seen as an indicator of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity.

The AP depolarisation phase is linked to the activity of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cl}^-$  channels, thus, when  $\text{Ca}^{2+}$  channels are partially blocked, the increase in the AP depolarisation duration  $t_{dep}$  as well as in the excitation transient activation duration  $t_{act}$  is expected because more time is needed to depolarise the membrane (Tsutsui *et al.*, 1987b).

The depolarisation of the membrane resting potential by  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers (verapamil, NED-19) can be explained by their action on  $\text{H}^+$ -ATPases. This effect, observed also in *Chara corallina*, has been linked to a decrease in the membrane conductance at rest (Tsutsui *et al.*, 1987b). In this dissertation, the used blockers had no effect on the membrane conductance at rest, however, such a trend was noted.

The increase in the AP repolarisation duration  $t_{rep}$  as well as in the  $I_{Cl}$  current inactivation duration can be linked to the inhibition of the  $\text{K}_{out}$  channels (Kourie, 1994). In addition, since  $\text{H}^+$ -ATPases are also responsible for the repolarisation phase, their inhibition observed as the depolarisation of the membrane resting potential, should also be considered (Gyenes *et al.*, 1980; Tsutsui *et al.*, 1987b).  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases are structurally similar to  $\text{H}^+$ -ATPases (García Bossi *et al.*, 2020), thus, the blockers may inhibit them as well: when  $\text{Ca}^{2+}$  pumping from the cytoplasm is hindered,  $\text{Cl}^-$  channels may remain activated for longer periods, thus obstructing the repolarization.

Verapamil diminishes the amplitudes of electrical signals in various plant species (Krol *et al.*, 2004; Koselski *et al.*, 2021). While in this research AP amplitudes were decreased by NED-19 and  $\text{La}^{3+}$ , verapamil displayed no such effect; also,  $I_{Cl}$  amplitudes during excitation were not affected. Since the blockers also prolonged the AP repolarization durations,  $\text{K}^+$  channels may also have been blocked. In *Chara inflata*, once  $\text{K}^+$  channels are blocked by a blocker tetraethylammonium (TEA), current transient amplitudes increase severalfold (Kourie, 1994). Thus, if both depolarising and repolarising currents are inhibited the overall observed current amplitude may remain unchanged.

Because verapamil and NED-19 affected not only  $\text{Ca}^{2+}$  channels but also other ion transport systems, they cannot be considered specific for *Nitellopsis obtusa* model system. The non-specificity of verapamil was confirmed by the viability test: the internodal cells lost their turgidity after incubation in even low concentrations (0,1 mM) of this substance.

Comparing the effects of the employed blockers, a similar inhibitory effect was achieved by the lowest concentration of NED-19, which is a specific blocker of animal TPC channels. However, the effect pattern of this blocker was not dissimilar from that of verapamil. Surprisingly, although  $\text{La}^{3+}$  is not considered a specific  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker, it exerted no non-specific effects.  $\text{La}^{3+}$  alone did not affect either the membrane resting potential or the AP duration.

None of the effects initially prescribed for the action of tetrandrine were different from the effects of its solvent DMSO. In some cases, tetrandrine acted similarly to other  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers: for example, while DMSO diminished the AP amplitude, there was a trend of tetrandrine diminishing it more. Such trends were observed while analysing other parameters, including the membrane resting potential, AP excitation threshold, and AP repolarization duration.

#### 4.2. The effect of the solvent DMSO on the *Nitellopsis obtusa* cells

The solvent dimethylsulfoxide is used to dissolve bioactive hydrophobic substances in aqueous media (Galvao *et al.*, 2014). Low concentrations of DMSO are considered harmless (Bulychev, Rybina, 2018). However, it should be considered that DMSO may disrupt cellular membranes and act cytotoxically (Zhang *et al.*, 2016; Tunçer *et al.*, 2018). In animal model systems, DMSO is known to inhibit non-selective cation channels as well as  $\text{Cl}^-$  channels (Nakahiro *et al.*, 1992; Nardid *et al.*, 2013).

In this study, DMSO diminished the AP amplitude by lowering the AP peak, although this effect was not significant. AP peak value is linked with the  $\text{Cl}^-$  channel activity, thus, its inhibition may lead to increased AP depolarisation durations and  $I_{\text{Cl}}$  current activation durations. DMSO also affected  $I_{\text{K}}$  currents, which can be considered the cause of increased AP repolarization durations and  $I_{\text{Cl}}$  current inactivation durations. DMSO may have changed the internal ion concentrations, as can be deduced from the shifted reversal potential of the  $I_{\text{Ca}}$  current.

