

VILNIAUS UNIVERSITETAS

OLGA SEVRIUKOVA

MAŽŲ JONIZUOJANČIOSIOS SPINDULIUOTĖS DOZIŲ POVEIKIS
MENTURDUMBLIŲ *NITELLOPSIS OBTUSA* LĄSTELIŲ
ELEKTROFIZIOLOGINĖMS SAVYBĖMS

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, biofizika (02 B)

Vilnius, 2014

Disertacija rengta 2009 – 2014 metais Vilniaus universitete

Mokslinis vadovas:

dr. Vidmantas Sakalauskas (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biofizika –
02 B)

TURINYS

SANTRUMPOS	5
1. ĮVADAS.....	6
1.1 Darbo tikslas ir uždaviniai	10
1.2 Darbo naujumas	11
1.3 Darbo aktualumas ir praktinis taikymas	11
1.4 Ginamieji teiginiai.....	13
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	15
2.1 Jonizuojančioji spinduliuotė: savybės, poveikis gyviems organizmams, mažų dozių problematika ir biotos apšvitos vertinimo ir ribojimo aspektai.	15
2.1.1 Jonizuojančiosios spinduliuotės savybės ir biologinis poveikis	15
2.1.2 Mažų jonizuojančiosios spinduliuotės dozių poveikio ypatumai.....	20
2.1.3 Biotos apšvitos vertinimo ir radiacinės saugos aspektai	23
2.2. Tričio fiziko-cheminės savybės ir biologinis poveikis	25
2.2.1. Tričio fiziko cheminės savybės	25
2.2.2 Tričio biologinis poveikis ir citotoksiškumas	26
2.3 Menturdumblių panaudojimas ekotoksikologiniuose tyrimuose	30
2.4 Augalinių ląstelių bioelektrocheminė sistema	32
2.4.1 Augalinių ląstelių jonų pernašos sistemos	32
2.4.2 Augalinių ląstelių membranos ramybės potencialas	38
2.5 Augalų elektriniai signalai	41
2.5.1 Veikimo potencialo generavimo mechanizmai augaluose	42
2.5.2 Veikimo potencialo sklidimas augaluose	45
2.5.3 Veikimo potencialo fiziologinės funkcijos augaluose	47
2.6. Literatūros šaltinių apžvalgos apibendrinimas.....	48
3. METODIKA	50
3.1. Tyrimų objektas	50
3.2. Eksperimentuose naudotos medžiagos, tirpalai ir jonizuojančiosios spinduliuotės šaltiniai.....	51
3.3. Elektrofiziologiniai matavimai	53

3.3.1. Elektrofiziologinių parametrų registravimo sistema ir jos techninės savybės	53
3.3.2. Elektrofiziologinių parametrų registravimo ypatumai	54
3.4. Eksperimentų eiga.....	61
3.4.1. Išgyvenamumo testas	61
3.4.2. Tričio poveikio bioelektriniams augalinės ląstelės parametrams tyrimas	62
3.4.3. Suminio tričio ir aliuminio poveikio menturdumblių elektriniam aktyvumui tyrimas	62
3.4.4. Gretutinių reiškinių (angl. Bystander) tyrimas.....	63
3.5. Duomenų apdorojimo, vaizdavimo ir statistinės analizės metodai:	64
4. REZULTATAI.....	65
4.1. Skirtingų tričio aktyvumo koncentracijų poveikis menturdumblių gyvybingumui	65
4.2. Tričio poveikis menturdumblių membranų bioelektriniams parametrams	66
4.3. Suminis tričio ir aliuminio poveikis menturdumblių jonų transporto sistemoms, dalyvaujančioms veikimo potencialo generavime	72
4.4. Jonizuojančiosios spinduliuotės sukeltų gretutinių reiškinių tyrimas....	75
5. REZULTATŲ APTARIMAS	83
5.1. Tričio poveikis menturdumblių membranų elektrofiziologiniams parametrams	83
5.2. Suminis tričio ir aliuminio poveikis pagrindinėms jonų pernašos sistemoms, dalyvaujančioms menturdumblių elektrinėse reakcijose	87
5.3. Jonizuojančiosios spinduliuotės sukeltų gretutinių reiškinių bioelektrinė išraiška menturdumbliuose	91
6. IŠVADOS.....	96
7. LITERATŪROS SĄRAŠAS	97
9. PADĖKA.....	122
10. GYVENIMO APRAŠYMAS	123

SANTRUMPOS

ABA – abscizo rūgštis

APW – dirbtinis tvenkinio vanduo (*angl.* Artificial Pond Water)

ATP - adenzintrifosfatas

cADPR – ciklinė adenzintrifosfato ribozė

E - membranos potencialas

H⁺ - ATPazė – protonų siurblys

Cl⁻ - ATPazė – chloro jonų siurblys

Ca²⁺ - ATPazė - kalcio jonų siurblys

K⁺ - ATPazė - kalio jonų siurblys

Na⁺ - ATPazė – natrio jonų siurbliai

HEPES - 4-(2-hidroksietil)piperazinil-1-etansulfoninė rūgštis (buferis)

HTO – tričio vanduo (*angl.* Tritiated water)

IP₃ - inozitolio 1,4,5-trisfosfatas

JS – jonizuojančioji spinduliuotė

K_{in} kanalai - įeinančios krypties kalio kanalai

K_{out} kanalai - išeinančios krypties kalio kanalai

MAPK/MAP kinazė – mitogenų aktyvuojama baltymų kinazė (*angl.* mitogen-activated protein kinase)

Na, K, Cl, Ca, Al - cheminiai elementai

Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Al³⁺ - jonai

NAADP – nikotino rūgšties dinukleotido fosfatas

OBT – organiškai surištas tritiumas (*angl.* organically bound tritium)

ROS – reaktyviosios deguonies formos (*angl.* reactive oxygen species)

RP - ramybės potencialas

SE- standartinė paklaida

Sr 90 – radioaktyvus stroncio izotopas

Tris – hidroksimetilaminometanas (buferis)

VP - veikimo potencialas

1. ĮVADAS

Visi mūsų planetoje gyvenantis organizmai, yra nuolat veikiami jonizuojančiosios spinduliuotės (JS), sklaidžiamos gamtinių radioaktyviųjų elementų, esančių vandenyje, dirvožemyje, grunte, atmosferoje bei kosminės kilmės jonizuojančiosios spinduliuotės. Šiuolaikiniame pasaulyje jonizuojančiosios spinduliuotės šaltiniai intensyviai naudojami medicinoje, pramonėje, moksliniuose tyrimuose. Toks platus jonizuojančiosios spinduliuotės panaudojimas, yra susijęs su radioaktyviųjų atliekų susidarymu ir antropogenine radioaktyvia tarša, keliančia grėsmę žmonėms ir visai gyvenamajai aplinkai. Ilgą laiką pasaulyje, buvo laikomasi nuostatos, kad radiacinės saugos standartai, nustatyti žmonėms užtikrina tinkamą apsaugą ir visiems kitiems gyviems organizmams. Kadangi ši prielaida neturėjo pakankamo mokslinio pagrindimo, buvo pripažinta, kad biotos ir visos aplinkos radiacinė sauga turi būti užtikrinama nepriklausomai nuo žmonių radiacinės saugos, siekiant palaikyti biologinę įvairovę ir pusiausvyrą (Delistraty 2008). Pastaruoju metu Europos Sąjunga ir kitos tarptautinės organizacijos vis didesnę dėmesį kreipia į aplinkos radiacinę apsaugos užtikrinimo problemas. Paskutinius 10 metų yra intensyviai dirbama siekiant sukurti efektyvias biotos radiacinės saugos užtikrinimo gaires (Garnier-Laplace et al. 2013). Per šį laikotarpį buvo atrinktos standartizuotųjų augalų ir gyvūnų grupės ir nustatytos jiems taikytinos apšvitos dozių ribos (Lukšienė et al. 2013). Tačiau, moksliskai pagrįstų duomenų apie radiacijos poveikį įvairioms biotos rūšims trūkumas vis dar išlieka viena iš pagrindinių problemų, stabdančių veiksmingos aplinkos apsaugos nuo žalingo JS poveikio sistemos kūrimą, įteisinimą ir įgyvendinimą (Dallas et al. 2012). Ypatingai tai liečia mažų jonizuojančiosios spinduliuotės dozių poveikio gyviems organizmams įvertinimą. Mažų jonizuojančiosios spinduliuotės dozių veikimo mechanizmų išaiškinimą apsunkina netiesinė dozės atsako priklausomybė ir tai, kad mažų ir didelių JS dozių poveikis skiriasi ne tiek stiprumu, kiek organizmo reakcijos pobūdžiu (Geras'kin et al. 2007; UNSCEAR 2012). Yra nustatyti būdingi mažoms JS dozėms biologiniai efektai, susiję su teigiamu poveikiu gyviems

organizmams (radiacinė hormezė), ląstelių jautrumo didelių dozių JS ir kitiems aplinkos veiksniams modifikacija, signalo apie sukeltus radiacinius padarinius perdavimu iš apšvitą patyrusių ląstelių neapšvitintoms (gretutiniai reiškiniai). Į šių padarinių nagrinėjimą nukreipti tyrimai pateikia skirtingus ir kartais prieštaringus rezultatus, kurie yra besitęsiančių Tarptautinės atominės energijos agentūros (IAEA), Tarptautinės Radiacinės saugos Komisijos (ICRP) ir kitų organizacijų debatų priežastimi (Morgan et al. 2013). Pavyzdžiui, nėra vieningos nuomonės, ar JS sukeliama gretutiniai reiškiniai sustiprina JS poveikį sąlygodami radiacinių padarinių paplitimą organizme, ar tai yra vienas iš adaptacinių mechanizmų, reikalingų apsaugoti organizmą nuo radiacinių padarinių vystymosi (Mothersill & Seymour 2006; Mothersill & Seymour 2005). Panaši situacija yra ir su mažų JS dozių savybės keisti organizmo reakciją į kitus stresinius faktorius interpretacija. Vieni tyrėjai teigia, kad apšvita mažomis JS dozėmis inicijuoja adaptacinį organizmo atsaką ir apsprendžia mažesnę jo jautrumą kitų veiksnių poveikiui (Marples 1997; Wolff et al. 1988), kiti priešingai konstatuoja, kad mažų dozių JS geba stiprinti kitų aplinkos faktorių poveikį organizmui (Burlakova 1995) arba silpninti organizmo atsparumą aplinkos poveikiui (Dmitriev et al. 2009). Atsižvelgiant į tai, kad mūsų aplinka vienu metu yra veikiama daugelio fizikinių, cheminių ir biologinių veiksnių, kurių tarpusavio sąveika gali nulemti naujų kenksmingų derinių susidarymą arba jau esamų biologinio toksiškumo pakitimus (Fairbrother et al. 2007), modifikuojančio JS poveikio organizmų reakcijai į kitus aplinkos faktorius įvertinimas yra labai svarbus mišrios aplinkos antropogeninės taršos kontekste. Vis didesnę susirūpinimą kelia aplinkos technogeninis užterštumas aliuminiu (Al), vienu iš labiausiai paplitusių metalų Žemės plutoje ir visoje aplinkoje. Aliuminis aptinkamas visuose gyvuose organizmuose neturėdamas apibrėžtos fiziologinės paskirties (Poschenrieder et al. 2008a), bet yra gerai žinoma, kad Al gyvūnuose pasižymi neurotoksiškumu ir kancerogeniškumu (Darbre et al. 2013; Martac & Podgorac 2010; Kawahara & Kato-Negishi 2011), o augaluose slopina šaknų augimą, fotosintezės aktyvumą, ląstelių metabolizmą, maistinių medžiagų apykaitą (Alvim et al.,

2012; Gupta et al., 2013; Mossor-Pietraszewska, 2001; Panda et al., 2009; Rout et al., 2001; Silva et al., 2012). Tačiau Al biologinis elgesys sąveikoje su kitais aplinkos faktoriais įskaitant ir JS nėra gerai ištirtas. Kelios tyrėjų grupės pateikė duomenų apie modifikuojantį jonizuojančiosios spinduliuotės poveikį Al biologiniam toksiškumui. Vienu tyrimų rezultatai parodė, kad, bendras JS ir aliuminio veikimas sąlygoja intensyvesnį glijos skaidulinio rūgščiojo baltymo (angl. GFAP) pasireiškimą žiurkių smegenyse, lyginant su atskiru aliuminio ar mažo intensyvumo rentgeno spindulių poveikiu (Nedzvetskii et al., 2001). Kita tyrėjų grupė taip pat konstatavo suminio mažų JS dozių ir aliuminio poveikio sinergetinį pobūdį, parodydama, kad veikiant lašišinių žuvų odos mėginius aliuminiu ir mažų dozių γ – spinduliuote, gretutiniai efektai klonogeninėse ląstelėse pasireiškia stipriau nei apšvitos ar aliuminio atskiro poveikio atveju (Mothersill et al. 2014). Tačiau JS sąveikos su Al ar kitais aplinkos veiksniais kaip ir mažų JS dozių sukiamų fenomenų mechanizmai nėra pakankamai išaiškinti. Šiuolaikiniame pasaulyje mažų dozių JS gali turėti reikšmingą poveikį žmogui ir aplinkai, nes jos šaltiniai, su kuriais susiduriama kasdien, yra padidėjęs gamtinis radiacinis fonas, padidėjusi aplinkos antropogeninė tarša, medicininė, profesinė ir avarinė apšvita (Sokolov & Neumann 2014). Todėl, išlieka poreikis tęsti mažų JS dozių poveikio tiek žmonėms tiek ir biotai naujų efektyvių tyrimų ir vertinimo metodų paiešką.

Augalai daugelyje atvejų yra patogūs tyrimų objektai JS veikimo mechanizmų atskleidimui, nes suteikia daug informacijos ne tik apie daugerio pas fenomenologines atsakų į apšvitą savybes, bet ir padeda išsamiai analizuoti radiacinių padarinių prigimtį gyvuose organizmuose. Menturdumbliai yra sausumos ir vandens augaliją jungianti grandis (McCourt et al. 2004), todėl juose vykstančių procesų supratimas turi didelę reikšmę, nes nustatyti dėsningumai gali būtų pritaikyti ir aukštesniesiems augalams. Šie makrodumbliai yra labai jautrūs aplinkos užteršimui, todėl yra naudojami išorinių veiksnių toksiškumo vertinimui (Manusadzianas et al. 2002), technogeninių radionuklidų vandens ekosistemoje akumuliacijos stebėsenai (Nedveckaite et al. 2007; Nedveckaite & Marciulioniene 2011) ir gali

naudojami kaip bioindikatoriai radiotoksikologiniuose tyrimuose (Adliene et al. 2006). Visų ląstelių plazminė membrana yra ne tik barjeras tarp ląstelės išorės ir vidaus, bet pirminis taikynys aplinkos faktorių poveikiui. Išoriniai veiksniai gali pakeisti ląstelių membranų elektrinį potencialą (E), tiesiogiai paveikdami membranos struktūrą ar veikdami jonų pernašos sistemas, dalyvaujančias ląstelės elektrogenezėje (Tekpli et al. 2013). Žinoma, kad membranos makromolekulinės organizacijos, paviršinio potencialo, baltymų ir receptorių funkcionavimo analizė gali būti pritaikyta vertinant skirtingų tipų ir intensyvumo JS sukiamus padarinius ląstelėje (Cramp & Yatvin 1994; Somosy 2000). Augalinių ląstelių membranų elektrofiziologinių savybių pokyčiai atspindi ankstyviausią ir greičiausią ląstelės reakciją į besikeičiančias aplinkos sąlygas. Augalai gali taip pat reaguoti į įvairius išorinius stimulus, generuodami greitus elektrinius atsakus, t.y., veikimo potencialus (VP), panašius į gyvūnų neurotransdukcijoje dalyvaujančius elektrinius signalus (Baluška 2013). Be to, augalų VP pasižymi specifiškumu stimului, todėl gali būti naudojami kaip skirtingų aplinkos veiksnių, įskaitant ir JS, sukiamų padarinių biologinis markeris (Volkov & Ranatunga 2006). Dėl savo unikalių sandaros, funkcionavimo ir fiziologinių savybių, gebėjimo generuoti VP reaguojant į mechaninį sudirginimą, pažeidimą, aplinkos toksiškumą ar atsakant į tiesioginį elektrinį stimuliavimą, menturdumblių ląstelės yra plačiai naudojama modelinė sistema elektrofiziologiniuose tyrimuose (Tazawa et al. 1987). Žinoma, kad didelių dozių JS geba sukelti savaiminį veikimo potencialo generavimą ir kitus elektrofiziologinius pokyčius makrodumbliuose (Röttinger & Hug 1972). Tačiau, menturdumblių bioelektriniai parametrai jautriai ir greitai reaguoja ir į nedideles toksinių medžiagų koncentracijas (Юрин & Соколик 1991), todėl galėtų būti pasitelkti mažų jonizuojančiosios spinduliuotės dozių poveikio tyrimuose.

Vienas biologiškai svarbiu mažų JS dozių šaltinių ypač vandens ekosistemose, yra tritis. Natūraliai tričio gamtoje yra labai mažai, tačiau jis papildomai gali patekti į aplinką dėl branduolinės energetikos objektų veiklos, branduolinių ginklų gamybos bei radiožymenų naudojimo moksliniuose

tyrimuose. Dėl minėtų veiklų tričio koncentracija ypatingai vandens ekosistemoje gali didėti. Tai patvirtina ir 2011 metais įvykusios branduolinės avarijos Fukušimoje pasekmės, kuomet buvo užfiksuotas reikšmingas ir užsitęsęs radionuklidų įskaitant ir tritį išmetimas į Ramųjį vandenyną ir gruntinius vandenis, sukėlęs didelę grėsmę vandens organizmams. Tikėtina, kad padidintos tričio koncentracijos aplinkoje tikimybė artimoje ateityje didės dėl branduolinės energetikos vystymosi. Todėl būtina vykdyti išsamius tričio poveikio gyviems organizmams tyrimus, siekiant kuo tiksliau įvertinti keliamą aplinkai pavojų dėl galimo tričio kiekio padidėjimo radiologinių avarių atveju (Boyer et al. 2009) ypatingą dėmesį skiriant tričio poveikio vandens biotai tyrimams (Jean-Baptiste & Fourré 2013). Tričio poveikis gyvam organizmui kelia tiek didelį tyrėjų susidomėjimą tiek ir susirūpinimą dėl jo keliamos rizikos, nes tritis yra labai mobilus biologinėse sistemose, jis gana greitai įsijungia į vandens molekules (angl. HTO - tritiated water), lengvai patenka į organizmo vidų vandeniui įprastiniu būdu, o jo metabolizmas ląstelėje identiškas vandeniliui (Melintescu et al. 2011). Patekęs į ląstelę, tritis gali susijungti su įvairiausiomis biologinėmis molekulėmis ir modifikuoti jų funkcionalumą, tai ir apsprendžia tričio poveikio daugialypiškumą (Galeriu et al. 2013; Kim et al. 2013). Kaip JS šaltinis, tritis gali veikti organizmą tiesiogiai jonizuodamas molekules arba netiesiogiai per vandens radiolizę sukurdamas laisvuosius radikalus. Išvardintos tričio savybės nulemia tai, kad jo biologinis efektyvumas yra didesnis negu γ ar rentgeno spindulių (Little & Lambert 2008). Todėl galima pastebėti tričio sukeltą biologinį poveikį, net ir esant labai mažoms jo skleidžiamos radiacijos dozėms. Daugiau žinių apie mažų dozių jonizuojančiosios spinduliuotės poveikio mechanizmus ląsteliniame lygmenyje suteiktų tričio poveikio augalinėms ląstelėms tyrimas elektrofiziologiniais metodais.

1.1 Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas - standartiniu viduląsteliniu biopotencialų registravimo ir fiksuotos įtampos metodais ištirti mažų jonizuojančiosios spinduliuotės dozių

poveikį menturdumblių *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranų bioelektriniams parametrams.

Šiam tikslui pasiekti buvo išskelti tokie darbo uždaviniai:

1. Įvertinti kaip tričio sąlygotos mažos jonizuojančiosios spinduliuotės dozės veikia menturdumblių *Nitellopsis obtusa* ląstelių:
 - membranos ramybės potencialą ir specifinę membranos varžą;
 - veikimo potencialo dinamiką;
 - Ca^{2+} ir Cl^- pernašos sistemų funkcionavimą membranos elektrinio sužadavimo metu.
2. Ištirti suminį aliuminio ir tričio poveikį menturdumblių ląstelių membranų jonų pernašos sistemų funkcionavimui.
3. Išanalizuoti mažų jonizuojančiosios spinduliuotės dozių sukeliamų gretutinių reiškinių elektrofiziologinę išraišką ir galimą perdavimo mechanizmą.

1.2 Darbo naujumas

1. Menturdumblių *Nitellopsis obtusa* ląstelės kaip modelinės sistemos elektrofiziologiniai parametrai pirmą kartą panaudoti kaip jautrūs ir informatyvūs mažų tričio dozių poveikio indikatoriai.
2. Pirmą kartą atliktas suminio tričio ir aliuminio poveikio menturdumblių *Nitellopsis obtusa* jonų pernašos per membraną sistemoms tyrimas.
3. Pirmą kartą mažų jonizuojančiosios spinduliuotės dozių sukeliamų gretutinių reiškinių tyrimams buvo panaudota menturdumblių *Nitellopsis obtusa* elektrofiziologinių atsakų analizė.

1.3 Darbo aktualumas ir praktinis taikymas

Atliktų tyrimų rezultatai galėtų prisidėti įgyvendinant šalyje galiojančių teises aktų, reglamentuojančių aplinkos apsaugą, reikalavimus. Tai yra ypač aktualu, nes Lietuvoje vyksta senos atominės jėgainės eksploatacijos nutraukimo darbai bei planuojama statyti naują atominę elektrinę, o

vadovaujantis Lietuvos Respublikos ūkinės veiklos (įskaitant ir branduolines energetikos objektus) įstatymu, būtina nustatyti, apibūdinti ir įvertinti galimą tiesioginį ir netiesioginį planuojamos ūkinės veiklos poveikį radiacinės saugos požiūriu visuomenės sveikatai ir aplinkai (įskaitant gyvūniją ir augaliją). Šiame kontekste tričio biologinio poveikio vandens organizmams vertinimas yra labai svarbus, kadangi dėl abiejų aukščiau paminėtų procesų išauga tričio, kaip jų veiklos šalutinio produkto, koncentracijos padidėjimo aplinkoje rizika. Ignalinos atominės elektrinės (IAE) eksploatacijos laikotarpiu Lietuvoje, aukščiausia tričio aktyvumo koncentracija jos aušinimo baseine - Drūkšių ežere - siekė 24 Bq L^{-1} . Tuo tarpu, tričio tūrinis aktyvumas gruntiniame vandenyje buvo $2-3 \text{ Bq L}^{-1}$, tokiu būdu, maždaug 20 Bq L^{-1} tričio aktyvumo koncentracijos skirtumas susidarė dėl IAE veiklos (Nedveckaite & Marciulioniene 2011). Be to, radionuklidų patekimo į biosferą iš Maišiagalos paviršinio radioaktyviųjų atliekų kapinyno vertinimo 2005-2012 metais rezultatai parodė, kad tritis geriamajame ir buityje naudojamame vandenyje šio regiono gyventojams buvo pagrindinis apšvitos šaltinis (Nedveckaite et al. 2013). Taigi akivaizdu, kad IAE eksploatacijos nutraukimas ir planavimas statyti naują atominę elektrinę, taip pat radioaktyviųjų atliekų tvarkymas iškelia poreikį tirti tričio poveikį skirtingo organizuotumo gyvoms sistemoms, siekiant pakankamai apsaugoti aplinką nuo žalingų tričio sąlygotos jonizuojančiosios spinduliuotės pasekmių.

Be to, jau yra suformuluotos tarptautinės radiacinės saugos komisijos (ICRP) rekomendacijos ir reikalavimai dėl aplinkos radiacinės saugos įteisinimo ir nagrinėjamo atskirai nuo žmonių radiacinės saugos (ICRP 2008), taip pat yra rengiami ir Europos sąjungos reikalavimai šalims narėms dėl biotos ir visos aplinkos radiacinei saugos užtikrinimo. Todėl šių tyrimų rezultatai prisidėtų prie biotos apšvitos vertinimo, ribojimo ir teisinio reglamentavimo Lietuvoje kūrimo.

Lietuvoje menturdumbliai *Nitellopsis obtusa* naudojami kaip modeliniai organizmai vykdant radioekologinę stebėseną, siekiant įvertinti Drūkšių ežero radioaktyviąją taršą ir jame esančios biotos apšvitą dėl IAE veiklos. Tiriant JS

poveikį *Nitellopsis obtusa* bioelektriniam aktyvumui, galima įvertinti JS poveikį gyvybiškai svarbioms jonų pernašos sistemoms. Šiuo metu aplinkos radiologinė stebėseną vykdoma vertinant radionuklidų akumuliaciją testiniuose organizmuose, o apšvitos poveikio vertinimas atliekamas apskaičiuojant gaunamas apšvitos dozes nuo jų išorėje ir viduje esančių jonizuojančiosios spinduliuotės šaltinių. Kadangi tritis vandens pavidalu labai greit pasišalina iš augalų nesant jo išorinėje aplinkoje, todėl HTO poveikio augalams vertinimas remiantis aukščiau paminėtu metodu yra labai sudėtingas. Mūsų siūlomi menturdumblių elektrofiziologiniai tyrimai galėtų pasitarnauti kaip dar vienas efektyvus aplinkos radiologinės stebėsenos įrankis. Šie tyrimai praplėstų *Nitellopsis obtusa* modelinės sistemos panaudojimą tričio biologinio poveikio vertinimui, radioekologiniuose tyrimuose, nes bioelektrinių parametrų nustatymas realiu laiku objektui esant jonizuojančiosios spinduliuotės aplinkoje įgalintų apšvitos poveikio vertinimą ląsteliniame ir organizmo lygmenyse beveik natūraliomis vandens ekosistemai sąlygomis. Kadangi *Nitellopsis obtusa* ląstelės pasižymėjo dideliu membranos elektrinių savybių jautrumu reaguojant į nedideles tričio dozes, jų bioelektrinių parametrų, kaip greitų ir jautrių radiacijos poveikio indikatorių, analizę galima būtų pritaikyti aiškinantis mažų jonizuojančiosios spinduliuotės dozių sukeltų fenomenų mechanizmus ląsteliniame lygmenyje.

1.4 Ginamieji teiginiai

1. Mažą išorinės apšvitos dozę nulemiantis 15 kBq L^{-1} tūrinio aktyvumo tritis veikia *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranų elektrines savybes, todėl menturdumblių bioelektrinės reakcijos gali būti naudojamos kaip jautrūs mažų jonizuojančiosios spinduliuotės dozių subletalus poveikio gyvoje augalinėje ląstelėje indikatoriai, radioekologinės stebėsenos bei biotos apšvitos vertinimo parametrai.
2. Menturdumblių elektriniai atsakai į aliuminio poveikį kinta dėl tričio buvimo ląstelių aplinkoje, todėl tritis galėtų būti laikomas reikšmingu veiksniumi aliuminio biologinio toksiškumo pasireiškimui.

3. Elektrofiziologiniai tyrimo metodai gali būti naudojami tiriant mažų dozių jonizuojančiosios spinduliuotės sukeltų gretutinių reiškinių mechanizmus menturdumblių ląstelėse *in vivo*.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1 Jonizuojančioji spinduliuotė: savybės, poveikis gyviems organizmams, mažų dozių problematika ir biotos apšvitos vertinimo ir ribojimo aspektai

2.1.1 Jonizuojančiosios spinduliuotės savybės ir biologinis poveikis

Visa žemės gyva aplinka yra nuolat veikiama įvairių jonizuojančiosios spinduliuotės šaltinių, kurie gali sukelti išorinę gyvų organizmų apšvitą, o patekę į jų vidų sąlygoja organizmo vidinę apšvitą. JS šaltiniai yra gamtinės ir dirbtinės kilmės. Gamtinės kilmės šaltiniais laikoma kosminė spinduliuotė, grunte, vandenyje, maiste, statybinėse medžiagose esantys radionuklidai. Dirbtinių šaltinių grupei priklauso šaltiniai, sukurti žmogaus, įvairias tikslais naudojami medicinoje, pramonėje, moksliniuose tyrimuose bei radionuklidai, į aplinką patekę dėl branduolinės energetikos objektų veiklos, branduolinio ginklo bandymų bei radiologinių avarijų (UNSCEAR 2008). Gamtinės bei branduolinių reakcijų kilmės JS yra apspręsta radioaktyvumo, t.y. savaiminio nestabilių cheminių elementų virsmo kito elemento izotopais, išspinduliuojant elementarias daleles, branduolius arba fotonus. JS šaltinių radioaktyvumas apibrėžiamas įvykusių branduolinių skilimų kiekiu per laiko vienetą. SI sistemoje naudojamas radioaktyvumo matavimo vienetas – bekerelis (Bq), kurio aktyvumas yra 1 skilimas per sekundę. Siekiant apibūdinti radioaktyvumo koncentraciją tam tikroje medžiagoje dar naudojamas toks matas, kaip tūrinis aktyvumas, parodantis medžiagos aktyvumo ir jo tūrio santykį (dujose matuojamas – Bq m⁻³ (bekerelis kubiniam metrui)), skysčiuose – Bq L⁻¹ (bekerelis litrai) bei savitasis aktyvumas, nusakantys medžiagos aktyvumo ir masės santykį, matuojamas Bq kg⁻¹.

Bendrai jonizuojanti spinduliuotė skirstoma į skvarbias trumpas elektromagnetines bangas (rentgeno($\lambda \sim 10^{-5}$ mm), γ ($\lambda \sim 10^{-2} \div 10$ nm) spinduliai) ir mažiau skvarbius dalelių (turinčių krūvį α , β dalelių, protonų, sunkiųjų jonų, bei neturinčių krūvio neutronų) pluoštus. JS sąveikaudama su medžiaga sukuria teigiamus ir neigiamus jonus perduodamą jiems tam tikrą energijos kiekį, reikalingą iš paveiktų atomų išlaisvinti elektronus, protonus, neutronus ar net visą branduolį. Mažiausias energijos kiekis, reikalingas

daugumos atomų jonizacijai ir valentinių elektronų išlaisvinimui, yra 10-12 eV. Sukurtų jonų porų skaičius trajektorijos ilgio vienetu vadinamas specifine jonizacija, kuri priklauso nuo dalelių sklidimo greičio bei medžiagos tankio: kuo didesnis dalelių greitis, tuo mažesnė specifinė jonizacija. Dėl JS atiduodamos energijos mažėja jos skvarba. Perduodama energija yra vienas bendras visų JS tipų sąveikos su medžiaga vardiklis, vadinamas sugertąja doze (D) ir apibrėžiamas kaip $D = dE/dm$ (D – sugertoji dozė, dE- medžiagos tūrio elementui perduota jonizuojančiosios spinduliuotės energija, J; dm – tūrio elemento masė, kg). Sugertoji dozė SI sistemoje matuojama grėjais (Gy) ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J kg}^{-1}$)

Viena svarbiausių JS savybių, nulemiančių biologinio poveikio pobūdį yra pernešamos energijos kiekis apibūdinamas tiesine energijos perdava TEP (angl. LET *Lineal Energy Transfer*). Šis dydis atspindinti jonizuojančios spinduliuotės energijos perdavimo ypatybes ir parodo vidutinį energijos kiekio perdavimą per nueito medžiaga atstumo vienetą ($\text{keV}/\mu\text{m}$). Skirtingi JS tipai pasižymi skirtinga TEP. Maža TEP pasižymi γ , rentgeno ir beta spinduliuotė, didelė – sunkieji branduoliai, protonai, neutronai ir alfa dalelės. Tačiau biologiniu požiūriu svarbu ne tik tai, kiek energijos sugėrė medžiaga, bet ir kokius padarinius ląstelei tai gali sukelti. Matas, siejantis sugertą JS dozę su jos sukeltomis pasekmėmis gyviems organizmams, vadinamas santykinu biologiniu efektyvumu SBE (angl. *Relative Biological Effectiveness*) arba JS svoriniu daugikliu W_R (angl. *Weighting factor*), kuris priklauso nuo TEP ir nuo švitinamo biologinio audinio tipo. Svorinis daugiklis Rentgeno ir γ spinduliuotei bei elektronams ir pozitronams apytiksliai lygus 1 (išskyrus tričio skleidžiama β spinduliuotę, kurios W_R varijuoja nuo 1 iki 3, priklausomai nuo dozės ir apšvitos trukmės, esant mažoms tričio dozėms W_R yra didesnis (Dobson RL 1978)) gali siekti 3, šiluminiais neutronams $W_R \approx 3-5$, greitųjų neutronų, protonų, α dalelių, branduolių skeveldrų ir sunkiųjų jonų apšvitinimui $W_R \approx 10-20$. Padauginus sugertąją JS dozę iš šios JS svorinio daugiklio naudojamas biologinį poveikį nusakančiai ekvivalentinei dozei, kuri parodo nustatymui (Soderberg 2013).

Šios fizikinės jonizuojančiosios spinduliuotės savybės galiausiai apsprendžia JS poveikį gyviems organizmams. Jonizuojančiosios spinduliuotės sukeltus padarinius biologiniuose objektuose galima suskirstyti į nulemtuosius ir atsitiktinius reiškinius. Nulemtieji reiškiniai būdingi didelėms JS dozėms, ir jų atsiradimą galima tiksliai susieti su gauta doze (tai spindulinė liga, nudegimai), o atsitiktiniai efektai gali pasireikšti su tam tikra tikimybe (vėžys, genomo nestabilumas). Bendrai jonizuojančiosios spinduliuotės padarinių vystymąsi galima suskirstyti į keturias fazes: fizikinę, fiziko-cheminę, cheminę ir biologinę. Fizikinė fazė trunka labai trumpai ($\sim 10^{-13}$ s), jos metu vyksta jonų bei molekulių sužadimas. Toliau seka fiziko-cheminė ($\sim 10^{-10}$ s) stadija kuomet susidaro laisvieji radikalai. Cheminė fazė ($\sim 10^{-6}$ s) siejama su laisvųjų radikalų sąveiką su biologinėmis molekulėmis. Ilgiausiai trunka biologinė fazė (nuo sekundžių iki mėnesių) kai pasireiškia ląstelių funkcijų sutrikimai, morfologiniai pokyčiai, organų pažeidimai (Pouget et al, 2001). Pagal tai, kokiu būdu buvo sukelti išvardinti padariniai, JS veikimo biologiniuose objektuose mechanizmus galima suskirstyti į tiesioginį ir netiesioginį JS poveikį. Tiesioginio poveikio metu, JS betarpiškai jonizuoja įvairius ląstelės atomus ir molekules, taip pažeisdama ląstelės funkcionavimą. Netiesioginio poveikio, kuris manoma sudaro iki 70 % JS poveikio ląstelėms, metu JS, sąveikaudama su vandens molekulėmis sukelia vandens radiolizę, kurios metu pasigamina reaktyviosios deguonies formos ROS (angl. ROS reactive oxygen species), laisvieji radikalai kurie per biocheminių reakcijų grandinę sutrikdo ląstelės homeostazę. Tai, kad ląstelių didelę dalį sudaro vanduo gali paaiškinti netiesioginio JS poveikio vyraujančią vaidmenį (Riley 1994)

Įvairūs fiziniai ir cheminiai aplinkos veiksniai gali turėti įtakos radiacijos sukeltų fiziko-cheminių reakcijų eigai, veikti ląstelių ir viso organizmo fiziologinę būklę, reparacijos ir regeneracijos procesus, ir taip modifikuoti radiacinių pažeidimų vystymosi pobūdį. Vienas tokių veiksnių yra deguonis. Žinomas universalus radiobiologijos reiškinys yra susijęs su modifikuojančiu deguonies poveikiu biologiniams jonizuojančiosios spinduliuotės efektams.

Deguonies efektas būdingas gyviems organizmams visuose biologinės organizacijos lygmenyse ir pasireiškia JS poveikio sustiprinimu dėl deguonies koncentracijos padidėjimo aplinkoje. Modifikuojančio deguonies poveikio mechanizmas nėra iki galo aiškus. Manoma, kad, deguonis sąveikaudamas su JS sukurtų biologinių makromolekulių radikalais, užfiksuoja potencialius makromolekulių pažeidimus, taip apsunkindamas pažeidų atitaisymą (reparaciją) (Al-Arifx 2003; Kesavan 2005). Be deguonies, radiojautrumą didinančiomis savybėmis pasižymi lipidų peroksidacijos produktai. Priešingą poveikį turinčioms, t.y, radioatsparumą didinančioms medžiagoms priskiriami tioliai, histaminas, serotoninas, adrenalinas, noradrenalinai, citokinai (Singh & Yadav 2005).

Be to, jautrumui JS gali turėti įtakos ne tik įvairūs aplinkos faktoriai, bet ir pačių ląstelių savybės. Žinoma, kad ląstelių jautrumas JS priklauso nuo medžiagų apykaitos procesų intensyvumo, išsivystymo stadijos, diferenciacijos, dalijimosi intensyvumo. Atsižvelgiant į tai jautriausiomis laikomos kamieninės kaulų čiulpu, lytinės ir virškinamojo trakto gleivinės ląstelės, o atspariausiomis – nervinio, raumeninio ir kaulinio audinio bei kepenų ląstelės (ICRP 2007).

Manoma, kad svarbiausias JS taikynys ląstelėje yra DNR molekulė. Daugelio tyrimų rezultatai parodė, kad JS gali sukelti viengrandžius ir dvigrandžius DNR trūkius, DNR bazių pakeitimus, kurie savo ruožtu gali nulemti genų raiškos pokyčius ir kaip pasekmė ląstelės funkcijų kontrolės praradimą (Shirley et al. 1992). Tačiau, ląsteles ir jos organeles, gaubiančios membranos sudaro ne tik barjerą JS pasiekti DNR molekulę, bet ir yra pirminis JS poveikio ląstelei taikynys (Koteles 1982). JS sukeliama oksidaciniai procesai biologinėse membranose sustiprina pirminius pažeidimus ir gali iššaukti negrįžtamą ląstelės membranos struktūrų, oksidacinę degradaciją ir galiausiai ląstelės žūtį. Tikriausiai, todėl ląstelių apsaugą nuo JS poveikio daugiausia užtikrina laisvuosius radikalus surišančios molekulės, superoksidodismutazė (SOD), katalazė, peroksidazė (Mitchell et al. 1991). Lipidų oksidacinė degradacija yra pagrindinė membranų lipidų ir lipoproteinų pažeidimo

priežastis. Vandens radiolizės sukurti radikalai modifikuoja polinesočiasias riebalų rūgštis, ir skatina grandininę reakciją kurios metu atsiranda dar daugiau įvairios sudėties oksiduotų lipidų produktų (LaVerne 2000). JS poveikyje gali kisti ir baltymų amino rūgščių sudėtis, erdvinė struktūra ir funkcijos (Raleigh et al. 1977). Remiantys tyrimų rezultatais su antibiotiku amfotericinų B ir nistatinu buvo nustatyta, kad membranos takumo, ją sudarančių baltymų ir lipidų kitimas turi tiesioginį poveikį jos pralaidumui ir jonų pernašos sistemų aktyvumui. Buvo parodyta, kad membranoje esantys jonų kanalai pasižymi dideliu jautrumu JS ir gali būti visiškai inaktyvuojami 1cGy rentgeno spinduliuotės, be to poveikis kanalų laidumui didėjo mažėjant JS dozei (Barth & Stark 1993). Tai savo ruožtu, gali įtakoti gyvybiškai svarbius ląstelių funkcijas, susijusias su elektrocheminės pusiausvyros palaikymu ir signalų perdavimu tarp ląstelių. Buvo parodyta, kad didelės JS dozės augalų ir gyvūnų ląstelėse gali modifikuoti membranų elektrines savybes (Doughty & Hope 1973; Baisch & Bluhm 1978; Gillet 1965). Švitinant menturdumblių *Nitella* ląsteles didelės dozės α dalelėmis, gali būti sukelti savaiminiai veikimo potencialai (Geffey 1972). Taip pat buvo parodyta, kad dėl didelių dozių rentgeno ar γ spindulių poveikio, menturdumbliuose stebima membranos ramybės potencialo depoliarizacija membranos varžos sumažėjimas bei veikimo potencialo trukmės padidėjimas (Esch 1966). Šie bioelektrinio aktyvumo pokyčiai gali būti sąlygoti JS sukeltų membranų struktūrinių persitvarkymų. Kadangi ląstelių membranų elektrinės savybės apsprendžia daugelį jos atliekamų funkcijų, jų pokyčiai gali turėti įtakos visiems ląstelėje vykstantiems fiziologiniams procesams.

Tačiau nepaisant turimų duomenų apie galimus JS biologinio poveikio mechanizmus įvairiuose gyvū organizmų organizaciniuose lygiuose, vis dar nėra iki galo aišku, kokie molekuliniai ir ląsteliniai procesai vyksta organizmuose, juos veikiant mažomis JS dozėmis.

2.1.2 Mažų jonizuojančiosios spinduliuotės dozių poveikio ypatumai

Pastaraisiais metais mokslininkai ypatingą dėmesį skiria mažų jonizuojančiosios spinduliuotės dozių poveikio tyrimams. Vis labiau suvokiama, kad ne vien radiologinės avarijos kelia didelę grėsmę, bet kelia pavojų ir vis didėjanti technogeninė aplinkos tarša dėl žmogaus kasdienės veiklos, nulemti ūminį mažų JS dozių poveikį organizmui. Ilgą laiką buvo manoma, kad iki tam tikro slenksčio JS neturi neigiamo poveikio organizmui, vėliau šią teoriją pakeitė tiesinis beslenkstinis modelis, paneigiantis slenkstinės dozės žemiau kurios poveikio nėra, egzistavimą, o mažų JS dozių sukeltų reiškinių vertinimas remiasi didelių ar vidutinių dozių sukeltų reiškinių tyrimų rezultatų ekstrapoliacija. Radiobiologinių tyrimų rezultatai parodė, kad mažos JS dozės gali sukelti tokius specifinius atsakus, kaip adaptacija, gretutiniai reiškiniai, genomo nestabilumas, apoptozė, padidėjęs jautrumas aplinkos veiksniams, kurių mechanizmų aiškinimui netinka tiesinės dozės atsako priklausomybės modelis (Mothersill et al. 2009), nes šiuose reiškiniuose dalyvauja kiti molekuliniai mechanizmai, negu atsakuose į dideles JS dozes (Zhizhina 2011). Nustatyta, kad ląstelių membranos yra kritiniai mažų JS dozių taikiniai. Mažų dozių JS sukelti membranos reguliatorinių funkcijų, lipidų antioksidacinio aktyvumo pokyčiai pasižymi dozės atsako netiesine bimodalią priklausomybę, t.y esant labai mažoms dozėms buvo stebimas stiprius poveikis šiems parametrams, didėjant dozėms poveikis silpnėjo, o paskui augant dozei vėl didėja įgaunant beveik tiesinę dozės atsako priklausomybę (Burlakova 1995).

Nustatyta, kad mažos JS dozės gali moduluoti genų raišką. Buvo parodyta, kad apšvitą mažomis dozėmis (2 cGy) žmogaus fibroblastuose aktyvina grupę genų, atsakingų už tarpląstelinį signalų perdavimą (GRAP2 ir GPR51) ir DNR pažaidas, tuo tarpu į apšvitą didelėmis JS dozėmis (4 Gy) reaguoja genai, dalyvaujantys ląstelių proliferijoje ir apoptozėje. Skirtingų genų raišką atsakant į mažų ir didelių dozių JS apšvitą gali iš dalies paaiškinti biologinio poveikio ir dozės netiesišką priklausomybę mažų JS dozių intervale lyginant su dozės atsako dėsniniais esant didelėms JS dozėms (Ding et al.