#### 4.2. The effect of inositol phosphates on the *Nitellopsis obtusa* cells

##### 4.3.1. The effect of inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ )

In plants,  $\text{IP}_3$  has been linked with the regulation of various physiological processes (Krinke *et al.*, 2007). Usually, it is hypothesised that a certain signal increases the intracellular  $\text{IP}_3$  concentration which activates specific

Ca<sup>2+</sup> channels. Thus, an increase in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration is enabled, allowing modification of the activity of various proteins, such as kinases or phosphatases (Gilroy *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). Despite a plethora of evidence of the action of IP<sub>3</sub>, plants do not possess homologues of the animal IP<sub>3</sub> receptor genes, thus raising questions about the whole signal transduction cascade (Krinke *et al.*, 2007).

Injection of IP<sub>3</sub> into the cytoplasm of Characean cells has been reported to electrically excite them by activating their Ca<sup>2+</sup> channels (Zherelova, 1989a; Biskup *et al.*, 1999). Based on these results, a mathematical Thiel-Beilby model describing the temporal MP alterations during the electrical excitation was developed (Biskup *et al.*, 1999; Wacke, Thiel, 2001; Wacke *et al.*, 2003; Beilby, Al Khazaaly, 2016, 2017; Kisinieriene *et al.*, 2019). The core of the model is the idea that Ca<sup>2+</sup> channels in the endoplasmic reticulum are activated by the increased cytoplasmic IP<sub>3</sub> concentration.

The model is capable of reproducing empirical data of cell excitation not only under control conditions but also after the cells are challenged by various stressors. Despite this, there is evidence contradicting the IP<sub>3</sub> involvement in the electrical excitation: injection of IP<sub>3</sub> in the cytoplasm of *Chara corallina* did not affect the velocity of the cytoplasmic streaming, which is known to depend on the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration (Tazawa, Kikuyama, 2003).

In the present study, *Nitellopsis obtusa* electrophysiological parameters were not affected by IP<sub>3</sub>. It should be noted that, while the effect was not significant, the AP excitation threshold was slightly hyperpolarised after incubating the cells in the IP<sub>3</sub> solution. Additionally, some cells exhibited spontaneous AP generation.

The inhibitor of the phospholipase C, U73122, should act similarly to the Ca<sup>2+</sup> channel blockers. If PLC is inhibited, it should be unable to synthesise IP<sub>3</sub>, which in turn should not be able to activate Ca<sup>2+</sup> channels. While one group of researchers demonstrated that PLC inhibitors U73122 and neomycin hinder cell excitation (Biskup *et al.*, 1999), there are reports showing no such effect (Tazawa, Kikuyama, 2003). The data reported in this dissertation cannot confirm the excitatory effect of U73122 on *Nitellopsis obtusa* cells.

In summary, while some results hint at the potential of IP<sub>3</sub> involvement in the Characean electrical excitability, its role in activating Ca<sup>2+</sup> channels cannot be unequivocally confirmed.



#### 4.3.2. The effect of inositol hexakisphosphate (IP<sub>6</sub>)

Several reports have stated that the fully phosphorylated inositol form inositol hexakisphosphate (IP<sub>6</sub>) exerts an electrophysiological effect in higher plants – it activates tonoplast ion channels and blocks K<sup>+</sup> channels in the plasma membrane. A similar effect is also caused by IP<sub>3</sub>, however, a lower concentration of IP<sub>6</sub> is required to achieve an effect of the same magnitude (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2000, 2003). It is hypothesised that in plants, it is not IP<sub>3</sub>, but IP<sub>6</sub> that is the second messenger responsible for inducing various physiological effects. It has been suggested that when IP<sub>3</sub> is artificially introduced into a plant cell, it is converted to IP<sub>6</sub> which initiates the observed responses (Munnik, Vermeer, 2010).

In the present study, *Nitellopsis obtusa* cells were incubated for 30 min in IP<sub>6</sub> solutions. APs of such cells exhibited hyperpolarised AP threshold values. Considering that Ca<sup>2+</sup> channel blockers induced depolarisation of the parameter, it is suggested that IP<sub>6</sub> activates Ca<sup>2+</sup> channels responsible for the electrical excitation.