2005). Esant labai mažoms JS dozėms, jų sąlygotų ląstelės pažaidų gali nepakakti tam, kad būtų aktyvuojamos reparacijos sistemos ir tada gali įsijungti signalo sustiprinimo mechanizmai (kinazinės kaskados) arba signalas gali būti perduotas nepaveiktoms ląstelėms. Buvo nustatyta, kad, ląstelės, esančios greta apšvitintų ląstelių, arba patekusios į išorinę terpę kur prieš tai buvo apšvitintos ląstelės, taip pat gali reaguoti į radiacijos poveikį. Jos pradeda elgtis taip, tarsi jos pačios buvo švitinamos. Toks fenomenas vadinamas gretutiniaisiais reiškiniais (angl. RIBE - radiation induced bystander effect) (Furlong 2013). Yra sukaupta nemažai duomenų apie radiacijos sukeltus gretutinius reiškinis skirtingo organizacinio lygio gyvūnų ir žmogaus modelinėse sistemose (Morgan & Sowa 2013). Todėl šis fenomenas pripažintas kaip plačiai pasireiškiantis mažų jonizuojančiosios spinduliuotės dozių biologinis poveikis (Mothersill et al. 2005). Biologinis RIBE pasireiškimas daugiausiai siejamas su genetinėmis pažaidomis, chromosomų aberacijomis, mutacijomis, mikrobranduolių formavimusi ir kitais genų raišką įtakančiais procesais, kurie gali tapti neapšvitintos ląstelės proliferacijos, senėjimo ir mirties priežastimi. RIBE mechanizmas nėra iki pakankamai išaiškintas, tačiau yra siūlomi du šio fenomeno atsiradimo aiškinimo būdai: 1) informacija apie radiacijos sukeltus padarinius apšvitintoje ląstelėje gali būti perduodama jos artimoje aplinkoje esančioms neapšvitintoms ląstelėms specifinėmis signalinėmis molekulėmis, patekusiomis iš apšvitintos ląstelės į išorinę terpę; 2) signalas iš apšvitintos ląstelės nepašvitintoms gali būti perduodamas tiesiogiai per tarpląstelines jungtis (European Commission 2008). Gretutinių reiškinų fenomenas daugiausiai siejamas su ROS (Morgan et al. 2013; Zemp et al. 2012), Ca^{2+} ir MAP kinazės signalinių kelių aktyvavimu (Lyng et al. 2006).

Buvo parodyta, kad mažos JS dozės įvairiuose organizmuose, įskaitant ir augalus, kartais gali turėti ir teigiamą poveikį (reiškinys vadinamas radiacine hormeze) sąlygodamos gyvenimo trukmės padidėjimą, skatindamos augimą, dauginimąsi ir kitus gyvybiškai svarbius procesus (Scott 2008). Švitinant paprastųjų kukurūzų (*Zea mays*) sėklas uždaru radioaktyvaus stroncio izotopo

(Sr 90) šaltiniu β spinduliuotės dozių intervale 0.12 – 0.2 Gy, buvo pastebėta, kad apšvita iki 0.6 Gy turėjo stimuliuojantį poveikį augalo audimui, tuo tarpu sėklų apšvita 0.6 – 1.2 Gy slopino augimo procesą (Chicea 2007). Manoma, kad tai galėtų būti, vienas iš adaptacinio atsako į mažas JS dozes išraiškos būdų (Marcu 2009). Kitas svarbus aspektas susijęs su mažu JS dozių poveikio vertinimu - JS sąveika su cheminiais, ekologiniais ar kitais aplinkos veiksniais. Kitų stresinių faktorių sukeltas biologinis poveikis gali būti modifikuojamas dėl mažų dozių JS poveikio. Nustatyta, kad mažą dozės galia sukuriiančio HTO ir vario bendras veikimas pasižymėjo sinergetiniu poveikiu ROS gamybai vienaląsčiuose dumbliuose *Chlamydomonas reinhardtii*. Autorių teigimu, šis sinergetinis poveikis gali būti aiškinamas nustatytu beveik 4 kartus intensyvesniu vario pasisavinimu esant HTO aplinkoje. Gauti rezultatai leido tyrėjams daryti prielaidą, kad tritis gali būti laikomas sensibilizatoriumi sąveikoje su kitais aplinkos veiksniais (Rety et al. 2010). Taip pat buvo nustatytas JS ir CdCl_2 sinergetinis poveikis gliukozės metabolizmui: parodyta, kad, dėl bendro γ spinduliuotė ir kadmio chlorido veikimo ženkliai sumažėja gliukozės koncentracija broilerio viščiukų (*Gallus gallus*) serume, lyginant su atskiru CdCl_2 ar JS poveikiu gliukozės metabolizmui (Daňová et al. 2010). Tyrimais su žmogaus fibroblastų ląstelėmis (hTERT) taip pat buvo parodytas sinergetinis mažų dozių JS ir sunkiųjų metalų (chromo jonų) poveikis genomo stabilumui. Autoriai parodė, kad dėl γ spinduliuotės (0.05 – 0.5 Gy) ir Cr (IV) bendro veikimo klonogeninio ląstelių išgyvenamumo mažėjimas buvo ženkliai didesnis negu buvo sąlygotas pavienio JS ar Cr (IV) poveikio, siejant tai su intensyvesne ROS gamyba suminio poveikio atveju (Glaviano et al. 2009). Sinergetinis mažų dozių JS ir sunkiųjų metalų poveikis laisvųjų radikalų kaupimuisi įvairiuose žiurkių organuose ir audiniuose: bendras Cu^{2+} arba Co^{2+} ir 0.25 Gy apšvitos poveikis sąlygojo didesnę laisvųjų radikalų kiekį tirtuose preparatuose negu sunkieji metalai ar JS veikdami atskirai (Anan'eva et al. 2000). Be to, nustatyta, kad mažos JS dozės gali silpninti augalų atsparumą virusinėms ir grybelinėms infekcijoms, galimai dėl nustatyto JS slopinančiu poveikiu proteazių inhibitoriams (tripsinui, chimotripsinui) (Dmitriev et al.

2009). Taip pat buvo parodyta kviečių sėklų veikimas mažomis β spinduliuotės dozėmis ($0.4 - 0.5 \mu\text{Gy val}^{-1}$ dozės galiomis nuo 90 kBq aktyvumo Sr90 šaltinio) sąlygoja kviečių daigų atsparumo osmosiniam stresui sumažėjimą (Орлова и др. 2009). Vertinant elektrinio potencialo skirtumą tarp kviečių daigų šaknų ir ūglio, autoriai pastebėjo teigiamą koreliaciją tarp elektrinio potencialo skirtumo sumažėjimo ir išgyvenamumo trukmės osmosinio streso sąlygomis sumažėjimo kviečių daiguose išaugintuose iš apšvitintų sėklų.

Mažų JS dozių poveikio sukeliama padidėjusio ląstelių jautrumo, genomo nestabilumo, hormezės, adaptacinio atsako ir gretutinių reiškinių tyrimų rezultatai parodo reikšmingus skirtumus tarp mažų ir didelių JS dozių biologinio poveikio išraiškos. Tačiau mažų JS dozių poveikis dar nėra iki galo ištirtas, nėra surinkta pakankamai duomenų, leidžiančių vienareikšmiškai paaiškinti mažų dozių JS sukiamų padarinių mechanizmus.

2.1.3 Biotos apšvitos vertinimo ir radiacinės saugos aspektai

Ilgą laiką pasaulyje buvo laikomasi nuostatos, kad žmogaus radiacinės saugos principai užtikrina pakankamą faunos ir floros apsaugą nuo žalingo jonizuojančiosios spinduliuotės poveikio. Tačiau, atsižvelgiant į tai, kad žmogaus ir biotos apšvitos sąlygos atskirais atvejais gali skirtis, tarptautinė radiacinės saugos bendruomenė peržiūrėjo galiojančią nuostatą. 1992 metais Tarptautinė atominės energijos agentūra pateikė pirmą savo ataskaitą apie jonizuojančiosios spinduliuotės poveikį augalams ir gyvūnams (IAEA, 1992) bei tais pačiais metais Jungtinių Tautų Aplinkos ir Plėtros konferencijoje buvo pasirašyta Rio Deklaracija, kurioje buvo suformuluota koncepcija, kad jonizuojančiosios spinduliuotės poveikis biotai ir apsaugos nuo jos principai turi būti nagrinėjami atskirai nuo žmonių radiacinės saugos. Tarptautinė radiologinės saugos komisija (ICRP) 2003 metais pripažino, kad būtina sukurti vieningą, mokliškai pagrįstą apšvitos dozių, dozės atsako priklausomybės, radiacinių efektų vertinimo koncepciją, skirtą gyvajai gamtai atskirai nuo žmogaus (ICRP 2003). Paskutinius dešimtmečius tarptautinės organizacijos TATENA, ICRP, Jungtinių Tautų mokslinis komitetas atominės radiacijos

efektams tirti (UNSCEAR), specialiai sukurtos mokslininkų darbo grupės daug dėmesio skiria biotos apsaugos nuo jonizuojančiosios spinduliuotės problemoms spręsti. Šioje srityje jau yra nemažai nuveikta. Europos Sąjunga nustatė rekomenduojamą didžiausią leistiną jonizuojančiosios spinduliuotės dozės galią ($10 \mu\text{Gy h}^{-1}$), mažiau kurios apšvitos poveikis biotai gali būti laikomas nereikšmingu. Yra atrinktos standartizuotųjų augalų ir gyvūnų, atstovaujančių pagrindines ekosistemas, grupės. Šie standartizuotieji organizmai traktuojami kaip hipotetiniai objektai su tiksliai apibrėžtomis, sandaros, fiziologinėmis ir elgsenos savybėmis (ICRP 2008). Remiantis šių organizmų modeliais sukurtos biotos apšvitos vertinimo programiniai paketai RESRAD-BIOTA (JAV), ERICA (Europa), FASSET (Europa), Environment Agency 'R&D 128'(Anglija), Atomic Energy Canada Limited approach, ECOMOD (Rusija), SCK-CEN approach, EDEN (Prancūzija), EPIC-DOSES3D (Europa), SÚJB approach (Čekija), LAKE EKO (Nyderlandai), DosDiMEco (Belgija), D-Max(DB). Vienaip ar kitaip šios programos, turinčios sąsajas su įvairiomis duomenų bazėmis, įgalina įvertinti sausumos, gėlavandenės, jūrinės ekosistemų standartizuotųjų organizmų tikėtinas vidinės, išorinės ir suminės apšvitos dozės galias, atsižvelgiant į jų geometrijos ir gyvensenos ypatumus, moduluojant atskirų radionuklidų aktyvumų koncentracijas organizmo viduje ir išorėje bei kitus įvesties parametrus (IAEA 2012). Sukurti tarptautinių organizacijų biotos apšvitos nuo jonizuojančiosios spinduliuotės vertinimo programos suteikia pagrindą kuriant ir įgyvendinant biotos apšvitos vertinimo ir radiacinės saugos infrastruktūrą atskirose šalyse. Tačiau, siekiant kuo tiksliau apibrėžti biotos apsaugos nuo žalingo jonizuojančiosios spinduliuotės poveikio gaires savo teritorijoje, kiekviena šalis suformuluotas tarptautines rekomendacijas, turi adaptuoti taikant geografines, klimato, ekologines ir kitas vietines sąlygas atitinkančius vertinimo parametrus. Lietuvoje jau yra sukurta, įteisinta ir įdiegta kompiuterinė programa LIETDOS-BIO, skirtas branduolines energijos gamybos ir radioaktyviųjų atliekų tvarkymo objektų veiklos poveikio zonoje

esančios biotos apšvitos vertinimui. Šios programos pagalba buvo atliktas IAE aušinimo baseino biotos apšvitos įvertinimas (Nedveckaitė et al. 2010).

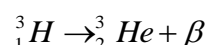
Nepaisant didelio progreso biotos apšvitos vertinimo srityje, iki šiol biotos radiacinė sauga nėra griežtai reglamentuojama. Pagrindinė to priežastis – nepakankama atsižvelgiant į biotos bioįvairovę, faktinių duomenų bazė apie jonizuojančiosios spinduliuotės poveikį skirtingoms gyvūnų ir augalų rūšims, ypač turint omenyje mažų dozių poveikį. Todėl išlieka būtinybė ištirti jonizuojančiosios spinduliuotės poveikį kuo didesniai gyvos gamtos atstovų skaičiui skirtingo organizuotumo lygiuose ir taikant įvairius tyrimo metodus. Menturdumblių kaip testinių organizmų elektrofiziologinių atsakų į jonizuojančiosios spinduliuotės poveikį tyrimai galėtų papildyti mokslinių duomenų apie radioaktyvios taršos poveikį aplinkai bazę, reikalinga efektyviam biotos apšvitos vertinimo parametrų ir kriterijų nustatymui.

2.2. Tričio fiziko-cheminės savybės ir biologinis poveikis

2.2.1. Tričio fiziko cheminės savybės

Tritis yra svarbus radionuklidas biologiniu ir ekologiniu požiūriu. Jį atrado Rezerfordas 1930 metais. Natūraliai gamtoje nenutrūkstant tričio sintezė vyksta dėl kosminės spinduliuotės ir atmosferos cheminių elementų sąveikos sąlygojamų branduolinių reakcijų. Tričio koncentracija biosferoje didėja dėl branduolinės energetikos vystymosi ir branduolinių ginklų panaudojimo. Todėl pastaruoju metu, daug dėmesio skiriama tričio fiziko-cheminių savybių tyrimams, jo patekimo, pasiskirstymo ir migracijos biologiniuose objektuose dėsningumą nustatymui bei biologinio poveikio mechanizmų išaiškinimui .

Tritis yra radioaktyvus vandenilio izotopas. Skildamas jis skleidžia mažos energijos beta daleles ir pavirsta helio izotopu:



Tričio skleidžiamos β spinduliuotės maksimali energija yra 18 keV, skilimo pusperiodis sudaro 12.34 metų (Lucas & Unterweger 2000). Biosferoje

trititis egzistuoja tritinto vandens (HTO), tričio vandenilio (HT) ir tričio metano (CH₃T) formomis. Didžioji dalis tričio pavirsta HTO pakeičiant vandenilio atomus vandens molekulėje ir įsijungia į vandens apykaitos ciklą biosferoje. HTO pasižymi didžiausiu biologinių aktyvumu, lyginant su kitomis jo formomis. Bendrai yra priimta, kad vandenyje 10¹⁸ stabilių vandenilio atomų tenka vienas tričio atomas. Tokia tričio aktyvumo koncentracija dar vadinama tričio vienetu TV (angl. TU): 1 TV = 0.118 Bq L⁻¹. Tričio vienetais gali būti išreiškiama tričio koncentracija gyvosios aplinkos objektuose. Manoma, kad natūraliai, žalingo poveikio neturinti tričio koncentracija vandens organizmuose yra 1-5 Bq L⁻¹ (8-42 TV). Norint išreikšti tričio kiekį gramais, naudojamas atitinkamas aktyvumo ir masės santykis: 1g tričio atitinka 3.58 x 10¹⁴ Bq aktyvumą. 2008 metų duomenimis, pasaulyje bendras tričio kiekis, tolygiai pasiskirstęs tarp vandenyno, kontinentinių vandens telkinių ir atmosferos sudarė 40 kg (Boyer et al. 2009). Lietuvoje Radiacinės saugos centro 2012 metų radiologinės stebėsenos duomenimis tričio aktyvumo koncentraciją geriamajame ir gruntiniame vandenyje buvo ~3.6 Bq L⁻¹, kas yra daug mažiau negu nustatytas leistinas tūrinio aktyvumo lygis geriamajame vandenyje 100 Bq L⁻¹. Tuo tarpų Maišiagalos radioaktyviųjų atliekų kapinyno teritorijoje esančiame gręžinyje Nr. 4 2012 m. išmatuotas tričio turinis aktyvumas yra 1.1 kBq L⁻¹, o 2005 m. tričio tūrinis aktyvumas šiame gręžinyje siekė 22 kBq L⁻¹. Manoma, kad toks tričio tūrinio aktyvumo sumažėjimas yra apspręstas tričio išplovimo į aplinką po rekonstrukcijos darbų (Radiation protection Centre 2012).

2.2.2 Tričio biologinis poveikis ir citotoksiškumas

Didesnės tričio koncentracijos aplinkoje veikia gyvybines organizmo funkcijas ir sąlygoja rimtus sutrikimus jų vystymesi (Galeriu et al. 2013). Tritis yra sunkiausias vandenilio izotopas. Izotopų frakcionavimo (izotopo ir stabilaus elemento pasiskirstymas) biologiniame objekte pagrindą sudaro yra ryšių stiprumo tarp lengvų ir sunkių tam tikro elemento izotopų skirtumas: sunkesniems izotopams būdingi stipresni ryšiai ir mažesni reakcijų greičiai.

Tyrimais *in vivo* ir *in vitro* buvo parodyta, kad tritis vandens formoje patekęs į organizmą gali labai greitai pakeisti vandenilį pirminiuose biopolimerų struktūrose ir vėliau yra pernešamas į jų antrines ir tretines struktūras. Intensyvus vandenilio atomų pakeitimas tričiu DNR vandens apvalkalo molekulėse ir pačios DNR vandeniliniuose ryšiuose buvo parodytas *in vitro* tyrimuose veikiant HTO DNR molekules, išskirtas iš žuvų lytinių ląstelių (Baumgartner & Kim 2000). *In vivo* eksperimentais buvo parodyta, kad tričio pasisavinimas augalo audiniuose yra intensyvesnis už vandenilio pasisavinimą bei tričio akumuliacija gyvo organizmo, nuolat sintetinančio biomolekules, audiniuose turėtų prasidėti iškart po poveikio HTO (Baumgärtner et al. 2001). Šis reiškinytis autorių aiškinamas tuo kad, tritono/protono mainų procesas yra mikrosekundžių eilės tuo tarpų, biopolimerų (pvz. baltymų) biosintezė yra milisekundžių eilės, todėl didelis tričio kiekis gali būti aptinkamas silpnuose vandeniliniuose ryšiuose biologinėse molekulėse. Kadangi tritono protono mainuose termodinaminė pusiausvyra pasiekama greičiau negu vyksta metabolinės sintezės ir fotosintezės procesai, taip yra atsveriamas kinetinio frakcionavimo užvelinimas dėl masių skirtumo tarp tričio ir vandenilio. Todėl galima daryti išvada, kad augaluose *in vivo* tričio ir vandenilio mainai nepaklusta kinetinio izotopų frakcionavimo dėsniai ir izotopų masių skirtumas vandenilio pakeitime tričiu gali būti nepaisomas. Tokiu būdu tričio kaip vandenilio izotopo cheminis elgesys tapatus vandenilio, todėl jis gali pakeisti vandenilį visuose junginiuose su deguonim, anglim, azotu, lengvai prasiskverbia į visų ląstelių citoplazmą ir gali įeiti į daugelio organinių ir biologiškai svarbių junginių sudėtį (Baumgärtner et al., 2001). Jo skleidžiamos mažos energijos β spinduliuotė pasižymi dideliu jonizacijos tankiu biologiniuose objektuose ir gali paveikti genetinį ląstelių aparatą. Nustatyta, kad tritis sukelia 10-30 kartų daugiau jonizacijos atvejų objekto tūrio vienetu negu rentgeno arba γ spinduliai (Moskalev et al. 1973). Eksperimentuose su bestuburiais *Ophryotrocha diadem*, buvo nustatyta, kad esant vienoda γ (nuo ^{137}Cs) ir β (HTO .24 MBq ml⁻¹) spinduliuotės dozės galiai (7.3 $\mu\text{Gy val}^{-1}$) sumažėja išsiritusių lervų skaičius, tačiau dėl HTO ženkliai sumažėjo kiaušinių

išgyvenamumas, tuo tarpu γ spinduliuotė nesukėlė poveikio kiaušinių išgyvanamumui (Knowles & Greenwood 1997). Maksimali tričio β spinduliuotės skvarba ore yra 5.8 mm, tuo tarpu biologiniame audinyje - tik 6.5 μm ir yra visiškai sugerama, pvz., raginio odos sluoksnio. Tokiu būdu, manoma, kad išorinė tričio apšvita nepavojinga organizmui, tuo tarpu tritis, patekęs į organizmo vidų ir susijungęs su kitomis organinėmis molekulėmis, kelia rimtą radiologinį pavojų. Tričio spinduliuotės įveikiamas atstumas yra žymiai mažesnis už ląstelių geometrinius matmenis, todėl jo poveikis lokalizuojasi šalia paties radioizotopo, o bendras poveikis priklauso nuo jo pasiskirstymo ląstelėje ir audinyje. Biologinį tričio poveikį sustiprina jo skilimo metu susidarantis helio izotopas (He^3), sąlygojantis vandenilinių ryšių DNR molekulėse nutrūkimą, organinių struktūrų sintezės procesų sutrikdymus bei įvairius pokyčius genetiniame lygmenyje. Biologiniuose objektuose HTO dalinai virsta organiškai surištu tričiu (angl. OBT – organically bound tritium). OBT susidarymas priklauso nuo daugelio faktorių: aplinkos apšvietimo, temperatūros, organizmo amžiaus ir gebėjimo vykdyti fotosintezę (Bradshaw et al. 2013; Pietrzak et al. 1984). OBT akumuliacijos koeficientas yra žymiai didesnis už HTO (Бондарева 2011). Pavyzdžiui, žinoma, kad kai augalas perkeliams į aplinką, kurioje nėra tričio, HTO labai greitai gali būti pašalintas iš jo. Buvo parodyta, kad augalų lapai praranda pusę HTO kiekio (biologinio pusėjimo trukmė) per pusvalandį dienos metu, o tamsiu paros metu HTO biologinio pusėjimo trukmė padidėja iki 6 – 7 valandų (Galeriu et al. 2013). OBT yra kenksmingesnis biologiniu požiūriu už HTO (Little & Lambert 2008). Tyrimuose su dvigeldžius moliuskais *Mytilus edulis* buvo parodyta, kad paveikiant hemolimfos mėginius HTO ($3.7 - 147 \text{ MBqL}^{-1}$ aktyvumo koncentracijos, nulemiančios 12 - 485 $\mu\text{Gy val}^{-1}$ JS dozės galią) buvo nustatyta kad, dėl HTO hemocituose didėja mikrobranduolių susidarymo dažnis ir viengrandžių DNR trūkių skaičius, o poveikis didėja didėjant HTO dozei ir švitinimo trukmei (Jha et al. 2005). Kituose tyrimuose su dvigeldžiais moliuskais, remiantis mikrobranduolių susidarymo hemocituose dažnio analizę buvo nustatyta, kad tiek HTO ($24 - 37 \text{ MBqL}^{-1}$ aktyvumo koncentracijomis,

apsprendžiančiomis 79 - 122 $\mu\text{Gy val}^{-1}$ JS dozės galią) tiek tritinas glicinas (aktyvumo koncentracija 1.48 MBqL^{-1} nulemiančią 4.9 $\mu\text{Gy val}^{-1}$ JS dozės galią) taip pat padidina mikrobranduolių kiekį hemocituose tačiau tritintas glicinas pasirodė 15 kartų genotoksiškesnis už HTO ir pasižymėjo didesne bio - akumuliacija DNR negu HTO (Jaeschke et al. 2011). Tričio biologinio elgesio tyrimas augaluose, yra svarbus tuo, kad fotosintezė atlieka svarbų vaidmenį OBT susidaryme (Kim et al. 2013), o fotosintezės proceso metu susidariusios organinės medžiagos, vėliau per ekosistemų medžiagų apykaitos ciklus gali patekti ir į žmogaus organizmą (Melintescu & Galeriu 2011). Nustatyta, kad, vienodomis apšvitos HTO sąlygomis (3 min) bet esant skirtingam apšvietimui, augaluose susidarančio OBT kiekiai ženkliai skiriasi: intensyvaus apšvietimo sąlygomis OBT pasigamina 90 % daugiau nei tamsoje. Intensyviausia tričio sąveika su organizmais stebima kai tritis yra HTO formoje (Turner et al. 2009). Tritis kaip JS šaltinis gali veikti organizmą ne tik tiesiogiai, bet ir netiesiogiai per vandens radiolizę sukurdamas laisvuosius radikalus ir ROS, kurie yra kenksmingi gyviems organizmams. Tiriant HTO poveikį vienaląsčio dumblio *Chlamydomonas reinhardtii* augimui ir ROS gamybai, buvo nustatyta, kad paveikus ląstelių kultūras 59 MBq ml^{-1} HTO 23 % sumažėjo ląstelių tankis, tuo tarpu 0.9 MBq ml^{-1} HTO sukėlė ląstelių tanko padidėjimą 15 %. Autoriai taip pat parodė, kad veikiant ląstelių kultūras HTO (0.04 – 59 MBq mL^{-1} nulemiančius apšvitos dozės galias atitinkamai 0.13 – 194 $\mu\text{Gy val}^{-1}$) jau po 15 minučių nuo veikimo pradžios buvo stebima padidėjusi ROS gamyba, pasižymėjusia teigiama koreliacija su suteiktą HTO doze. Šie rezultatai parodo būtinumą tolimesnių HTO poveikio tyrimų esant β spinduliuotės dozės galiai $< 10 \mu\text{Gy val}^{-1}$, kuriai esant siūloma laikyti JS poveikį vandens biotai nereikšmingu (Rety et al. 2010). Augaluose, tričio patekimas, pasiskirstymas ir biologinis elgesys priklauso nuo juose esančio vandens kiekio ir apykaitos. Japonų tyrėjai parodė, kad tričio pasiskirstymas paprastosios pušies metinėse rievėse atspindi atitinkamų metų tričio koncentraciją gruntiniame vandenyje, kuris buvo prieinamas medžio mitybai (Yamada et al. 1989). Kitų tyrimų rezultatai parodė, kad, kerpės gali būti naudojamos kaip biomarkeriai

kiekybinių tričio išmetimo į aplinką iš branduolinio kuro ciklo objektu, nes tričio koncentracija kerpėse atspindėjo tričio kiekį atmosferos vandens garuose (Daillant et al. 1996).

Pagrindiniais tričio išleidimo į aplinką šaltiniais laikomi branduolinio kuro ciklo objektai (Jeffers & Parker 2014), todėl tritis yra vienas svarbiausių gyvenamos aplinkos apšvitos šaltinių, šių objektų aplinkoje esančiose teritorijose (Jakimavičiūtė-Maselienė et al. 2003). Ir toliau pasaulyje besivystanti branduolinė energetika sąlygoja poreikį nuolat vykdyti tričio ekologinę stebėseną. Tričio biologinio poveikio mechanizmų įvairių ekosistemų elementuose supratimas yra būtinas siekiant įvertinti jo keliamą riziką žmogui ir aplinkai, o augalų modelinės sistemos galėtų būti efektyviai panaudojami šių mechanizmu tyrimui.

2.3 Menturdumblių panaudojimas ekotoksikologiniuose tyrimuose

Menturdumbliai, dėl jų struktūrinių ir fiziologinių savybių, didelio jautrumo daugeliui aplinkos faktorių, nesudėtingo ir nebrangaus kultivavimo laboratorinėmis sąlygomis, yra plačiai naudojami ne tik ląstelėje vykstančių biologinių procesų išaiškinimui (Shimmen et al. 1994), bet ir aplinkos poveikio tyrimuose. Literatūroje randama duomenų apie dar XX amžiaus pradžioje atliktus tyrimus, kuriuose menturdumbliai *Nitella* pasitelkiami siekiant įvertinti skirtingų cheminių medžiagų ir mikroorganizmų toksinį poveikį ląstelės protoplazmai *in vivo* (Barber 1911). Iki šiol pasaulyje menturdumbliai intensyviai naudojami vandens kokybės (Lambert & Davy 2011; van der Welle et al. 2006) bei sunkiųjų metalų toksiškumo tyrimuose (Asaeda & Zaman 2013). Sukaupta nemažai duomenų apie aliuminio (Takabatake & Shimmen 1997), vario (Demidchik et al. 2001), kobalto (Musayev & Ismailov 2007) įvairių pesticidų (Crum & Leistra 1999; Юрин & Дитченко 2009) toksiškumo, taip pat klimato (Rip & Outbater 2007), druskingumo (Shepherd et al. 2008; Shepherd et al. 2002; Davenport et al. 1996), temperatūros ir vandenilio potencialo (pH) pokyčių (Demidchik et al. 2001; Vieira 2003) poveikį menturdumbliams.

Lietuvoje menturdumbliai taip pat naudojami kaip biotestai ekotoksikologiniuose tyrimuose (Kisnierienė & Sakalauskas 2007a; Kisnierienė & Sakalauskas 2005). Tyrimais buvo nustatyta, kad *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinių ląstelių membranos potencialų skirtumo abipus membranos sumažėjimas daugiau ne per pusę, praėjus 45 minutėms nuo stresinio faktoriaus veikimo pradžios, stipriai koreliuoja su ląstelių mirtingumu nustatomu po 96 valandų ekspozicijos (Manusadzianas & Vitkus 1999; 1995). Šie rezultatai parodo, kad menturdumblių membranos depoliarizacija yra tinkamas rodiklis (EC_{50} – toksinės medžiagos koncentracija, kuri per 45 min sukelia potencialo skirtumo abipus membranos sumažėjimą (ramybės potencialo depoliarizacija) 50 %) vertinant aplinkos veiksnių toksiškumą ir nustatant stresinių faktorių toksines dozes, todėl *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinių ląstelių membranos depoliarizacijos vertinimu ir grindžiamas patentuotas Charatox testas skirtas įvairių aplinkos veiksnių toksiškumo nustatymui (Bartusevičienė B 2003; Manusadzianas et al. 2003; Manusadzianas et al. 2012). Be to, sunkiųjų metalų, nano dalelių, alochtoninių stresorių toksiškumo nustatymui pasitelkiamas ne tik bioelektrinis bet ir fermentinis aktyvumas *Nitellopsis obtusa* ląstelėse (Grigutytė et al. 2009; Jurkoniene et al. 2004; Manusadzianas et al. 2002). Šie menturdumbliai taip pat naudojami ir vandens ekosistemos apšvitos vertinimui (Nedveckaitė & Marciulionienė 2009), radioekologiniuose tyrimuose vertinant radionuklidų kaupimąsi tiek visoje ląstelėje, tiek ir atskirose jos organelėse (Marčiulionienė 2003), bei yra įtraukti kaip standartizuotieji organizmai į Lietuvos teritorijai adaptuotą biotos apšvitos dėl radioaktyviosios taršos vertinimo LIETDOS-BIO programą.

Apibendrinant literatūros šaltinių duomenis galima teigti, kad menturdumbliai yra išties unikali modelinė sistema aplinkos poveikio vertinimui ir *in vitro* ir *in vivo*. Elektrofiziologiniai menturdumblių tyrimai, savo ruožtu suteiktą galimybę tirti stresinių faktorių, kartu ir jonizuojančiosios spinduliuotės, poveikį *in vivo* realiu laiku ir beveik natūraliomis vandens

organizmams sąlygomis, nes jie atliekami vandeninėje terpėje, o reakcija gali būti registruojama iškart po stresoriaus patekimo į biotesto aplinką.

2.4 Augalinių ląstelių bioelektrocheminė sistema

2.4.1 Augalinių ląstelių jonų pernašos sistemos

Jonų pernašos sistemos - tai neatskiriama visų membranų sudedamoji dalis, kadangi jonų transportas per membraną vaidina svarbų vaidmenį palaikant ląstelės gyvybingumą bei formuojant greitą ląstelės atsaką į aplinkos pokyčius. Baltyminės struktūros, formuojančios membranoje kanalus geba užtikrinti įvairių jonų pernašą per membraną dideliu greičiu (10^6 – 10^8 jonų per sekundę). Joniniai kanalai skirstomi pagal laidumą, atrankumą skirtingiems jonams ir pagal vartinį mechanizmą, kurie apibūdina kinetines konkretaus kanalo savybes. Jonų judėjimas kanalu susijęs su energetinio barjero įveikimu, kuris priklauso nuo jono diametro ir hidratacijos energijos, pH, joninės jėgos ir kitų sąlygų, gebančių mažinti aktyvavimo energiją pereinant selektyvųjį filtrą (Maathuis 2004). Kanalai būdami atviroje būsenoje, užtikrina santykinai pastovų jonų srautą iš arba į ląstelę, esant konkrečiam membranos potencialui bei apibrėžtai joninei aplinkai. Augalinėje ląstelėje aptinkami praktiškai visi pagrindiniai joninių kanalų tipai ir vandens pernašos struktūros, esančios gyvūninėje ląstelėje. Augalinės ląstelės gyvybingumo palaikymui bei elektrofiziologinės reakcijos į aplinkos stimulus formavimuisi svarbus yra K^+ , Ca^{2+} , anijonų pernašos sistemos bei jonų siurbliai (Baluška 2013).

Kalio jonų pernaša. Augalai turi unikalią savybę kaupti savyje dideles K^+ jonų koncentracijas (50 – 100 10^{-3} M/1 kg masės), todėl susidaro didžiulis K^+ elektrocheminis gradientas, svarbus potencialų skirtumo abipus membranos palaikymui. Kadangi kalio jonai yra gyvybiškai svarbus augalinės ląstelės homeostazei, augaluose yra gerai išvystyta kalio pasisavinimo ir išlaisvinimo sistema (Dreyer & Uozumi 2011). Šioje kalio jonų transporto sistemoje K^+ kanalai užima dominuojančią poziciją, jų yra praktiškai visuose augalinės ląstelės membraniniuose dariniuose. Sekvenavus *Arabidopsis thaliana* genomą, pavyko nustatyti 15 augalinių kalio kanalų: 9 Shaker tipo K^+ kanalai,

5 TPK tipo dviejų porų K^+ kanalai (two pore K^+ channels) ir vienas K^+ kanalas IRK tipo (angl. inward rectifier potassium channels) (Hedrich 2012). Shaker-tipo K^+ kanalai yra įtampos valdomi ir beveik visi lokalizuoti plazminėje membranoje. Pagal K^+ pernašos kryptį šiuos kanalus galima suskirstyti į įtekančios srovės (angl. *inward*) ir ištekančios srovės (angl. *outward*) K^+ kanalus. 7 Shaker tipo kanalai yra membranos hiperpoliarizacijos aktyvuojami įtekančios srovės kanalai, katalizuojantys kalio transportą į ląstelės vidų. Tuo tarpu 2 Shaker tipo kanalai yra membranos depoliarizacijos aktyvuojami ištekančios srovės K^+_{out} , užtikrinantys kalio transportą iš ląstelės į išorę. Šiai grupei priskiriami SKOR (angl. stelar K^+ outward rectifier) ir GORK (angl. guard cell outward-rectifying K^+ channel) tipo kalio kanalai (Demidchik et al. 2014). Šių tipų kanalai yra lėtai aktyvuojami, gali išbūti ilgą laiką atviroje būsenoje ir jiems nebūdinga inaktyvacija (Johansson et al. 2006). Šie kanalai yra pagrindiniai K^+ ištekančios srovės nešėjai, reguliuojantys ląstelių turgorą, žiotelių varstymąsi, o jų funkcionavimas gali būti moduluojamas Ca^{2+} , ATP ir pH (Krol 2000)

TPK tipo kanalai neturi įtampai jautraus domeno ir gali katalizuoti pastovų K^+ transmembraninį transportą nepriklausomai nuo membranos potencialo reikšmės. TPK1 tipo kanalai lokalizuoti tonoplaste ir yra aktyvuojami Ca^{2+} , o TPK4 tipo kanalai randami plazminėje membranoje (Dunkel et al. 2008)

Augalinių ląstelių gebėjimą kaupti savyje didelius K^+ kiekius apsprendžia kalio jonų transporteriai. Šiai grupei galima priskirti AKT (*Arabidopsis Thaliana* K^+ transporter), KAT1 (K^+ channel from *Arabidopsis Thaliana*) ir KAT2 Shaker-tipo kanalus. Šie kanalai yra jautrūs aplinkos pH (Su et al. 2001). Kalio jonai į ląstelę taip pat gal būti pernešami KUP/HUK (angl. K^+ uptake permease/ high-affinity K^+) transporterių pagalba (Dreyer & Uozumi 2011; Gierth & Mäser 2007).

Augalinės ląstelės tonoplaste randama citoplazminiam Ca^{2+} jautrių K^+ kanalų (Ward et al. 2009). K^+ jonai per tonoplastą gali judėti ir per Ca^{2+} aktyvinamus lėtuosius arba Ca^{2+} slopinamus greituosius neselektyvius

depolarizacijos ar hiperpolarizacijos aktyvuojamus katijonų kanalus (Demidchik et al. 2002).

Augalinėse ląstelėse taip pat buvo aptikti ir ROS aktyvuojami GORK, SCOR tipo kalio kanalai. *Arabidopsis* šaknų ląstelėse buvo parodyta, kad plazminėje membranoje esantys hidroksilo radikalo aktyvinami K^+ kanalai užtikrina kalio jonų išmetimą iš ląstelės oksidacinio streso metu. Manoma, kad šie kanalai, kaip ir gyvūnų ląstelėse, augaluose gali dalyvauti apoptozės iniciacijoje (Demidchik et al. 2014; Demidchik et al. 2010).

Atsižvelgiant į randamų augaluose K^+ pernašos sistemų įvairovę augalinė ląstelė lengvai gali reguliuoti K^+ transporto per membraną intensyvumą abiem kryptimis. Tai apsprendžia K^+ jonų koncentracijos citoplazmoje palaikymą, ląstelės turgoro ir augimo reguliaciją (Very & Sentenac 2003), ramybės potencialo palaikymą, veikimo potencialo repolarizacijos fazę ir daugelį kitų gyvybiškai svarbių funkcijų (Beilby & Blatt 1986).

Kalcio transportas. Augaluose Ca^{2+} yra vienas svarbiausių antrinių nešiklių, tarpininkaujančių tarp išorinio stimulo ir fiziologinio atsako susidarymo (Hetherington & Brownlee 2004). Augalinės ląstelės citoplazmoje ramybės būsenoje Ca^{2+} koncentracija palaikoma apie 100–200 nM dėl H^+/Ca^{2+} antiporto bei Ca^{2+} -ATPazės veikimo, kurie išstumia Ca^{2+} jonus iš citoplazmos į vakuolę, apoplastą ir endoplazminį retikulumą (ER). Citoplazminės Ca^{2+} koncentracijos pokyčiai sudaro pagrindą signalinių kaskadų iniciacijai reaguojant į daugelį biotinių ir abiotinių dirgiklių (McAinsh & Pittman 2009). Tokia reikšminga Ca^{2+} integracija į daugelį augalinėje ląstelėje vykstančių procesų apsprendžia skirtingų kalcio jonų pernašos mechanizmų buvimą praktiškai visuose augalinės ląstelės membraniniuose dariniuose. Augalinės ląstelės kalcio jonų kanalus galima būtų suskirstyti į dvi stambias grupes: įtampos valdomus kanalus ir ligandų valdomus kanalus. Plazminėje membranoje randami dviejų tipų įtampos valdomi kanalai, aktyvuojami membranos depolarizacijos ir besiskiriantis laidumu (didelio laidumo ir mažo laidumo). Abiejų šių tipų kanalai ramybės būsenoje būna uždaryti (Hetherington & Brownlee 2004). Tonoplaste taip pat nustatyti kelių tipų

įtampos valdomi Ca^{2+} kanalai: lėtieji depoliarizacijos aktyvuojami kanalai bei mažo laidumo hiperpoliarizacijos aktyvuojami Ca^{2+} kanalai (Scho et al. 2007). Parodyta, kad augalinėse ląstelėse hiperpoliarizacijos aktyvuojamų Ca^{2+} kanalų veikla gali būti moduluojama abscizo rūgšties (ABA) arba vandenilio peroksido (Murata et al. 2001; Hills & Blatt 2003). Depoliarizacijos aktyvuojamų Ca^{2+} kanalų funkcija siejama su veikimo potencialo generavimu.

Didesnė dalis Ca^{2+} transporto atitenka ligandų valdomų kanalų veiklai. Augalinių ląstelių vidiniuose membranose yra skirtingų tipų ligandų valdomų kanalų, užtikrinančių Ca^{2+} išlaisvinimą į citoplazmą iš ląstelės vidinių atsargų. Tai tokie kanalai, kaip IP_3 –valdomi kanalai, cADPR–valdomi kanalai, NAADP–valdomi kanalai (Maathuis 2004). IP_3 –valdomų kanalų sąlygotas signalų perdavimo kelias augaluose analogiškas gyvūniniams. Tačiau šis kanalas arba receptorių augaluose turi tik vieną ligando prijungimo vietą. Jis aktyvuojamas, esant IP_3 koncentracijai nuo nanomolių iki mikromolių. IP_3 aktyvuoja tonoplaste esančius Ca^{2+} selektyvius kanalus sąlygojančius Ca^{2+} išėjimą iš vakuolės arba vakuolės vezikulės. cADPR–valdomi kanalai dalyvauja tonoplasto potencialo susidaryme (nuo -10 iki -40 mV) ir Ca^{2+} išlaisvinime iš endoplazminio retikulumo (ER). Endoplazminiame retikulume taip pat randama NAADP–valdomų kanalų, kurie sukelia Ca^{2+} jonų išėjimą iš ER. Taip pat yra duomenų apie augaluose esančius glutamo receptorių, dalyvaujančius kalcio jonų pernašoje. Be to, Ca^{2+} gali judėti ir per neselektyvius katijonų kanalus (Demidchik & Davenport, et al. 2002). Taip pat augaluose aptinkama ir mechaniniam poveikiui jautrių Ca^{2+} kanalų (Ward et al., 2009), kurie galėtų dalyvauti receptoriniuose ląstelių atsakuose į mechaninį poveikį (Shepherd et al., 2002)

Anijonų pernaša. Augaluose yra daugybė anijonų kanalų, pasižyminčių skirtingais reguliavimo mechanizmais ir susijusių su įvairiais fiziologiniais procesais, tokiais kaip osmosinio slėgio reguliacija, turgoro palaikymas, mineralų apykaita, ląstelės metabolizmas, pH reguliacija, signalų transdukcija (Tavares et al. 2011). Be to, augaluose anijonų pernašos sistemos tarnauja kaip ląstelės atsako į stresą jungikliai (Roelfsema et al. 2012).

Augalų tonoplaste randama anijonų kanalų, laidžių chloro jonams, malatui, nitratui bei kitoms organinėms molekulėms. Šie kanalai dažniausiai užtikrina anijonų patekimą į ląstelės vakuolę. Taip pat tonoplaste yra Cl^- kanalų, kurie praleidžia Cl^- jonus iš vakuolės į citoplazmą. Šių kanalų funkcionavimas priklauso nuo kalcio koncentracijos citoplazmoje ir yra svarbūs osmoreguliacijai. Pagal atrankumą augalinių ląstelių tonoplasto anijoniniai kanalai skirstomi į du tipus: lėtus vakuolės (SV – slow vacuolar) ir greitus vakuolės (FV – fast vacuolar) kanalus. Jų selektyvųjį kanalo filtrą sudaro anijoninė grupė anijono judėjimas per šiuos kanalus įmanomas tik kartu su katijonu (Berecki et al. 2001; Trebacz et al. 2007).

Augalų plazmolemoje randama trijų tipų anijonų kanalų. Tai mechaniniam poveikiui jautrus kanalai ir dviejų tipų įtampai valdomi anijonų kanalai. Įtampos valdomus plazmolemos anijonų kanalus galima suskirstyti į greitai aktyvuojamus (R-tipo) ir lėtai aktyvuojamus (S-tipo) kanalus. R-tipo kanalų atsidarymo ir užsidarymo procesas trunka apie 10 ms, tuo tarpu S-tipo kanalų atsidarymas ir užsidarymas užsitęsia iki 10 s. Abiejų tipų anijonų kanalai gali būti depoliarizacijos aktyvuojami ištekančios ir įtekančios krypties kanalai bei, hiperpoliarizacijos aktyvuojami ištekančios krypties anijoniniai kanalai. Įdomu tai, kad R ir S tipo anijonų kanalai gali tiek iš apoplastinės tiek ir iš citoplazminės membranos pusės reguliuoti anijonų transportą (Vahisalu et al. 2008; Roberts 2006) Be to, šie kanalai yra jautrus fitohormonams auksinui ir ABA, o jų veiklą gali būti moduluojama viduląstelinio Ca^{2+} ar ląstelės išorėje esančių anijonų (Barbier-Brygoo et al. 2000). Daugelyje augalų rūšių aliuminio aktyvuojamų ALMT (angl. aluminium induced malate transport) ir MATE (angl. multidrug and toxic efflux) tipo anijonų kanalai, yra laidūs atitinkamai malatui ir citratui, kurie aktyvuojami apsauginės ląstelės reakcijos į aliuminio sukeltą stresinį poveikį metu (Bose et al. 2011)

Augalinės ląstelės plazmolemoje ir tonoplaste yra chloro kanalų, aktyvuojamų membranos depoliarizacija ir Ca^{2+} jonų koncentracijos padidėjimu. Būtent jie ir sąlygoja veikimo potencialo depoliarizacijos fazę augaluose (Berestovsky & Kataev 2005).