150 µM IP<sub>6</sub> solution decreased the AP peak, but did not affect the AP amplitude. The maximal membrane conductance during excitation was also unaffected as well as the amplitude of the excitation transient amplitude  $I_{trans}$ . In addition, although the amplitudes of the  $I_{Ca}$  current were visibly decreased, the current amplitude at the excitation threshold did not change. These results suggest that IP<sub>6</sub> does not activate Ca<sup>2+</sup> channels by increasing Ca<sup>2+</sup> influx into the cytoplasm but shifts their voltage dependence. The channels are activated at more negative MP values, and deactivated at more negative MP values as well.

However, while no significant changes in the above-mentioned parameters connected with the amplitude of the Ca<sup>2+</sup> current were observed, these parameters tended to display increased values compared to the control. These observations can be explained by considering the activation of the Cl<sup>-</sup> current – even though the maximal Cl<sup>-</sup> current amplitude is not affected, the current is activated earlier, at more negative MP values which are farther from the Cl<sup>-</sup> reversal potential, thus, the electromotive force is increased.

IP<sub>6</sub> also prolonged the durations of the  $I_{Cl}$  current activation and inactivation. Increased activation duration can be linked to the trend of increased AP amplitude – to move a larger ion flux through the channels, more time may be needed. Prolonged  $I_{Ca}$  inactivation durations as well as AP repolarisation durations suggest a more complicated mechanism. Repolarisation of the AP depends on the exclusion of Ca<sup>2+</sup> from the cytoplasm, the deactivation of Cl<sup>-</sup> channels, and the activity of K<sup>+</sup> channels

and H<sup>+</sup>-ATPases. Notably, that amino acids that are known to activate Ca<sup>2+</sup> channels also prolong the AP repolarisation phase (Lapeikaitė *et al.*, 2019, 2020). It is likely that both the effect of amino acids and of IP<sub>6</sub> is connected with the activity of Ca<sup>2+</sup> transport systems. It can be suggested that when the AP threshold is hyperpolarised and Ca<sup>2+</sup> concentration alterations are introduced at lower MP values, the electromotive force is changed and the efficacy of the Ca<sup>2+</sup>-ATPases is not as high.

The core idea behind the Thiel-Beilby mathematical model involves a second messenger IP<sub>3</sub> which activates Ca<sup>2+</sup> channels. The authors of the model noted that IP<sub>3</sub> *per se* is not essential for the model to function – any molecule capable of activating Ca<sup>2+</sup> channels with metabolic properties similar to those of IP<sub>3</sub> is sufficient (Wacke *et al.*, 2003). Based on the results reported in this dissertation and the fact that the model is capable of simulating empirical data it can be supposed that in Characean cells it is not IP<sub>3</sub> but IP<sub>6</sub> that acts as a second messenger which activates Ca<sup>2+</sup> channels responsible for the electrical excitation.

## CONCLUSIONS

- 1)  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers verapamil, NED-19 and  $\text{La}^{3+}$  depolarise *N. obtusa* action potential excitation threshold.
- 2)  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers verapamil and NED-19 depolarise membrane resting potential and increase the values of the temporal characteristics of action potential and  $\text{Cl}^-$  current.
- 3) No effect of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker tetrandrine on the *N. obtusa* electrophysiological parameters was observed.
- 4)  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers verapamil, tetrandrine and NED-19 do not affect the activity of tonoplast  $\text{K}^+$  channels.
- 5) Inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) does not affect *N. obtusa* membrane transport systems.
- 6) Inositol hexakisphosphate ( $\text{IP}_6$ ) hyperpolarises *N. obtusa* action potential excitation threshold.
- 7) Inositol hexakisphosphate ( $\text{IP}_6$ ) shifts the reversal potential of the  $\text{Ca}^{2+}$  currents to more negative membrane potential values; also, prolongs  $\text{Cl}^-$  current activation and inactivation durations.

## PADEKA

Tai dėkui.

Dėkui gynimo Komisijai ir ypač Recenzentams, sumušusiems visus greito, bet vis tiek kruopštaus ir atidaus disertacijos skaitymo rekordus.