Aktyvi jonų pernaša. Augalinės ląstelės membranos ramybės potencialas gali siekti -260 mV, ir didelę jo dalį sąlygoja aktyvus transportas. Aktyvią jonų pernašą užtikrina baltymų grupė vadinama siurbliais. Joniniai siurbliai sugeba pernešti jonus prieš elektrocheminio potencialo gradientą ir tam jie naudoja ATP energiją (todėl dar kitaip vadinami ATPazėmis), todėl jonų pernaša šitomis sistemomis yra žymiai lėtesnė negu jonų kanalais (Sze et al. 1999). Augaluose randamos 3 tipų ATPazės. P-tipo (plazminės membranos) ATPazėms priskiriamos plazminės membranos H^+ -ATPazė, Ca^{2+} -ATPazė ir K^+ , Na^+ -ATPazės. Manoma, kad specifinė K^+ jonų pernaša į ląstelės vidų realizuojama per K^+ - H^+ -ATPazę arba K^+ -ATPazę arba K^+ - H^+ -simportu. V-tipo (vakuolės) ATPazės, funkcionuoja augalų tonoplaste. Dauguma šio tipo ATPazių yra protonų pernešėjai bei dalyvauja anijonų, amino rūgščių transporte, membranos reparacijoje, egzo- ir endocitozėje. F-tipo ATPazės būdingos chloroplastų ir mitochondrijų membranoms (Palmgren 2001).

Augaluose jonų siurblius galima būtų suskirstyti į elektroneutralius ir elektrogeninius. Elektroneutralūs jonų siurbliai dalyvauja jonų koncentracijų gradiento palaikyme. Elektrogeninių siurblių pernešamas krūvis viena kryptimi nekompensuojamas krūvio kiekiu, pernešamu kita kryptimi. Šie siurbliai kartu su K^+ kanalais dalyvauja membranos potencialų skirtumo susidaryme. Taip pavyzdžiui, vienaląsčio dumblio *Actebularia* elektrogeninis siurblys, Cl^- - ATPazė, užtikrinantis Cl^- pernašą iš išorės į ląstelės vidų, apsprendžia – 90 mV nuo viso membranos ramybės potencialo (-170 mV) vertės (Maathuis 2004). Didelę reikšmę augalinės ląstelės membranos potencialui, skirtingai nuo gyvūnų, turi būtent P tipo H^+ -ATPazės, kurios išmeta H^+ jonus iš citoplazmos į išorę. Protonų siurblio išmetamas H^+ panaudojami pernešant ištirpusias medžiagas per membraną, tačiau šiam procesui reikalinga pastovi H^+ cirkuliacija tarp ląstelės vidaus ir išorės, taigi siurblio išmetami H^+ grąžinami atgal kitais mechanizmais, greičiausiai Ca^{2+}/H^+ , $2H^+/Cl^-$, Na^+/H^+ antiporto sistemų pagalba. Be ramybės potencialo palaikymo, protonų siurbliai augaluose dalyvauja organinių junginių transporte, ir yra jautrūs stresiniams aplinkos pokyčiams ir hormonų svyravimams (Elmore & Coaker 2011).

Augaluose taip pat svarbus yra dar vienas P šeimos ATPazių atstovas, Ca^{2+} siurblys, palaikantis pastovią mažą viduląstelinę kalcio koncentraciją (Sanders et al. 2002)

2.4.2 Augalinių ląstelių membranos ramybės potencialas

Augalinės ląstelės gyvybingumui yra labai svarbu palaikyti pusiausvyrą su ją supančia aplinka. Reikšmingą vietą ląstelės funkcionavimo užtikrinime užima potencialų skirtumo, susidarancio abipus ląstelės membranos, vadinamo membranos ramybės potencialu, palaikymas. Kuo didesnis susidaro potencialų skirtumas abipus membranos, tuo intensyviau vyksta medžiagų apykaita ląstelėje, o ramybės potencialo pagrindu formuojasi visi kiti elektrofiziologiniai procesai ląstelėje. Augalinės ląstelės membranos potencialą sudaro trys komponentės:

$$E = E_{is} + E_p + E_t \quad (1), \text{ kur}$$

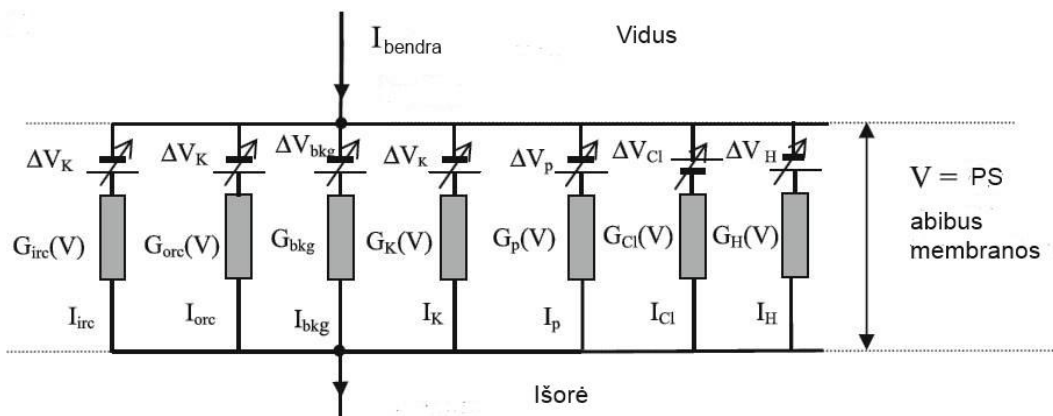
E – membranos potencialas,

E_{is} – ląstelės sienelės potencialas (-20-60 mV),

E_p – plazmolemos potencialas (-90-180 mV),

E_t – tonoplasto potencialas (+20-+50mV).

Ramybės potencialą apsprendžia membranos laidumas pagrindinėms augalų elektrogenezėje dalyvaujantiems jonams (K^+ , Na^+ , Cl^- , H^+) bei šių jonų koncentracijų skirtumai abiejose membranos pusėse (2.1 pav).



2.1 pav. Bendra augalinės ląstelės membranos elektrinės grandinės schema: lygiagrečiai sujungti laidumai, atstovaujami įtekančios krypties K^+ kanalais (G_{irc}), ištekančios krypties K^+ kanalais (G_{orc}), neselektyvių joninių kanalų ir mažo laidumo transporterių,

apsprendžiančių nuotėkio srovę (G_{bkg}), didelio laidumo K^+ selektyvių kanalų (G_{K}), Cl^- kanalų (G_{Cl}), protonų siurblio (G_{p}) ir H^+/OH^- kanalų (G_{H}). Šių kanalų varomoji jėga (kintama įtampa ΔV) sukuriama dėl potencialų skirtumo abipus membranos (PS) ir pusiausvyros potencialo (Nersto potencialo) kiekvienam jonui Adaptuota pagal (Beilby & Casanova 2014)

Tiek potencialų skirtumas abipus membranos tiek ir Nersto potencialas atskiriems jonams priklauso nuo šių jonų koncentracijos pasiskirstymo abiejose membranos pusėse. Šių potencialų sukuriama varomoji jėga nulemia jonų judėjimą iš ir į ląstelę, tačiau nebūtinai visi iš grandinę (2.1 pav) sudarančių kanalų veikia vienu metu. Kiekvieno kanalo sukuriama srovė gali būti aprašoma pagal Omo dėsnį:

$$I_j = G_j \times \Delta V_j \quad (2), \text{ kur:}$$

G_j - membranos laidumas j jonui, E_j $-j$ jono pusiausvyros potencialas, apskaičiuojamas pagal Nersto lygtį, E – membranos potencialas

Ramybės potencialą apsprendžiančių jono pernašos komponentų bendras veikimas kompensuoja kiekvieno jų atskirai sukurtą jonų srautą, tokiu būdu pusiausvyros sąlygomis suminė per membrana tekanti elektros srovė artėja į nulį (Beilby & Casanova 2014).

Joninio transporto per augalinės ląstelės membraną ramybės būsenoje elektrocheminio modelio pagrindą sudaro dvi dedamosios: pasyvus transportas (jonų judėjimas per joninius kanalus) ir aktyvus transportas (joninių siurblių veikimas) (Iwabuchi et al. 2005). Menturdumblių ląstelių ramybės potencialas, kurį sąlygoja pasyvus difuzinis jonų srautas, gali siekti iki -180 mV, kas yra artima K^+ pusiausvyros potencialui. Aktyviai veikiant protonų siurbliui, šis potencialas gali pasiekti ir -270 mV vertę. Todėl akivaizdu, kad augalinėje ląstelėje, tokio didelio potencialo skirtumo abipus membranos ramybės būsenoje susidarymui svarbus yra aktyvus transportas.

Remiantis Hodgkin - Huxley modelių veikimo potencialui, membranos potencialų skirtumas, tai visų jonų, tekančių per membraną srovių sumos funkcija:

$$\frac{\Delta E}{\Delta t} = \frac{1}{c} \sum_j i_j \quad (3), \text{ kur:}$$

c - specifinis membranos talpumas, i_j - jonų (K^+ , Na^+ , Cl^-), dalyvaujančių ramybės potencialo susidaryme, srovės. Srovės i_j stiprumas aprašomas lygtimi:

$$i_j = G_j(E_j - E) \quad (4), \text{ kur}$$

I_j - j jono srovė, G_j - membranos laidumas j jonui, E_j - j jono pusiausvyros potencialas, apskaičiuojamas pagal Nernsto lygtį, E - membranos potencialas

Augaluose metabolinę dedamąją ramybės potencialo palaikyme atstovauja H^+ ATPazė, kuri dėl H^+ išstūmimo iš ląstelės sukuria protonų varomąją jėgą (Sze et al. 1999). Bendras protonų siurblio įnašas į augalinės ląstelės membranos potencialą gali būti aprašomas taip:

$$E_p = \frac{\Delta G_{ATP}}{nF} - \frac{RT}{F} \ln \frac{[H^+]_o}{[H^+]_i} \quad (5), \text{ kur}$$

ΔG_{ATP} - ATP hidrolizės energija, n - 1 ATP hidrolizės metu pernešamų protonų skaičius, R - dujų konstanta, T - absoliuti temperatūra, F - Faradėjaus skaičius, $[H^+]_o/[H^+]_i$ - išorinė/vidulinė protonų koncentracija

Metabolinės komponentės sukuriama protonų srovę galima išreikšti lygtimi:

$$i_p = G_p(E_p - E) \quad (6), \text{ kur}$$

G_p - protonų siurblio laidumas, E_p - protonų pusiausvyros potencialas, apskaičiuojamas pagal Nersto lygtį, E - membranos potencialas

Tokiu būdu, augalinės ląstelės ramybės potencialą, įskaitant difuzinę ir metabolinę dedamąsias, galima aprašyti bendra lygtimi, kai $dE/dt=0$ (Spanswick 2006):

$$E = \frac{G_p E_p}{(G_p + G_K + G_{Cl} + G_{Na})} + \frac{(G_K E_K + G_{Cl} E_{Cl} + G_{Na} E_{Na})}{(G_p + G_K + G_{Cl} + G_{Na})} = E_p + E_D \quad (7), \text{ kur:}$$

E_p , E_D – atitinkamai difuzinis ir protonų siurblio sukuriamas potencialai

Augaluose E_D dažniausiai yra artimas K^+ pusiausviros potencialui, kas atspindi dominuojantį K^+ kanalų vaidmenį difuzinio membranos potencialo susidaryme. Augalinės ląstelės ramybės potencialo metabolinė ir difuzinė komponentės yra tarpusavyje susijusios ir gali reguliuoti viena kitos aktyvumą. Tokiu būdu, atsižvelgiant į K^+ kanalų ir H^+ -siurblio laidumų santykį, nulemiantį membranos ramybės potencialo dydį, augalinės ląstelės gali egzistuoti trijuose energetinėse būsenose (Beilby & Casanova 2014):

1. Hiperpoliarizuota arba dar vadinama P būseną (kai membranos potencialas neigiamesnis nei -200 mV), kuomet protonų siurblio veiklą apsprendžia 50 -75 % susidarančio potencialų skirtumo abipus membranos (Kitasato 1968)

2. Laidumo K^+ jonams būseną. Šios elektrocheminės būsenos atveju membranos potencialą apsprendžia didelių laidumu K^+ pasižyminčių kanalų veikimas, o H^+ siurbliai savo ruožtu neišsijungia, bet jų elektrogeninis įnašas į susidariusį potencialų skirtumą abipus membranos yra nereikšmingas (Tester 1987)

3. H^+/OH^- laidumo būseną, dar vadinama „Bisson“ būseną (Beilby M.J and Blatt M.R, 1986). Ši būseną susidaro tada, kai aplinkos pH pasislenka į šarminę pusę (pH 9-11), o potencialų skirtumas abipus membranos didžiają dalimi sąlygotas H^+/OH^- kanalų veiklos (Beilby MJ 1992).

Membranos ramybės potencialas augaluose atlieka energetinę, apsauginę ir reguliatorinę funkcijas.

2.5 Augalų elektriniai signalai

Augalai geba greitai reaguoti į įvairius aplinkos pokyčius, moduliudami ląstelių membranų bioelektrines savybes. Augalinių ląstelių elektrinius atsakus į skirtingos prigimties dirgiklius galima suskirstyti į veikimo potencialus, elektrotoninius potencialus ir lokalias bioelektrines reakcijas arba receptorinius

potencialus (Fromm & Lautner 2007). Receptoriniai potencialai siejami su membraninio potencialo pokyčiais lokaliai dirgiklio poveikio srityje ir toliau nuo sužadavimo vietos nebesklinda. Jų savybės priklauso nuo jas sukėlusio dirgiklio modalumo ir intensyvumo. Receptorinių potencialų augaluose prigimtis nėra gerai žinoma. Manoma, kad šių atsakų mechanizmas gali varijuoti priklausomai nuo juos sukeliama faktoriaus prigimties. Kitaip tariant, jeigu ląstelė patyrė mechaninį poveikį, tai greičiausiai lokalus elektrinis atsakas bus nulemtas mechaniniam poveikiui jautrių Ca^{2+} ir anijonų kanalų aktyvavimo (Kaneko et al. 2005; Shepherd et al. 2008; Shimmen 1997). Eksperimentai su *Cucurbita pepo* stebo ląstelėmis parodė, kad temperatūrinio streso sukelti receptoriniai potencialai gali būti generuojami dėl protonų siurblio veiklos slopinimo (Opritov et al. 2005). Greičiausiai šių atsakų generavime dalyvauja tiek kalcio tiek anijonų ir protonų pernašos sistemos.

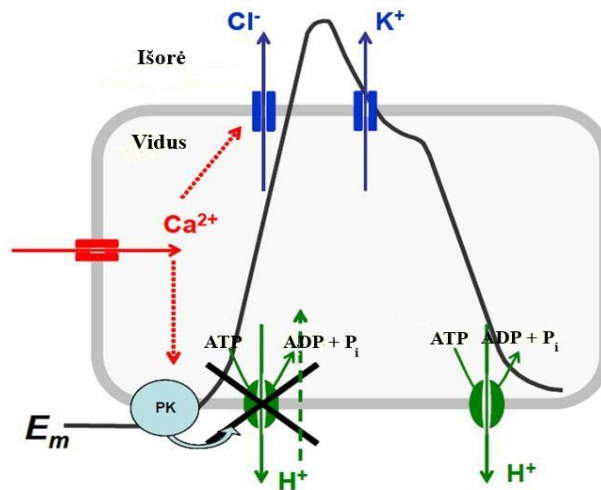
Elektrotoniniai potencialai, tai specifinis augalų atsakas į cheminius, terminius ar mechaninius pažeidimus. Šiems potencialams būdingas formos kintamumas, amplitudės priklauso nuo dirgiklio tipo ir stiprumo. Elektrotoniniai potencialai gali trukti iki 30 min ir skliti augalu dideliais atstumais, šio tipo atsako generavimo greitis ir amplitudė priklauso nuo atstumo iki pažeidimo vietos. Manoma, kad už elektrotoninio potencialo depoliarizacijos fazę atsako H^+ ATPazės slopinimas, o repoliarizacijos fazę nulemia protonų siurblio aktyvinimas. Tačiau šių potencialų generavimo mechanizmas nėra gerai išaiškintas (Stahlberg R. 2006).

Ypatingą vietą signalų perdavime augaluose užima veikimo potencialas, kuris savo forma ir generavimo ir perdavimo savybėmis primena neuronais sklindanti veikimo potencialą (Mancuso 2006).

2.5.1 Veikimo potencialo generavimo mechanizmai augaluose

Augalinėse ląstelėse veikimo potencialo generavimo mechanizmai bei jo vaidmuo įvairiuose fiziologiniuose procesuose tyrinėjami daugiau negu 50 metų. Nustatyta, kad augaluose veikimo potencialas yra svarbus bioelektrocheminis signalas, dalyvaujantis daugelyje fiziologinių procesų,

tokiu kaip fotosintezė, augimas, vandens pasisavinimas, kvėpavimas, genų raiška, judėjimas, atsakas į išorinį dirgiklį reguliavime (Davies 2004). Be to, VP augaluose gali perduoti informaciją apie lokalų sudirginimą arba pažeidimą tiek mažais atstumais kaimyninėms ląstelėms, taip ir didelių atstumu nutolusioms ląstelėms, tokiu būdu užtikrindamas jų gebėjimą reaguoti į potencialų pavojų (Sukhov et al. 2011). Veikimo potencialo forma, trukmė, ir sužadavimo slenkstis augaluose gali skirtis atsižvelgiant į jį sukėlusio stimulo modalumą, prigimtį, intensyvumą ir kitus parametrus (Fromm & Lautner, 2007). Augalinėje ląstelėje (kaip ir gyvūninėje) veikimo potencialo generavimas paklūsta „viskas arba nieko“ principui, t. y. jis įvyksta tik tada, kai žadinančio stimulo poveikyje membranos potencialas pasiekia slenkstinę vertę (Paszewski et al. 1982). Veikimo potencialo generavimo mechanizmas tiek aukštesniuose augaluose tiek dumbliuose yra panašus ir apima keletą sudėtingų mechanizmų: nemažai skirtingų cheminių reakcijų, antrinių nešėjų aktyvuojamus jonų kanalus, Ca^{2+} jonų išlaisvinimą iš vidinių atsargų (Beilby 2007). Augaluose, skirtingai nuo gyvūnų ląstelės, pagrindiniai krūvių nešėjai sužadavimo metu yra Ca^{2+} , K^+ , Cl^- jonai (**1.3. pav**). Sužadavimo metu pirmiausiai aktyvuojasi įtampos valdomi Ca^{2+} -kanalai. Ca^{2+} jonai pagal koncentracijos gradientą įeina į ląstelės vidų iš aplinkos ir iš vakuolės į citoplazmą. Padidėjusi Ca^{2+} koncentracija aktyvuoja nuo Ca^{2+} priklausomus Cl^- -kanalus (Beilby 2007). Lygiagrečiai su Cl^- kanalų aktyvacija Ca^{2+} jonai aktyvuoja nuo Ca^{2+} priklausomą proteinkinazę, kuri fosforilindama plazmolemoje lokalizuota H^+ -ATPazę mažina jos aktyvumą.



2..2 pav. Jonų srautai veikimo potencialo generavimo metu augaluose (adaptuota pagal (Vodeneev et al. 2006))

H^+ -ATPazės inaktyvacija ir išeinantys iš ląstelės Cl^- jonai sukelia membranos depoliarizaciją, kuri sąlygoja repoliarizuojančio K^+ jonų srauto per K^+ -kanalus iš ląstelės atsiradimą. Sekančia po K^+ srovės potencialo grąžinime į ramybės būseną bei joninio balanso atstatymo fazę formuoja Ca^{2+} jonų pašalinimo iš citozolio reaktyvuota H^+ -ATPazė, pumpuodama H^+ jonus iš ląstelės, o K^+ į ląstelę (Thiei et al. 1997). Veikimo potencialo generavimo metu membranos potencialas depoliarizuojasi iki maksimalios vertės (ji gali siekti iki +50 mV), o po to repoliarizuojasi iki ramybės būsenos.

Augalinėse ląstelėse Cl^- ir Ca^{2+} srovės atlieka pagrindinį vaidmenį sužadavimo procese. Augaluose viduląstelinė Cl^- jonų koncentracija varijuoja nuo 100 mM iki 250 mM. Cl^- srovės reversijos potencialas *Chara* dumbliuose varijuoja nuo +40 iki +75 mV. Lyginant jonų reversijos potencialų reikšmes su veikimo potencialo smailės poslinkiu bei jonų srovių pokyčiais, buvo nustatyta, kad *Chara* ląstelių veikimo potencialo depoliarizacijos fazė didžiaja dalimi yra susijusi su membranos laidumo Cl^- jonams padidėjimu. Laidumas Cl^- jonams didėja pirmą 0.5 s veikimo potencialo generavimo metu ir pradeda mažėti po 2–3 s, o po 6–8 s grįžta prie pradinės reikšmės. Kai mažėja membranos laidumas Cl^- jonams, pradeda didėti membranos laidumas K^+ jonams, ir šis procesas grąžina membraną į ramybės būseną (Thiel 1995).

.Augalinėms ląstelėms būdingas dirgiklių akomodacijos procesas (kai sužadavimo slenkstis priklauso nuo dirgiklio veikimo greičio augimo), nes keli nesiekiantys slenkščio impulsai einantys vienas po kito per mažus laiko intervalus sukelia veikimo potencialo generaciją. Veikimo potencialo trukmė gali siekti keliasdešimt sekundžių, kai tuo tarpu žinduolių nervinėse ląstelėse – tik 0.2–2 ms. Po veikimo potencialo atsiradimo ląstelėje prasideda absoliutus refrakterinis periodas, kurio metu negali būti sukiamas VP. Absoliutus refrakterinis periodas augaluose gali trukti iki kelių minučių tuo tarpu žinduolių nervinėse ląstelėse refrakterinio periodo trukmė yra milisekundžių eilės.

2.5.2 Veikimo potencialo sklidimas augaluose

Veikimo potencialo perdavimo mechanizmas augaluose pagrįstas lokalių elektros grandinių veikimu ir yra panašus į bioelektrinio signalo sklidimą aksonais (Stahlberg 2006). Aukštesniųjų augalų išilginės floemos ląstelės gali tarnauti gerais aksonų analogais, menturdumblių ląstelės puikiai tinka lokalių elektros grandinių veikimo principų vaizdavimui, kadangi jos yra ilgos, siauros, cilindro formos, veikimo potencialo sklidimą jomis galima aprašyti kabelio lygtimi.

$$\lambda = \frac{R_m}{R_o + R_i} \quad \frac{\partial^2 E}{\partial X^2} = \frac{E}{\lambda^2} + \frac{\tau_m}{\lambda} \frac{\partial E}{\partial t} \quad (8), \text{ kur:}$$

- kabelio pastovioji (atstumas, per kurį signalas gستا e kartų esant pasyviai sklidimui) augaluose kabelio pastovioji yra kelių milimetrų eilės, $\tau_m = R_m C_m$ laiko pastovioji (laikas, per kurį membranos potencialo nuokrypis nuo ramybės sumažėja e kartų), R_m – membranos varža, tenkanti ploto vienetui, C_m – membranos talpumas, tenkantis ploto vienetui, R_o – ekstraląstelinės terpės varža tenkanti ląstelės ilgio vienetui, R_i – viduląstelinės terpės varža tenkanti ląstelės ilgio vienetui.

Aukštesniuose augaluose informacija apie patirtą stresą veikimo potencialo pavidalu gali būti perduodama nuo kelių milimetrų iki kelių centimetrų per sekundę greičiu (Pyatygin 2008) Menturdumbliuose veikimo

potencialo sklidimas iš vienos ląstelės į kitą vyksta $0.21 - 5.7 \text{ cm s}^{-1}$ greičiu (Tabata & Sibaoka 1987).

Gyvūninėse ląstelėse bioelektrinio signalo perdavimas gali vykti per glaudžius kontaktus tarp ląstelių – plyšines jungtis. Tokie kontaktai tarp augalinių ląstelių neįmanomi dėl ląstelės sienelės buvimo. Gretimas augalines ląsteles jungia citoplazmos takeliai, vadinami plazmodezmomis (Gr. (*cito*)*plazma* + gr. *desmos* (ryšys)). Plazmodezmos suvienija ląstelių protoplastus į vieną visumą. Ląstelių sienelėse yra nedidelės angos, pro kurias plazmodezmos praeina. Plazmodezmų struktūra gali varijuoti: vienos yra paprastos, išklotos plazmolemos poros ląstelės sienelėje, kitose – endoplazminis retikulumas pereina iš vienos ląstelės į kitą (Kwiatkowska 2003). Plazmodezmomis sujungtos gretimų ląstelių citoplazmos sudaro simplastą. Augalinių ląstelių simplastas yra labiausiai tikėtinas veikimo potencialo sklidimo kelias. Tai patvirtina ir *Elodea canadensis* plazmolemos ($3.1 \text{ k}\Omega \text{ m}^{-2}$) tonoplasto ($0.1 \text{ k}\Omega \text{ m}^{-2}$), bei kontaktų tarp dviejų ląstelių plazmolemų ($0.051 \text{ k}\Omega \text{ m}^{-2}$) specifinės varžos skirtumai, parodantys, kad elektrinis ryšis per plazmodezmas dėl didelės jų varžos žymiai efektyvesnis. Kadangi plazmodezmų varža daug kartų didesnė negu galima buvo tikėtis, jeigu tai būtų paprasti atviri vandens kanalai, manoma, kad plazmodezmos yra iki tam tikro laipsnio susiaurinti praėjimai (Spanswick 1972). *In vivo* plazmodezmos gali būti užpildytos tik klampios citoplazmos. Plazmodezmos veikia kaip mažos varžos tilteliai leidžiantys bioelektriniam signalui pereiti iš vienos ląstelės į kitą. Aukštesniųjų augalų floema, parenchima arba protoksilema taip pat pasirodė esančios tinkamais veikimo potencialo transdukcijai (Volkov 2000). Augaluose veikimo potencialas per plazmodezmas sklinda vieną kryptimi, o floemos rietiniais indais jau gali sklirti iškart abiem kryptim, tokiu būdu gali būti kontroliuojamas signalo perdavimas augaluose. Augalinės ląstelės sujungtos per plazmodezmas ir floemos rėtinis indus suformuoja tinklus kuriais veikimo potencialas gali greitai sklirti visu augalu (Fromm & Lautner, 2007).

2.5.3 Veikimo potencialo fiziologinės funkcijos augaluose

Augaluose veikimo potencialo generavimas reikalauja didelių energijos sąnaudų. Tai susiję su reikšmingais elektrocheminio gradiento pokyčiais veikimo potencialo metu, kurio atstatymui naudojamas ATP. Tokiu būdu, jeigu VP neatliktų augaluose gyvybiškai svarbių funkcijų, tokių signalų buvimas nebūtų evoliuciškai pagrįstas. Eksperimentinių tyrimų rezultatai rodo, kad veikimo potencialai įtakoja tokius fiziologinius procesus augaluose kaip, pavyzdžiui, genų raišką, fitohormonų sintezę, kvėpavimą, fotosintezę, augalų atsparumą stresiniams faktoriams (Yan et al. 2009). Nustatyta, kad veikimo potencialas skatina abscizo ir jazmino rūgščių, sistemino, etileno ir kitų fitohormonų biosintezę. Pažymėtina, kad, jų sintezės aktyvacija prasideda praėjus vos kelioms minutėms po VP ir didėja kelių valandų laikotarpyje po VP (Trebacz et al. 2006). Šitų gynybinių medžiagų veikimo potencialo sąlygota sintezė stebima ne tik vabzdžių ar patogenų pažeistose ląstelėse, bet ir kituose kaimyninėse ląstelėse ar audiniuose. Tai taip vadinamas veikimo potencialo perduodamas pavojaus signalas, reikalingas informuoti dar nepažeistas ląsteles apie potencialią grėsmą, kad jos galėtų iš anksto pasiruošti apsisaugoti. Taip pat yra nustatytas VP dalyvavimas genų ekspresijoje. Veikimo potencialas gali inicijuoti PIN2 (proteazės inhibitoriaus) genų raišką (Fisahn et al. 2004), kurie yra svarbus augalų apsaugai nuo vabzdžių ar patogenų.

Aukštesniuose augaluose buvo nustatytas slopinantis veikimo potencialo poveikis fotosintezės procesui (Grams et al. 2009; Lautner et al. 2005; Krupenina & Bulychev 2007). Buvo parodyta, kad, augalų dalyse nutolusiose nuo karščio sukkelto pažeidimo vietos buvo stebimas VP lydimas CO₂ pasisavinimo sumažėjimu. Menturdumbliuose buvo parodyta, kad pagrindinį vaidmenį greitojoje fotosintezės inaktyvacijoje vaidina Ca²⁺ patekimas į citoplazmą veikimo potencialo generavimo metu, o jau iš citoplazmos kalcis patenka toliau į stromą, kur sukelia Kalvino ciklo reakcijų slopinimą (Krupenina et al. 2008). Tikėtina, kad panašus mechanizmas galėtų būti pagrindu fotosintezės slopinimui ir aukštesniuose augaluose.

Menturdumbliuose taip pat veikimo potencialo generavimo metu dėl viduląstelinės Ca^{2+} koncentracijos padidėjimo nustoja judėti citoplazma, ir tokiu būdu užkertamas kelias galimam citoplazmos turinio nuotėkiui dėl išorinių veiksnių sukeltų ląstelės membranos ar sienelės pažeidimų (Johnson, 2002). Šis reiškinys yra svarbus apsauginis mechanizmas ne tik paveiktai ląstelei, bet ir visam organizmui, nes iš pažeistos ląstelės atsklidęs VP, sustabdydamas gretimose ląstelėse citoplazmos judėjimą ir laikinai uždarydamas plazmodezmas, užkertą kelią galimam toksinių medžiagų paplitimui per tarpląstelinius kontaktus (Davies E 2006)

Taip pat žinoma, kad VP dalyvauja osmosinio slėgio reguliacijoje (Bisson et al. 2006) ir adaptacinėje augalo reakcijoje į temperatūros pokyčius (Pyatygin et al. 2008) Vabzdžiaėdžiuose augaluose veikimo potencialas dalyvauja lokomotorinėse reakcijose (Volkov et al. 2009).

Nustatyta, kad menturdumbliuose VP gali būti generuojamas vienoje iš per bamblių sujungtų tarpubamblinių ląstelių, reaguojant į kaimyninės ląstelės mechaninį pažeidimą. Autoriai nustatė, kad vienos iš per bamblių sujungtų *Chara* ląstelių nukirpimas, sąlygojantis jos žūtį, kitoje tarpubamblinėje ląstelėje sukeldavo kelių tipų membranos depoliarizaciją: greitąją, lėtąją ilgai trunkančią, ir VP. Šiuose tyrimuose buvo parodyta, kad VP yra generuojamas pačioje nepažeistoje ląstelėje, tuo tarpu lėta ir greita membranos depoliarizacijos buvo sukeltos bamblio ląstelėse dėl turgorinio slėgio pokyčių (Shimmen 2002)

Augalinių ląstelių fiziologinių procesų reguliacija ir greitas informacijos apie pavojų ir kintančias aplinkos sąlygas perdavimas VP pagalba, padeda augalams adaptuotis, apsisaugoti ir išgyventi.

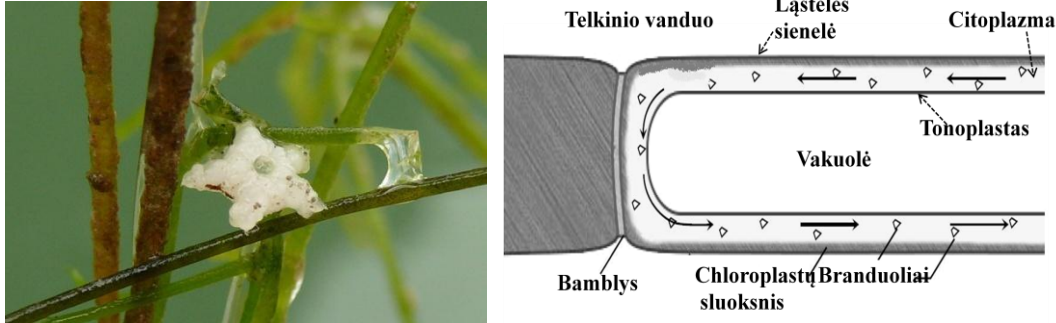
2.6. Literatūros šaltinių apžvalgos apibendrinimas

Literatūros šaltinių apžvalga parodė, kad mažų jonizuojančiosios spinduliuotės dozių sukelti efektai skirtinguose organizaciniuose lygiuose pasižymi daugialype biologine išraiška. Ląstelių membranos yra radiacijos kaip ir kitų aplinkos faktorių, poveikiui svarbūs pirminiai taikiniai, jų

barjerinės ir reguliatorinės funkcijų sutrikimai gali nulemti tolimesnius arba atspindėti jau įvykusius fiziologinius pokyčius ląstelėse. Bioelektriniai augalinės ląstelės membranos parametrai pasižymi greita ir jautria reakcija į aplinkos pokyčius, todėl menturdumblių kaip modelinės sistemos elektrofiziologiniai tyrimai galėtų padėti aiškinantis mažų jonizuojančiosios spinduliuotės fenomenų prigimtį ląsteliniame lygmenyje.

3. METODIKA

3.1. Tyrimų objektas



3.1. pav. Kairėje pusėje pateikta *Nitellopsis obtusa* (liet. žvaigždėtasis maurašakis) nuotrauka, dešinėje pusėje pavaizduota tarpubamblinės ląstelės sandara: rodyklės ląstelės citoplazmos viduje rodo citoplazmos judėjimo kryptį (Johnson 2002)

Eksperimentų metu buvo naudojamas augalų karalystės (*Plantae*), maurabragainių (*Charophyceae*) klasės, maurabragiečių (*Charales*) eilės, maurabraginių (*Characeae*) šeimos atstovas – žvaigždėtasis maurašakis (*Nitellopsis obtusa*) (3.1 pav.). Menturdumblis *Nitellopsis obtusa* – gėlių vandenų daugiametis augalas. Jis daugiausiai paplitęs pietinės Lietuvos dalies ežeruose. Auga 3-12 metrų gylyje. Šie menturdumbliai yra dvinamiai, dauginasi vegetatyviniu būdu – gniužulo dalimis ir ant rizoidų išaugusiais žvaigždės formos svogūnėliais, o lytiškai – oogamijos būdu (Pullman 2010). Įvairūs ekologiniai faktoriai turi įtakos jų kaip ir kitų Menturdumblių augimui, vystymuisi bei paplitimui (Yehuda et al. 2013). Menturdumbliai nereiklūs apšvietimui, auga vidutinės temperatūros vandenyse (Torn et al., 2004). *Nitellopsis obtusa* talomo ilgis gali siekti keliasdešimt centimetrų. Jis sudarytas iš bamblių ir tarpubamblių, kurių susijungimo vietoje yra išsišakojimai. Bambliai yra daugialąsčiai dariniai, sudaryti iš kelių trumpų vidinių ir periferinių vienbranduolių ląstelių. Kiekvienas tarpubamblys – tai didžiulė daugiabranduolė ląstelė, kurios skersmuo iki 1 mm, o ilgis gali siekti 10-20 cm. Menturdumblio tarpubamblio ląstelės savo struktūra ir fiziologinėmis funkcijomis labai panašios į aukštesniųjų augalų parenchimos ląsteles. Jos

sudarytos iš citoplazmos, vakuolės ir celiuliozinės-pektininės sienelės. Ląstelės sienelėje sukaupta daug Ca^{2+} jonų, o jos storis siekia 10–15 μm ir priklauso nuo ląstelės amžiaus. Protoplasma sudaryta iš nejudraus chloroplastų sluoksnio – ektoplazmos ir aplink vakuolę judančios citoplazmos sluoksnio – endoplazmos. 15 μm storio citoplazma turi paviršinę membraną – plazmalemą, kuri atskiria ląstelės vidinį turinį nuo ląstelės sienelės, ir vidinę membraną – tonoplastą, kuris skiria vakuolę nuo citoplazmos. Vakuolė užima didžiausią ląstelės dalį (apie 90%). Ji užpildyta vandeniniu įvairių organinių ir neorganinių medžiagų tirpalu. Vakuolė palaiko augalinės ląstelės formą. Ląstelėse vyksta cikliškas 100 $\mu\text{m s}^{-1}$ greičiu citoplazmos judėjimas tarp tonoplasto ir plazmalemos aplink vakuolę. Toks citoplazmos judėjimas padeda išnešioti maisto medžiagas ir ląstelėje. Nuo gniužulo atskirta didžiulė tarpubamblio ląstelė, gali būti laikoma savarankišku organizmu, nes ji ilgai išlaiko pagrindines fiziologines savybes (Beilby & Casanova 2014).

Tyrimuose naudoti menturdumbliai buvo surenkami iš Siesarties ežero ir laikomi stikliniuose akvariumuose, pripildytose kambario temperatūros nechloruoto vandentiekio ir telkinio, iš kurio jos buvo surinktos (1:1) vandenyje.

3.2. Eksperimentuose naudotos medžiagos, tirpalai ir jonizuojančiosios spinduliuotės šaltiniai

Eksperimentuose kontroliniams tyrimams buvo naudojama nepilnos sudėties Forsbergo terpė (Forsberg 1965) toliau vadinama APW (artificial pond water – dirbtinis tvenkinio vanduo), kurio paruošimui reikėjo 0.1 10^{-3} M KCl, 1 10^{-3} M NaCl, 0.1 10^{-3} M CaCl_2 , 2.5 10^{-3} M TRIS (tris (hydroxymethyl) aminomethane), HEPES (4-(2-hydroxyethyl) piperazine – 1 – ethanesulfonic acid)/HCl (pH 7.2). APW taip pat buvo naudojamas kaip pagrindas reikiamos koncentracijos/aktyvumo koncentracijos tiriamųjų tirpalų ruošimui skiedimo būdu. Kontrolinės bei tiriamos išorinės terpės pH 7.2 palaikymui buvo naudojami buferiniai tirpalai TRIS ir HEPES/HCl.

Išgyvenamumo testo atlikimui kontrolinėmis sąlygomis bei tiriamos medžiagos skiedimui iki reikiamos koncentracijos buvo naudojama modifikuota Forsbergo mitybinė terpė, paruošta iš $0.1 \cdot 10^{-3} \text{ M KH}_2\text{PO}_4$, $1 \cdot 10^{-3} \text{ M NaHCO}_3$, $0.4 \cdot 10^{-3} \text{ M CaCl}_2$, $0.1 \cdot 10^{-3} \text{ M Mg(NO}_3)_2$, $0.1 \cdot 10^{-3} \text{ M MgSO}_4$ (pH 7.2).

Eksperimentuose naudojami tirpalai buvo ruošiami iš „Sigma–Aldrich“ chemiškai grynų reagentų. Reikiamos koncentracijos HTO tirpalas buvo gaunamas skiedžiant standartinį 248.5 kBq L^{-1} HTO tirpalą (tritiated water – tritintas vanduo) (Isotrak, Braunschweig, Germany);

Tirti tirpalai:

APW + HTO (7 kBq L^{-1} , 15 kBq L^{-1} , 30 kBq L^{-1} , 65 kBq L^{-1}), pH 7.2

APW + Aliuminio chloridas $1 \cdot 10^{-3} \text{ M AlCl}_3$, pH 7.2

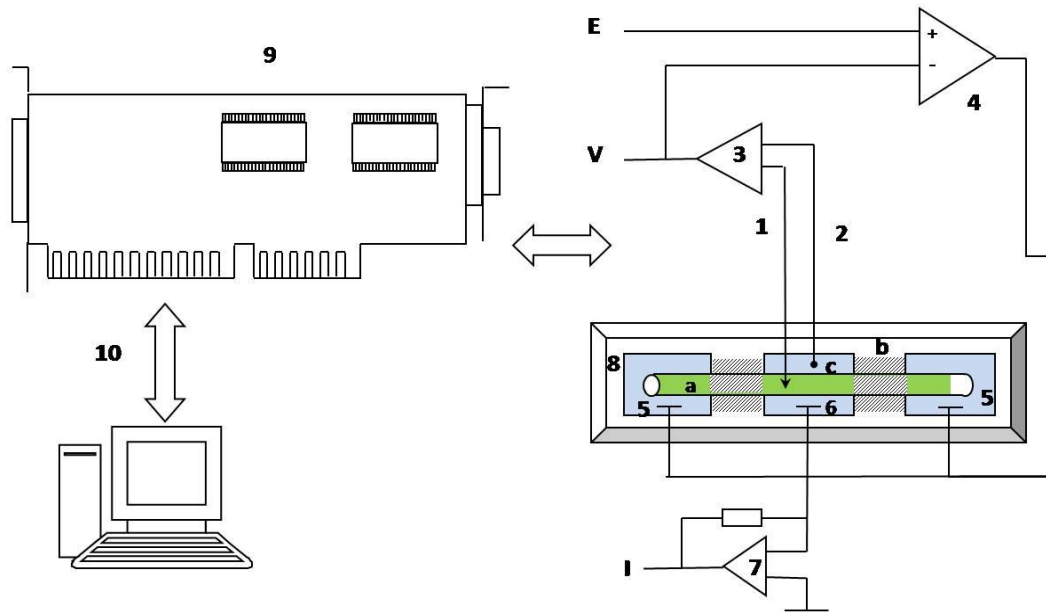
APW + Uždaras stroncio izotopo šaltinis Sr 90 74 kBq , pH 7.2

Tričio tūrinio aktyvumo APW ir HTO tirpaluose (aktyvumo koncentracijos) matavimai buvo atliekami skysčių scintiliacijos skaitikliu (Quantulus 1220, Wallac Oy, Turku, Suomija; mažiausias detektuojamas tūrinis aktyvumas: 1.8 Bq L^{-1} matuojant 30 min.), pridedant scintiliacinio mišinio (Optiphase Hisafe 3, Packard Instrument, Waltham, JAV). Matavimai buvo atliekami Radiacinės saugos centre pagal akredituotas standartines procedūras (LST ISO 9698:2006 atitinkančią ISO 9698:1989)

Uždaro radioaktyvaus stroncio šaltinio (Sr 90 74 kBq) aktyvumas tiriamu atstumu nuo švitinamo paviršiaus buvo matuojamas Geigerio-Miullerio skaitikliu (Phywe, Vokietija)

3.3. Elektrofiziologiniai matavimai

3.3.1. Elektrofiziologinių parametrų registravimo sistema ir jos techninės savybės



3.2. pav. Bendra kompiuterizuotos tyrimo sistemos schema. 1- matuojantysis mikroelektrodas, 2 – indiferentinis elektrodas, 3 - bioelektrinių signalų stiprintuvas, 4- diferencinis stiprintuvas, 5 – išoriniai stimuliuojantys Ag/AgCl srovės elektrodai, 6 - įžeminimo elektrodas, 7 – srovė/įtampa keitiklis, 8 – kamera, kurioje patalpinama tiriamoji ląstelė (a – ląstelė, b – vazelinio filteliai, c – centrinė kamera, kurioje vyksta matavimai), 9– universali įvedimo/išvedimo sistema, 10 – kompiuteris, E- komandinė įtampa, V – matuojamasis membranos potencialas, I - matuojamoji transmembraninė srovė.

Elektrofiziologinių tyrimų metu buvo naudojama kompiuterizuota standartinė viduląstelinė mikroelektrodinė sistema, skirta biopotencialų ir transmembraninių jonų srovių registravimui (3.2 pav.). Šią sistemą sudaro:

- trijų sekcijų, sujungtų siaurais grioveliais, organinio stiklo kamera su tiriamų tirpalų pritekėjimo bei nutekėjimo ($1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ greičiu) sistema, kurioje talpinama tiriamoji ląstelė (8).

- stiklinis mikroelektrodas (1), užpildytas 3 M KCl tirpalu, skirtas membraninio potencialo matavimui (pagamintas iš stiklinių borosilikatinių kapiliarų (Kwik-Fil™, World Precision Instruments Inc., USA); galiuko diametras 1 – 3 μm , varža 8 – 20 $\text{M}\Omega$, talpumas 1 – 2 pF, elektrodo galiuko potencialas ~ 10 mV). Šis mikroelektrodas prijungiamas prie registravimo sistemos per platinos – kalomelio (Hg/HgCl) standartinį laikiklį ir mikromanipulatoriaus pagalba įvedamas į ląstelę,

- indiferentinis stiklinis elektrodas (2) (galiuko diametras apie 100 μm), kuris užpildomas 2.5 % agar agaru, ištirpintu 100 M^{-3} KCl tirpalu. Jis yra patalpinamas išoriniame tirpale šalia tiriamos ląstelės,

- išoriniai stimuliuojantys chlorsidabriniai (Ag-AgCl) elektrodai (5, 6), kuriais srovės impulsai leidžiami per ląstelės membraną,

- įtampos/srovės fiksavimo stiprintuvų blokas TURBO TEC-10CX npi, kuris 20 kartų sustiprina elektrinius signalus, paduodamus į universalią kompiuterinę signalų įvedimo/išvedimo sistemą Digidata® 1440A. Šiame bloke visi stiprintuvai padaryti pagal standartinę dviejų kaskadų schemą, kuri labai efektyviai slopina sinfazinius signalus (pvz., elektros tinklo triukšmą). Analoginiai signalai keičiami į skaitmeninę formą analoginiu/skaitmeniniu keitikliu,

- Kompiuteris (10); Eksperimento valdymui, skaitmeninių duomenų kaupimui ir pirminiam jų apdorojimui naudojamas programinis paketas pCLAMP 10 (Clampex 10, Clampfit 10, AxoScope 10).