Dėkui Vadovei už rūpestį, skatinimą ir laisvę nuo pat pirmųjų bakalauro studijų kursų; dėkui Indrei už nuoširdumą, atvirumą ir gyvenimo išmintį; už mokymąsi kartu, kaip veikia mokslas, dėkui visiems kitiems buvusiems, esamiems ir būsimiems Augalų elektrofiziologijos laboratorijos nariams, ypač Eglei, Juliiui, Juditai ir Aušrinei (ir už patį geriausią dumblio paveiksliuką).

Dėkui Neurobiologijos ir biofizikos katedrai už galimybę jaustis kaip namie tiek ne darbo metu sprendžiant vietinius elektros instaliacijos klausimus, tiek murkdantis pelkėse, tiek apkalbant Lietuvos mokslo politiką, ar net iš tikrųjų retkarčiais ir dirbant.

Dėkui visiems studentams, su kuriais teko susidurti ir, matant tiek daug skirtingų perspektyvų, tobulinti mokslo komunikacijos ir teisingo vertinimo, atsižvelgiant į retkarčiais būtent pusmečio gale gendančius kompiuterius, įgūdžius.

Dėkui draugams ir kolegoms iš Fizikos fakulteto, Nacionalinio vėžio instituto ir apskritai visai Lietuvos biofizikų bendruomenei – kur pažiūrėsi – gudrūs, šilti ir malonūs žmonės.

Dėkui artimiausiems draugams ir šeimynykščiams – ką čia daugiau ir pridursi.

Dėkui Kinijos valdovui Šenongui, kuris, pasak legendos, 2737 m. pr. m. e. (?) atsitiktinai išrado arbatą.

Na ir dėkui visiems dumbliams, paaukotiems mokslo vardan!

# APIE DISERTANTĄ

## Vilmantas Pupkis

### Išsilavinimas:

Biofizikos bakalauro laipsnis – Vilniaus universitetas ,Gyvybės mokslų centras, 2017 m.

Gyvybės mokslų magistro laipsnis (biofizikos studijų programa) – Vilniaus universitetas ,Gyvybės mokslų centras, 2019 m.

Doktorantūros studijos (biofizika), – Vilniaus universitetas ,Gyvybės mokslų centras, 2019-2023 m.

### Darbo patirtis:

Nuo 2019 m. - jaunesnysis asistentas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre („Augalų fiziologijos“ laboratoriniai darbai, „Įvado į matematinę fiziologiją“ pratybos).

### Publikacijos disertacijos tematika:

- 1) 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(647), pp. 1-15. doi: 10.3390/plants10040647. IF 4,658 (Q1).
- 2) **Pupkis, V.**, Lapeikaite, I., Kavaliauskas, J., Trębacz, K., Kisnieriene, V. (2022). Certain calcium channel inhibitors exhibit a number of secondary effects on the physiological properties in *Nitellopsis obtusa*: a voltage clamp approach. *Functional Plant Biology* 50, pp. 195-205. doi: 10.1071/FP22106. IF 3 (Q2).

### Kitos publikacijos:

- 1) Kisnieriene, V., Lapeikaite, I., **Pupkis, V.** (2018). *Functional Plant Biology*, 45(2), pp. 132-142; doi: 10.1071/FP16339.
- 2) Lapeikaite, I., Dragunaite, U., **Pupkis, V.**, Ruksenas, O., Kisnieriene, V. (2018). *Protoplasma*, 256(2), pp. 511-519. doi: 10.1007/s00709-018-1315-0.
- 3) Kisnieriene, V., Lapeikaite, I., **Pupkis, V.**, Beilby, M.J. (2019). *Frontiers in Plant Science*, 10(82), pp. 1-17. doi: 10.3389/fpls.2019.00082.

- 4) Lapeikaite, I., **Pupkis, V.**, Neniskis, V., Ruksenas, O., Kisnieriene, V. (2020). *Functional Plant Biology*, 47(12), pp. 1032-1040. doi: 10.1071/FP20074.
- 5) **Pupkis V.**, Buisas R., Lapeikaitė I., Kisnierienė V. (2020). *The Biophysicist* 2(1), pp. 18-29. doi: 10.35459/tbp.2019.000130.
- 6) Kisnieriene, V., Trębacz, K., **Pupkis, V.**, Koselski, M., Lapeikaite, I. (2022). *Annals of Botany*, 130(4), pp. 457-475. doi: 10.1093/aob/mcac098.

### Dalyvavimas projektuose:

- 1) 2018-2022 m. vykdytas Lietuvos - Lenkijos kvietimo „Daina“ mokslo projektas „Elektrinių signalų perdavimo ilgais atstumais sistemos adaptacija augalams persikeliant iš vandens į sausumą“ (projekto kodas S-LL-18-1). Užimtos pareigos – specialistas (2018-2019 m.), jaunesnysis mokslo darbuotojas (2020-2022 m.).
- 2) 2019-2022 m. vykdytas ES Struktūrinių fondų finansuojamas projektas „Vilniaus STEAM centro kūrimas“ (projekto kodas 01.1.1-CPVA-V-701-15-0001). Užimtos pareigos – metodikų rengėjas ekspertas.
- 3) 2022-2023 m. vykdytas Europos Sąjungos socialinio fondo lėšų finansuojamas projektas „Aukštųjų mokyklų tinklo optimizavimas ir studijų kokybės gerinimas Šiaulių universitetą prijungiant prie Vilniaus universiteto“ (projekto kodas 09.3.1-ESFA-V-738-03-0001). Užimtos pareigos – mokymų lektorius, projekto ekspertas.
- 4) 2023-2024 m. vykdomas ES Struktūrinių fondų Lietuvos Respublikos valstybės biudžeto lėšomis finansuojamas projektas „Skaitmeninė švietimo transformacija („EdTech“)“. Užimamos pareigos – mokymų lektorius.
- 5) 2023-2025 m. Lietuvos ir Vengrijos mokslų akademijų bendrų mokslinių tyrimų 2023–2025 m. projektas „Fotooksidacinio streso sukeltų struktūrinių, spektroskopinių ir elektrocheminių pokyčių tyrimas gėlavandeniuose daugialąsčiuose dumbliuose kuriant natūralios aplinkos biojutiklį“.

### Rezultatų viešinimas tarptautinėse mokslinėse konferencijose:

- 1) **Pupkis V.**, Lapeikaitė I., Kisnierienė V. Electrophysiological Examination of the Effects of Classical Pharmacological Agent Verapamil in Plant-Based Model System. 64<sup>th</sup> Annual meeting of the Biophysical Society, 2020, San Diego (USA), *Biophysical Journal* 118 (3 Supplement 1), p. 591A.

- 2) **Pupkis V.**, Lapeikaitė I., Kisnierienė V. Multi-target effect of Ca<sup>2+</sup> channel blockers on electrophysiological parameters of green alga *Nitellopsis obtusa*. 13<sup>th</sup> European Biophysics Conference, 2021, Vienna (Austria), *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 50(1 Supplement), p. S109.
- 3) **Pupkis V.**, Lapeikaitė I., Kisnierienė V. Phytic acid enhances electrical excitability in macrophyte *Nitellopsis obtusa*. 18<sup>th</sup> Congress of the Polish Biophysical Society, 2022, Warsaw (Poland), *Currents Topics in Biophysics*, 43(Suppl. A), p. 75. Stendinis pranešimas pripažintas geriausiu.
- 4) **Pupkis V.**, Lapeikaitė I., Kisnierienė V. Inositol hexakisphosphate (IP<sub>6</sub>) modulates parameters of electrical signaling in Characean macroalgae *Nitellopsis obtusa*. 6<sup>th</sup> International Symposium on Plant Signaling and Behavior, 2023, Seattle (USA), p. 50.
- 5) **Pupkis V.**, Janūžaitė J., Lapeikaitė I., Kisnierienė V. Electrical excitability-enhancing action of Inositol 1,4,5, trisphosphate (IP<sub>3</sub>) on macroalgae *Nitellopsis obtusa*. 14<sup>th</sup> EBSA Congress, 2023, Stockholm (Sweden), *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 52(1 Supplement), p. S151. Stendinis pranešimas įvertintas *BPS-EBSA Student Poster Award*.
- 6) **Pupkis V.**, Lapeikaitė I., Kisnierienė V. Functional insights into the activity of Ca<sup>2+</sup> channels responsible for the generation of action potentials in the macrophyte *Nitellopsis obtusa*. 68<sup>th</sup> Annual meeting of the Biophysical Society, 2024, Philadelphia (USA), *Biophysical Journal* 123 (3 Supplement 1), p. 330A; žodinis pranešimas.

Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt), [www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
[bookshop.vu.lt](http://bookshop.vu.lt), [journals.vu.lt](http://journals.vu.lt)  
Tiražas 15 egz.