3.3.2. Elektrofiziologinių parametrų registravimo ypatumai

Tyrimams atrinktos ląstelės, preadaptacijos ir gyvybiškai svarbių fiziologinių procesų stabilumo užtikrinimui 24 valandas prieš eksperimentą, buvo išlaikomos kontroliniame APW tirpale. Eksperimentų metu buvo palaikomi pastovūs tirpalų pH 7.2, kambario temperatūra ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), ir apšvietimas (500 ± 10 Lx, dienos šviesa).

Elektrofiziologinių parametrų matavimai vyko vazelino tilteliais izoliuotoje centrinėje matavimo kameros dalyje, į kurią buvo pilami tiriamieji

tirpalai. Matavimo kameros ilgis buvo 0.5 cm. Matuojantysis mikroelektrodas mikromanipuliumi įvedamas į ląstelę, o indiferentinis elektrodas įmerkiamas šalia ląstelės į išorinį tirpalą. Visuose eksperimentuose elektrofiziologinių parametrų registravimas ir vertinimas buvo pradedamas membranos potencialui pasiekus ramybės būseną (kai 30 min. laikotarpyje nesikeičia membranos potencialo vertė). Eksperimentai buvo atliekami srovės ir įtampos fiksacijos metodais.

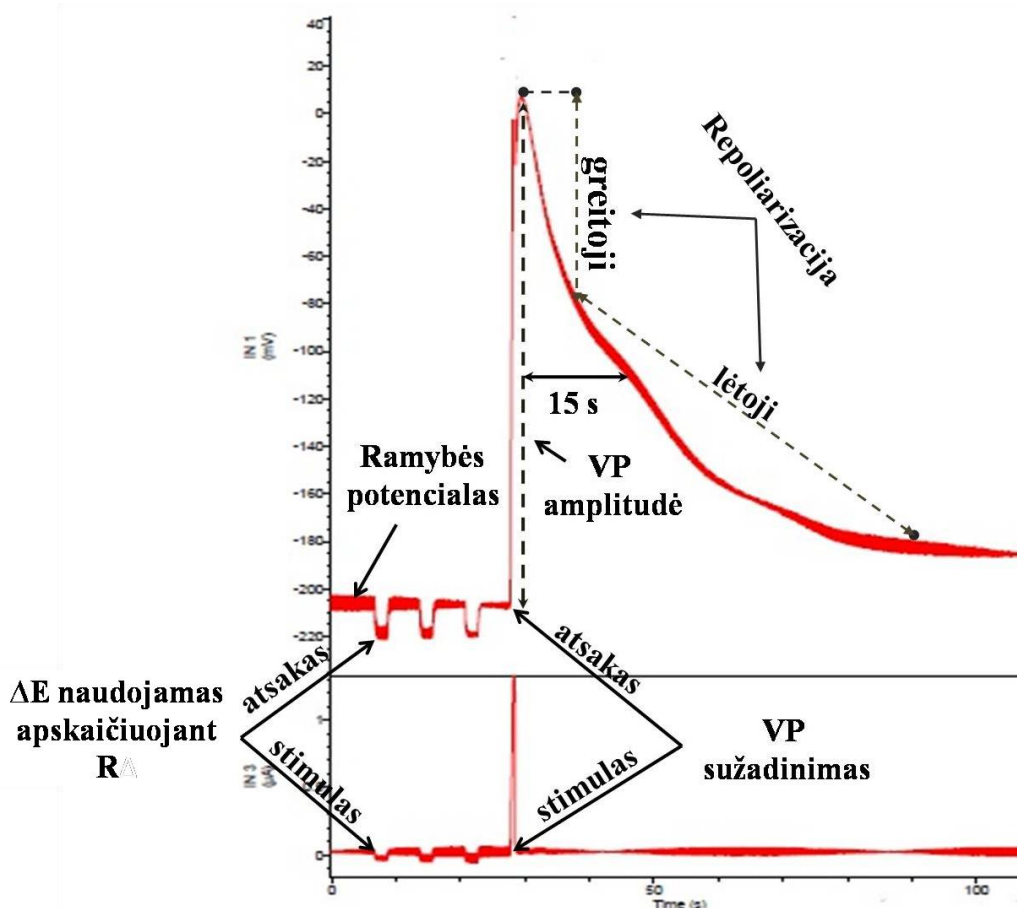
Srovės fiksacijos metodu buvo registruojami membranos ramybės potencialas, specifinė membranos varža (R) ir veikimo potencialas. Ramybės potencialu buvo laikomas registruojamas elektrinių potencialų skirtumas susidaręs tarp matuojančiojo ir indiferentinio elektrodų (membranos potencialas).

Siekiant įvertinti membranos R, ląstelė, esanti ramybės būsenoje, buvo stimuliuojama stačiakampiu 1 - 2 s trukmės bei 0.1 μA dydžio depoliarizuojančios srovės impulsu (tokio stiprumo srovė nesukelia veikimo potencialo generavimo) (Spiewla 1995) ir užregistruojamas potencialų skirtumo pokytis, kuriuo remiantis apskaičiuojama specifinė membranos varža pagal formulę (Musayev & Ismailov 2007):

$$R = \frac{\Delta E}{I} \pi d l \quad (9), \text{ kur}$$

d - ląstelės diametras matavimo vietoje, cm, l - ląstelės ilgis matavimo kameroje, cm; ΔE - membranos potencialo pokytis, mV; I – srovės stiprumas, μA .

Veikimo potencialo generavimas buvo suskeliamas elektriškai žadinant ląstelę viršslenkstiniais stačiakampiais depoliarizuojančios srovės impulsais (200 ms trukmės ir 0 - 5 μA srovės stiprumo) leidžiamais per išorinius elektrodus. Eksperimentų protokolai, atliekant tyrimus srovės fiksacijos režime pavaizduotas paveiksle **3.3**.



3.3. pav. Srovės fiksacijos metodu atliktų eksperimentų tipinis registravimo langas: viršuje pavaizduotas tipinis užregistruotų ląstelės atsakų įrašas, išskiriant vertinamus parametrus (membranos ramybės potencialas, membranos potencialo pokytis, naudojamas specifinei membranos varžai apskaičiuoti, veikimo potencialo amplitudė, greitosios repoliarizacijos fazės dinamika); paveikslo apačioje pavaizduotas stimulų pateikimo protokolas, registruojant membranos ramybės potencialą, membranos varžą, veikimo potencialą.

Užregistruoto veikimo potencialų analizei, buvo matuojama jo amplitudė, o membranos potencialo atsistatymo po sužadinimo dinamikai įvertinti, buvo skaičiuojamas maksimalus potencialo kitimo greitosios repoliarizacijos fazėje greitis (15 s pradedant nuo veikimo potencialo smailės viršūnės), pagal formulę:

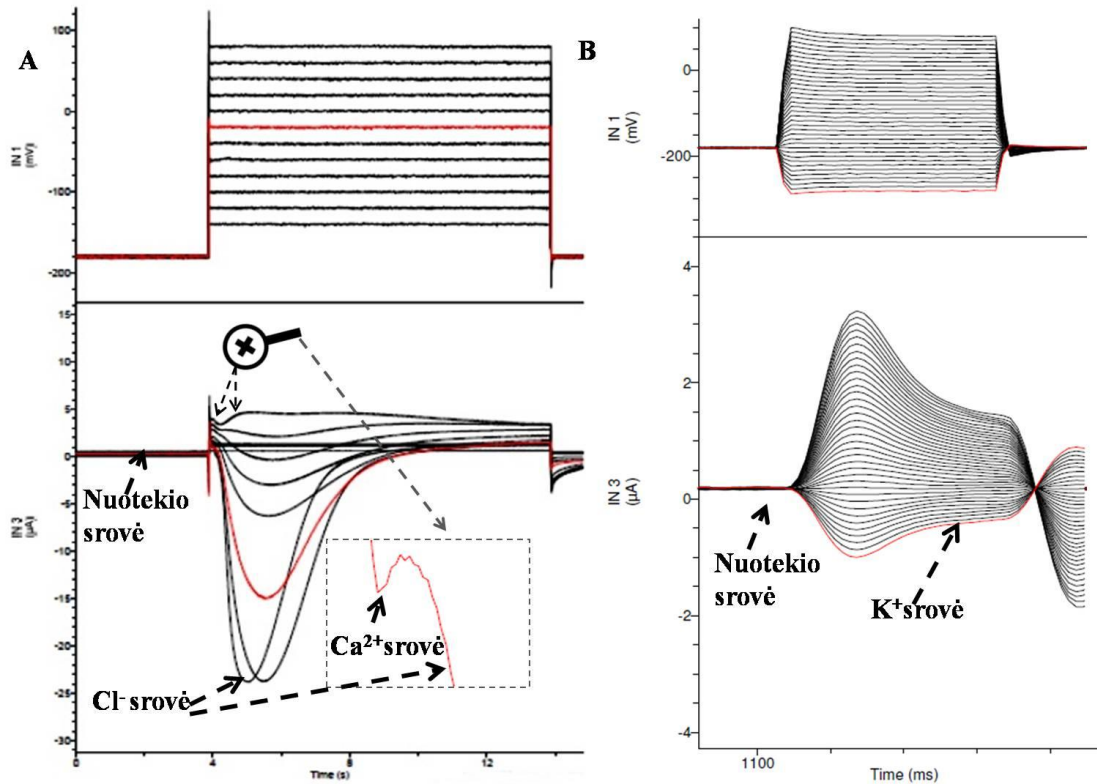
$$f(t) = \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad (10), \text{ kur:}$$

ΔE - membranos potencialo pokytis, mV; Δt - laiko pokytis, s

Fiksuotos įtampos metodu buvo tiriami jonų transporto per membraną mechanizmai dalyvaujantys elektrinio atsako į dirgiklį formavime. Tekančios per membraną srovės buvo registruojamos kai grįžtamojo ryšio stiprintuvo pagalba membranos potencialas automatiškai buvo palaikomas reikiamame lygyje. Įtampa buvo fiksuojama ties -180 mV (menturdumblių ląstelės yra laidumo kalio jonams būsenoje, kadangi membranos ramybės potencialas, susidaro pagrindinai dėl K^+ transmembraninio judėjimo, protonų siurblių elektrogeninis įnašas yra nežymus) nedideliame ląstelės paviršiaus plote (0.5 cm) centrinėje kameros dalyje, tarp vazelino tiltelių, kad būtų užtikrintas vienodas srovės pratekėjimas bei vienalytis potencialo poslinkis.

Kalio kanalų veiklos tyrimui, siekiant nesukelti veikimo potencialo generavimo, ląstelė buvo stimuliuojama kas 10 mV trumpais (30 ms) stačiakampiais hiperpolarizuojančios arba depolarizuojančios srovės impulsais įtampos intervale nuo -270 mV iki +60 mV nuo fiksacijos potencialo (-180 mV) (**3.4 pav. B**). Eksperimento protokolas buvo adaptuotas remiantis kitų tyrėjų atliktais darbais (Demidchik et al., 1997; Kisnieriene et al., 2012).

Augalinės ląstelės elektrinio sužadavimo metų atsirandančių chlorinių ir kalcinių srovių tyrimuose, ląstelė buvo stimuliuojama šuoliškai keliant įtampa; pirmiausiai iki -140 mV ir grąžinama vėl iki fiksacijos potencialo reikšmės (-180 mV), ir taip kartojama didinant įtampos šuolį 20 mV su 5 min intervalu tarp įtampos šuolių iki +60 mV ir registruojami ląstelės atsakai. Joninių srovių registravimo langai pateikti **3.4 A** paveiksle. Registruojant per membraną tekančias sroves ląstelės elektrinio sužadavimo metu, išskiriamos dvi laike ir stiprumu atsiskiriančios srovės: pirmoji atsirandanti praėjus 0.1 s nuo stimulo įjungimo žymiai mažesnė srovė yra kalcinė, o po jos sekanti didesnio stiprumo srovė yra chlorinė (Лапковская и др., 2010)



3.4. pav. Įtampos fiksacijos metodu atliktų eksperimentų tipiniai registravimo langai: A: viršuje pavaizduotas stimulų pateikimo protokolai, registruojant Cl^- ir Ca^{2+} srovių atsirandančias dėl ląstelės membranos elektrinio sužadavimo; apačioje - tipinis sužadavimo metu per ląstelės membraną tekančių srovių įrašas, išskiriant vertinamus parametrus (Cl^- , Ca^{2+} ir nuotėkio srovės); B: viršuje pavaizduotas stimulų pateikimo protokolai, registruojant K^+ srovę, nesukeliant veikimo potencialo generacijos; apačioje - tipinės per ląstelės membraną tekančios K^+ srovės įrašas, išskiriant vertinamus parametrus (K^+ ir nuotėkio srovės)

Užregistruotų $\text{K}^+/\text{Cl}^-/\text{Ca}^{2+}$ srovių maksimalios vertės buvo perskaičiuojamos į srovės tankį, pagal formulę :

$$I = \frac{I_{reg}}{l\pi d} \quad (11), \text{ kur:}$$

I – srovės stiprumas, tenkantis ploto vienetui ($\mu\text{A cm}^{-2}$); I_{reg} – užregistruotas srovės stiprumas (μA); l – registravimo kameros ilgis (0.5 cm); d – tiriamos ląstelės skersmuo (cm)

Apskaičiuotos joninių srovių tankio reikšmės buvo naudojamos sudarant voltamperines per membranos ploto vienetą tekančių joninių srovių

charakteristikas. Tiriamų srovių voltamperinės charakteristikos buvo sudaromos po nuotėkio srovės eliminacijos (**3.4 pav**).

Kalcio bei chloro jonų transporto per membraną analizei taip pat buvo vertinamas membranos laidumas konkrečiam jonui (G_j), apskaičiuojant jį pagal formulę:

$$G_j = \frac{I_j}{(E - E_j)} \quad (12), \text{ kur:}$$

I_j – atitinkamo jono srovės tankis, $\mu\text{A cm}^{-2}$; G_j - membranos laidumas atitinkamam jonui, $\mu\text{S cm}^{-2}$; E – membranos potencialas, kuriam esant buvo užregistruotas atitinkamas srovės tankis, mV; E_j – atitinkamo jono srovės reversijos potencialas, mV.

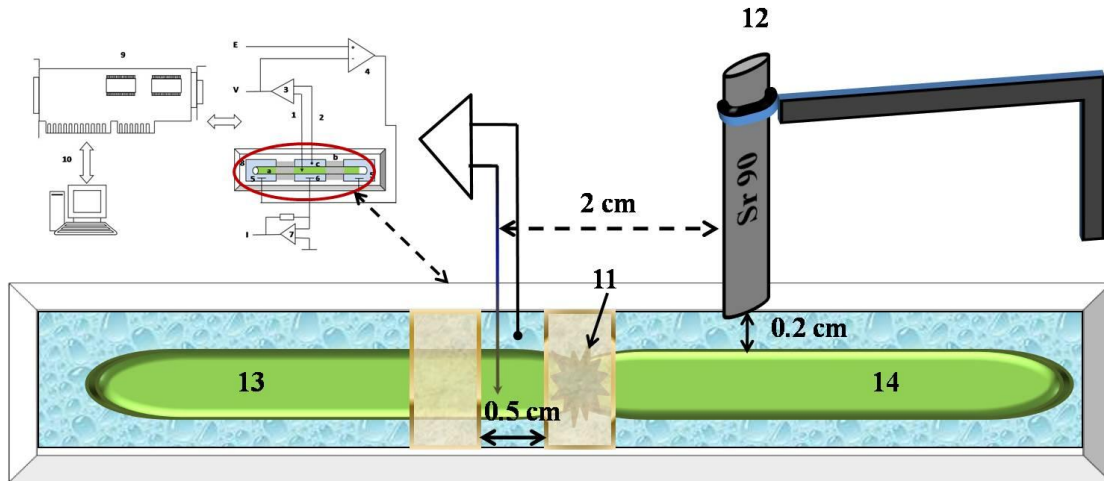
Atitinkamo jono srovės reversijos potencialas buvo nustatomas pagal $\text{Cl}^-/\text{Ca}^{2+}$ srovės voltamperinę charakteristiką (membranos potencialo reikšmė, ties kuria $\text{Cl}^-/\text{Ca}^{2+}$ voltamperinė charakteristika kerta abscisių ašį.

Ca^{2+} ir Cl^- srovių tankiai ir membranos laidumas šiems jonams buvo vertinami - 60mV ÷ -40 mV įtampų diapazone, kadangi šių įtampų intervale prasideda tiesinė ištekančios chloro ir įtekančios kalcio srovių tankio priklausomybė nuo įtampos, ir vyksta intensyviausia Ca^{2+} pernaša iš išorės į ląstelės vidų (Berestovsky & Kataev 2005).

K^+ srovės tankis buvo vertinamas esant 60 mV įtampai, kuriai esant K^+ transportas iš ląstelės yra intensyviausias (Horváth et al. 2002; Kisnierienė et al. 2009).

Tiriant jonizuojančiosios spinduliuotės sąlygotus gretutinius reiškinius buvo vertinami elektrofizologiniai pokyčiai nepaveiktoje ląstelėje, atsiradę dėl signalo perdavimo apie JS sukeltus padarinius iš apšvitintos kaimyninės ląstelės. Signalo perdavimo tarp dviejų per bamblių sujungtų tarpubamblinių *Nitellopsis obtusa* ląstelių tyrimui buvo atadaptuotas kitų autorių naudojamas signalo perdavimo tarp menturdumblių ląstelių eksperimentų protokolas (Shimmen 2002). Šiuose tyrimuose buvo naudojamos dvi panašaus ilgio (~10

cm) ir skersmens (~0.06 cm) ir per bamblių sujungtos tarpubamblinės menturdumblių ląstelės. Eksperimentų schema pavaizduota paveiksle 3.5.



3.5. pav. Gretutinių reiškinių tyrimo schema. Elektrofiziologinių parametrų matavimo sistema atitinka 3.2. pav pateiktą bendrą kompiuterizuotos tyrimo sistemos schemą nuo 1 iki 10: 11 – daugialąstis bamblys, jungiantis dvi tarpubamblines ląsteles (13 ir 14), patalpintas po izoliuojančiu vazelino tilteliu, 12 – uždaras radioaktyvaus stroncio izotopo Sr 90 šaltinis (74 kBq), įtvirtintas laikiklyje virš švitinamos ląstelės; 13 – nepaveikta tarpubamblinė ląstelė, kurios elektriniai parametrai buvo registruojami; 14 – švitinama kaimyninė tarpubamblinė ląstelė.

Gretutinių reiškinių tyrimo eksperimentuose, tiriamos ląstelės matavimo kameroje buvo talpinamos taip, kad atstumas tarp matuojančiojo elektrodo ir švitinimo šaltinio buvo 2 cm. Daugialąstis bamblys (**3.5 pav. 11**), jungiantis dvi tarpubamblines ląsteles buvo patalpintas tarp centrinės ir šoninės matavimo kameros dalių, po jas skiriančiu vazelino tilteliu. Šoninėje matavimo kameros dalyje esanti kaimyninė ląstelė (**3.5 pav. 14**) buvo veikiam jonizuojančiosios spinduliuotės šaltiniu (uždaru radioaktyvaus stroncio izotopo (Sr 90) 74 kBq aktyvumo šaltiniu (**3.5 pav. 12**) esančiu 0.2 cm atstumu nuo ląstelės paviršiaus. Esant tokiam atstumui tarp radioaktyvaus šaltinio ir švitinamos ląstelės JS šaltinio sąlygojamas aktyvumas ant ląstelės paviršiaus buvo 2.4 kBq. Elektrofiziologiniai parametrai buvo registruojami kitoje ląstelėje (**3.5 pav. 13**)

pagal srovės ir įtampos fiksacijos protokolus, aprašytus anksčiau šiame skyriuje (3.3 ir 3.4 pav.)

3.4. Eksperimentų eiga

3.4.1. Išgyvenamumo testas

Nitellopsis obtusa makrofitiniai dumbliai yra plačiai naudojami biotestai aplinkos toksiškumo ir išgyvenamumo tyrimuose. 96 valandų išgyvenamumo testui (Manusadžianas et al.1995) atrinktos menturdumblių ląstelės buvo laikomos esant kambario apšvietimui ir temperatūrai, stikliniuose akvariumuose, užpildytuose vandens telkinio (iš kurio jos buvo surinktos) ir nechloruoto vandentiekio vandens mišiniu santykiu 50:50.

Tiriamų ląstelių preadaptacija, kontroliniai bandymai, bei testuojamos cheminės medžiagos skiedimas ir tirtų tirpalų paruošimas buvo atliekamas modifikuotoje Forsbergo mitybinėje terpėje (pH 7.2) siekiant užtikrinti pakankamą ląstelių aprūpinimą maistinėmis medžiagomis atsižvelgiant į eksperimento trukmę.

Dumblių ląstelių preadaptacijai prieš atliekant biotestą, tiriamos ląstelės buvo perkeliamos į kontrolinę terpę ir išlaikomos 24 val. Po preadaptacijos procedūros reikiamas ląstelių kiekis (po 10 ląstelių) buvo patalpinamas į tiriamas kontrolinę ir atitinkamos HTO aktyvumo koncentracijos terpes: kontrolė; 7 kBq L⁻¹; 15 kBq L⁻¹; 30 kBq L⁻¹; 65 kBq L⁻¹ HTO ir APW tirpalai. Tiriamoje aplinkoje ląstelės buvo išlaikomos 96 val., ir praėjus nustatytam laikui buvo vertinamas išgyvenusiųjų ląstelių skaičius kiekvienoje tirtoje grupėje. Žuvusiomis buvo laikomos ląstelės praradusios turgorą per nustatytą laiką

Kiekviena testuojamojo tirpalo aktyvumo koncentracija ir kontrolinė terpė buvo tiriami atskira grupe iš 10 ląstelių. Tyrimas kiekvienai grupei buvo kartojamas 3 kartus.

3.4.2 Tričio poveikio bioelektriniam augalinės ląstelės parametrams tyrimas

Vertinant tričio poveikį menturdumblių elektrinėms savybėms, buvo tiriamos 4 ląstelių grupės (kiekvienoje grupėje po 10 ląstelių) veikiamos skirtingomis HTO aktyvumo koncentracijomis (7 kBq L^{-1} ; 15 kBq L^{-1} ; 30 kBq L^{-1} ; 65 kBq L^{-1}). Kiekvienoje grupėje, ląstelių membranų ramybės potencialas, bendroji membranos varža ir veikimo potencialo dinamika buvo matuojami kontrolinėmis sąlygomis, t.y. APW (tricio aktyvumo koncentracija buvo $2.6 \pm 0.4 \text{ Bq L}^{-1}$, tai yra reikšmė, artima mažiausiam išmatuojamam tričio tūrinio aktyvumo dydžiui), po to kontrolinė terpė centrinėje matavimo kameros dalyje buvo keičiama tirama HTO koncentracija. Praėjus 30 minučių nuo išorinės terpės pakeitimo į HTO buvo registruojami tie patys bioelektriniai ląstelės parametrai kaip ir vertinami kontrolinėmis sąlygomis. Gautų parametrų reikšmės buvo lyginamos su šių parametrų išmatuotomis kontrolinėmis sąlygomis vertėmis ir tokiu būdu buvo vertinamas skirtingų aktyvumo koncentracijų tričio poveikis.

Tričio poveikio chloro ir kalcio jonų transporto sistemoms, dalyvaujančioms augalinės ląstelės elektrinio atsako į dirgiklį formavime, tyrimui buvo panaudota 10 tarpubamblinių ląstelių. Cl^- , Ca^{2+} transporto sistemų tyrimas buvo atliekamas įtampos fiksacijos metodu pagal aprašytus 3.3.2 skyriuje (**3.4 pav.**) eksperimentų protokolus. Iš pradžių buvo registruojamos Cl^- , Ca^{2+} srovės kontrolinėmis sąlygomis (APW). Po to išorinė ląstelės terpė buvo keičiama į HTO + APW tirpalą, kuriame ląstelė buvo laikoma 30 min. Praėjus nustatytam laikui, buvo išmatuojamos atitinkamos srovės, o jų reikšmės palyginamos su kontrolinių eksperimentų duomenimis.

3.4.3. Suminio tričio ir aliuminio poveikio menturdumblių elektriniam aktyvumui tyrimas

Kadangi suminio tričio ir aliuminio poveikio tyrime tiriamų tirpalų paruošimui buvo naudojamas AlCl_3 , siekiant palaikyti vienoda chloro

koncentraciją visuose eksperimentų etapuose, APW, AlCl_3 + APW, AlCl_3 + HTO + APW tirpalų ruošimo metu vietoj buferio HEPES, pH 7.2 palaikymui ir chloro koncentracijos išlyginimui visuose tirpaluose buvo naudojamas vandenilio chloridas.

Siekiant įvertinti suminį tričio ir aliuminio poveikį augalinės ląstelės elektrinio atsako formavimo procesams, fiksuotos įtampos metodu buvo tiriamos K^+ , Cl^- ir Ca^{2+} srovės, dalyvaujančios veikimo potencialo generavime. Šių srovių matavimai vyko pagal aprašytus 3.3.2 skyriuje (**3.4 pav.**) eksperimentų protokolus dviejose ląstelių grupėse (kiekvienoje po 9 ląsteles). Pirmos grupės ląstelės elektrofiziologiškai buvo tiriamos iš pradžių APW, vėliau $1 \text{ M}^{-3} \text{AlCl}_3$ + APW tirpale išbuvus 30 minučių. Antroje ląstelių grupėje buvo atliekamos tos pačios eksperimento procedūros, tik vietoj $1 \cdot 10^{-3} \text{ M AlCl}_3$ + APW tirpalo buvo naudojamas $1 \cdot 10^{-3} \text{ M AlCl}_3$ + HTO + APW. Abiejose grupėse skirtingomis sąlygomis gauti rezultatai buvo palyginti ir įvertintas jų skirtumas.

3.4.4. Gretutinių reiškinių (angl. Bystander) tyrimas

Gretutiniai reiškiniai eksperimentuose buvo ištirtos 6 per bamblių sujungtų ląstelių poros. Pirmiausiai elektrofiziologiniai parametrai kontrolinėmis sąlygomis buvo registruojami pagal aprašytus 3.3.2 skyriuje (**3.3 ir 3.4 pav.**) eksperimentų protokolus vienoje iš per bamblių sujungtų ląstelių (**3.5 pav.**). Vėliau kita poros ląstelė buvo švitinama. Elektrofiziologiniai matavimai kaimyninėje nepaveiktoje ląstelėje buvo kartojami po 30 minučių gretimos ląstelės švitinimo. Atlikus šiuos matavimus, mikroelektrodas buvo ištraukiamas iš tiriamos ląstelės, o gretimos ląstelės švitinimas buvo tęsiamas toliau. Praėjus 22 val, mikroelektrodas vėl buvo įvedamas į tiriamąją ląstelę, o jos elektrofiziologiniai parametrai buvo vertinami praėjus 24 val nuo kitos ląstelės švitinimo pradžios. Trijų eksperimento etapų duomenys buvo palyginami tarpusavyje.

Taip pat buvo atlikti kontroliniai tyrimai, siekiant įvertinti galimą laiko įtaką tiriamiems parametrams. Šių eksperimentų metu buvo ištirtos dvi per

bamblį sujungtų tarpubamblinių ląstelių poros. Vienoje iš ląstelių buvo registruojami elektrofiziologiniai parametrai APW, o po to matavimai buvo kartojami toje pačioje ląstelėje po 24 val. APW. Parametrų registravimo eiga buvo išlaikoma tokia pati, kaip ir prieš tai aprašytuose gretutinių reiškinių tyrimo eksperimentuose.

Siekiant įvertinti elektrofiziologinius pokyčius, vykstančius tiesiogiai švitinamoje ląstelėje, buvo ištirtos 3 per bamblį sujungtų tarpubamblinių ląstelių poros. Šių eksperimentų metu elektrofiziologiniai matavimai buvo atliekami tiesiogiai švitinamoje ląstelėje, o ląstelės matavimo kameroje buvo talpinamos taip, kad būtų išlaikytas vienodas atstumas tarp matuojančio elektrodo ir JS šaltinio bei JS šaltinio ir tiriamos ląstelės paviršiaus kaip aprašyta 3.3.2 skyriuje (**3.5 pav.**). Tiriamieji parametrai buvo vertinami iš pradžių kontrolinėmis sąlygomis ir pakartotinai po 30 minučių apšvitos.

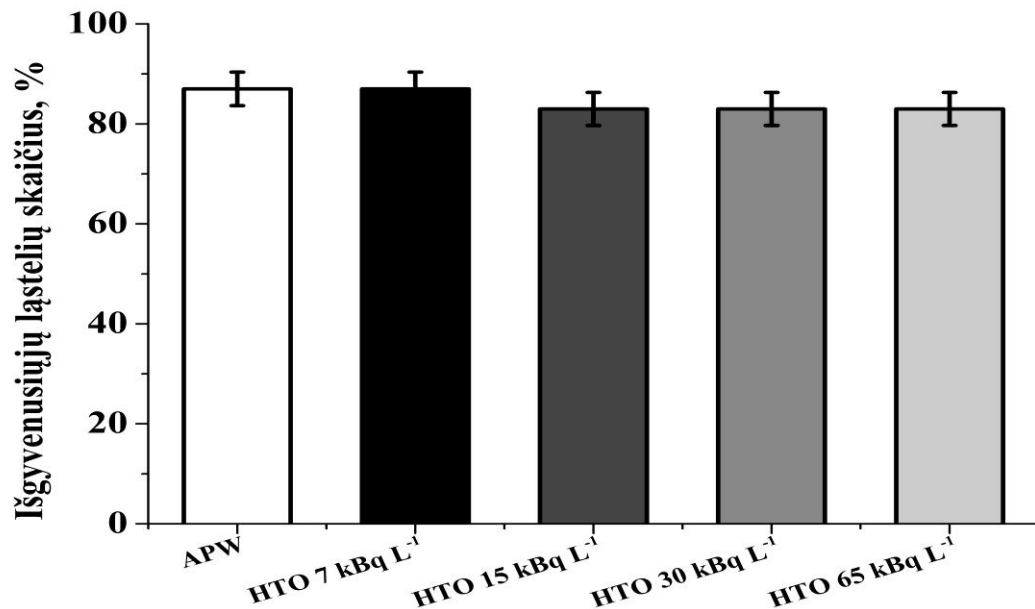
3.5. Duomenų apdorojimo, vaizdavimo ir statistinės analizės metodai:

Gautų duomenų analizei bei grafiniam vaizdavimui buvo naudojamos OriginPro 8.5, Microsoft Office Excel 2007 programos. Statistinė duomenų analizė buvo atliekama STATISTIKA 6.0 programos aplinkoje. Duomenų vidurkių skirtumų reikšmingumas buvo tikrinamas Student t-testu (skirtumas buvo laikomas reikšmingu, kai $p < 0.05$). Rezultatai pateikiami kaip vidurkis \pm standartinė paklaida.

4. REZULTATAI

4.1. Skirtingų tričio aktyvumo koncentracijų poveikis menturdumblių gyvybingumui

Skirtingų tričio aktyvumo koncentracijų poveikis menturdumblių gyvybingumui buvo vertinamas atliekant išgyvenamumo testą, pagal eksperimento protokolą, aprašytą 3.4.1. skyriuje. Ištyrus 150 tarpbamblių *Nitellopsis obtusa* ląstelių, jų gyvybingumui toksinio tričio poveikio aktyvumo koncentracijų diapazone nuo 7 kBq L^{-1} ÷ 65 kBq L^{-1} nustatyta nebuvo.



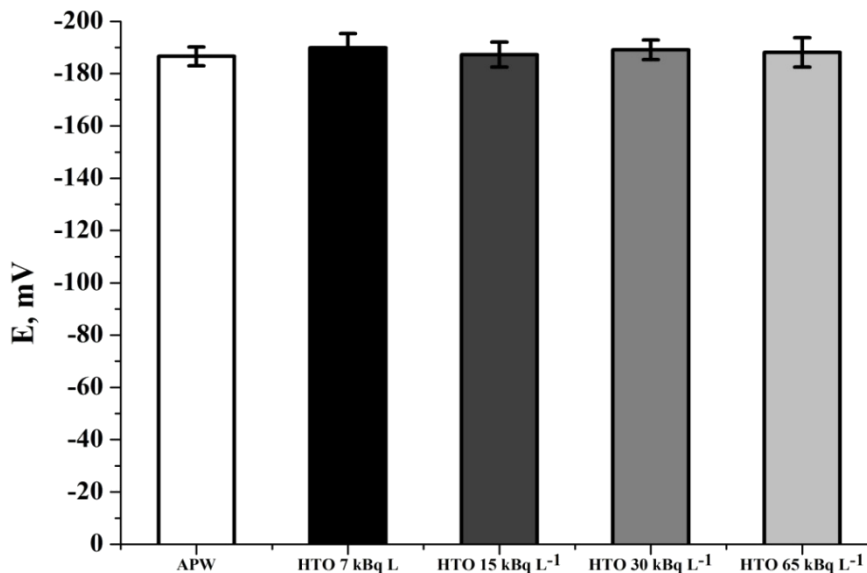
4.1. pav. Skirtingų tričio aktyvumo koncentracijų poveikis menturdumblių *Nitellopsis obtusa* gyvybingumui (n = 150: 5 grupės po 10 ląstelių, kiekvienai grupei tyrimas buvo kartojamas 3 kartus).

Remiantis pav. 4.1 duomenimis, matyti kad tirtų ląstelių, išgyvenusių 96 val. kontrolinėmis sąlygomis, skaičius ($86.7 \% \pm 3.3 \%$) yra palyginamas su išgyvenusių tą patį laiko tarpą HTO (7 kBq L^{-1} ; 15 kBq L^{-1} ; 30 kBq L^{-1} ; 65 kBq L^{-1}) tirpaluose. HTO 7 kBq L^{-1} tirpale visa testavimo laiką išgyveno $86.6 \% \pm 3.4 \%$ tirtų ląstelių, atitinkamai HTO 15 kBq L^{-1} , HTO 30 kBq L^{-1} , HTO 65 kBq L^{-1} tirpaluose išgyveno po $83.3 \% \pm 3.3 \%$ ląstelių.

Tokiu būdu, pasirinktas tričio aktyvumo koncentracijų intervalas pasirodė tinkamas subletalioms jonizuojančiosios spinduliuotės padariniams tirti.

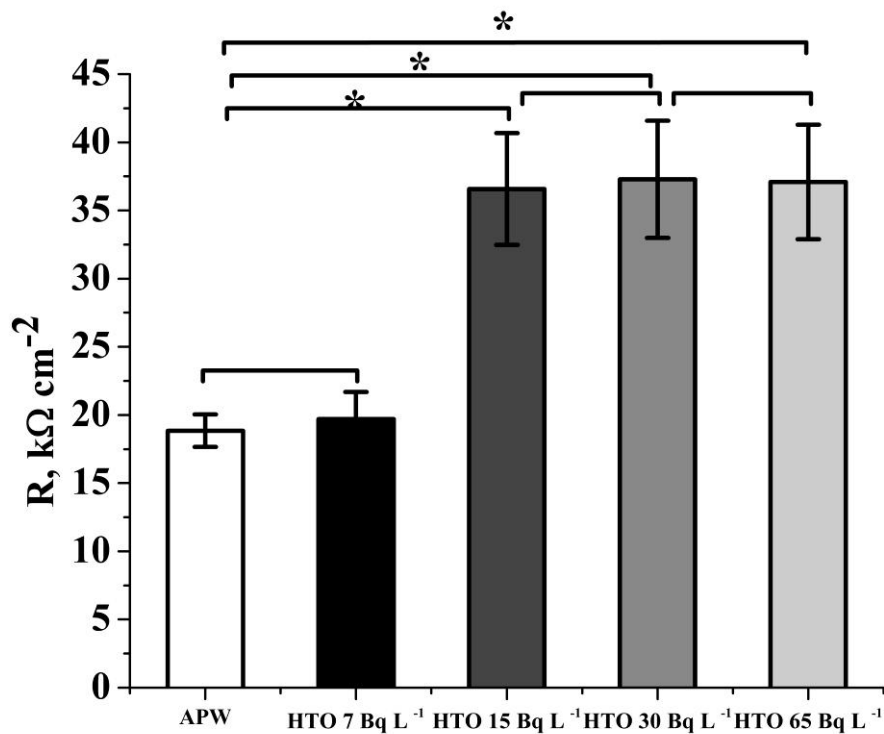
4.2. Tričio poveikis menturdumblių membranų bioelektriniams parametrams

Tirdami tričio poveikį menturdumblių *Nitellopsis obtusa* bioelektriniams membranos parametrams, pirmiausiai įvertinom skirtingų tričio aktyvumo koncentracijų (7, 15, 30 ir 65 kBq L⁻¹) įtaką ląstelių membranos ramybės potencialui (4.2 pav.) bei specifinei membranos varžai (4.3 pav.)



4.2. pav. Skirtingų tričio aktyvumo koncentracijų poveikis menturdumblių *Nitellopsis obtusa* membranos ramybės potencialui: kiekvienai HTO aktyvumo koncentracijai n = 10, APW n = 40

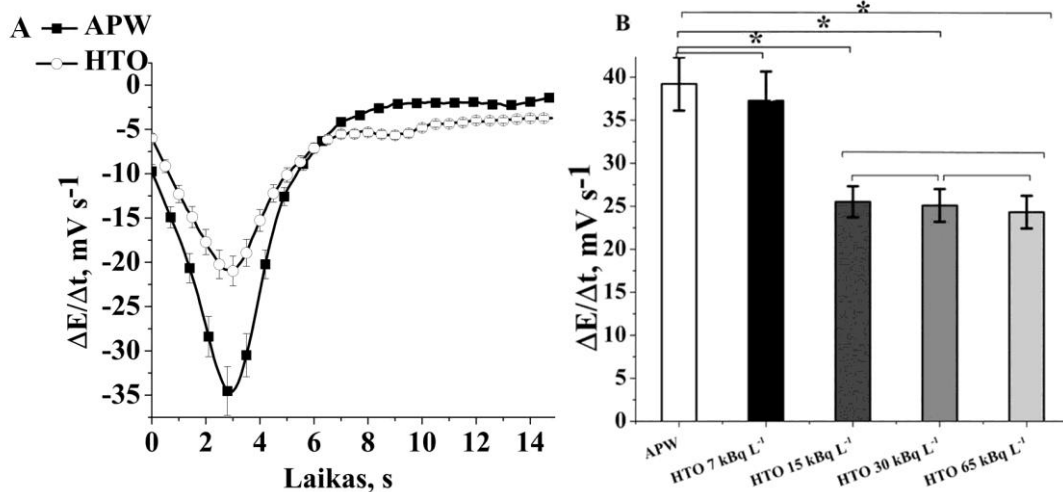
Tyrimų rezultatai parodė, kad visų tirtų aktyvumo koncentracijų tričio tirpalas neturėjo poveikio membranos ramybės potencialui.



4.3. pav. Skirtingų tričio aktyvumo koncentracijų poveikis menturdumblių *Nitellopsis obtusa* specifinei membranos varžai: kiekvienai HTO aktyvumo koncentracijai $n = 10$, APW $n = 40$; * - statistiškai reikšmingas skirtumas.

Menturdumblių specifinė membranos varža taip pat reikšmingai nekito, paveikus ląsteles HTO 7 kBq L^{-1} ($n = 10$). Tačiau, buvo pastebėta, kad tričio tirpalas su aktyvumo koncentracija 15 kBq L^{-1} didino bendrąją membranos varžą vidutiniškai 52 % ($\Delta = 17.72 \pm 1.9 \text{ k}\Omega \text{ cm}^{-2}$) ($n = 10$, $p = 0.005$). Sukeltas HTO 15 kBq L^{-1} varžos pokytis nepriklausė nuo tričio aktyvumo koncentracijos, ir buvo panašus veikiant ląsteles 30 kBq L^{-1} ir 65 kBq L^{-1} HTO.

Įvertinus tričio poveikį stacionarioms ląstelių membranų elektrinėms charakteristikoms, toliau buvo tiriamas skirtingų tričio aktyvumo koncentracijų poveikis menturdumblių elektrinio atsako (veikimo potencialo) formavimo mechanizmams. Pirmiausiai buvo analizuojamas tričio poveikis veikimo potencialo repoliarizacijos fazei. Tam buvo vertinamas membranos potencialo kitimo greitis veikimo potencialo greitosios repoliarizacijos fazėje, apskaičiuojamas pagal formulę (10) aprašytą skyriuje 3.3.2 (4.4 pav.)



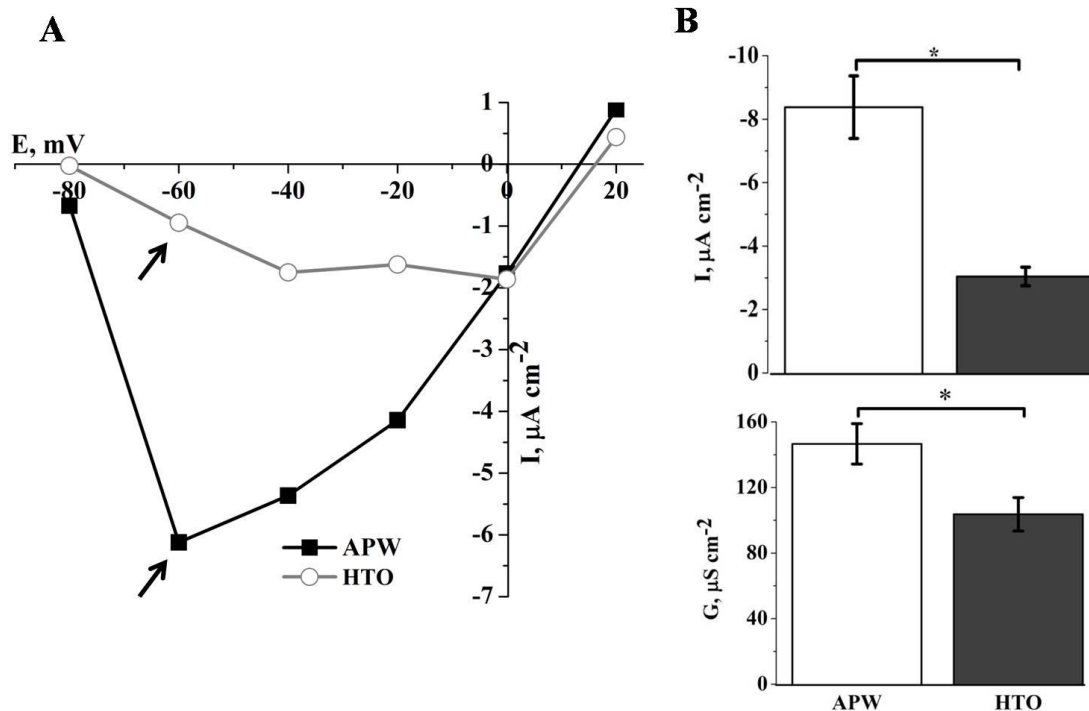
4.4. pav. Skirtingų tričio aktyvumo koncentracijų poveikis menturdumblių *Nitellopsis obtusa* membranos potencialo kitimo greičiui veikimo potencialo greitosios repoliarizacijos fazėje: A – membranos potencialo kitimo greičio veikimo potencialo greitosios repoliarizacijos fazėje priklausomybė nuo laiko (HTO - 15 kBq L⁻¹ HTO tirpalas), n = 10; B - skirtingų tričio aktyvumo koncentracijų poveikis menturdumblių *Nitellopsis obtusa* absoliučiam maksimaliam veikimo potencialo greitosios repoliarizacijos fazės greičiui (kiekvienai HTO aktyvumo koncentracijai n=10, * - statistiškai reikšmingas skirtumas)

Išanalizavus membranos potencialo kitimo greitį 15 sekundžių laikotarpyje nuo repoliarizacijos fazės pradžios, buvo nustatyta, kad stipriausias tričio poveikis šiam parametru stebimas per pirmąsias 2 - 4 s, kai membranos potencialo kitimo greitis būna didžiausias (4.4 pav. A). Atliktų tyrimų rezultatai parodė, kad kaip ir membranos ramybės potencialo bei bendrosios varžos atžvilgiu, 7 kBq L⁻¹ HTO reikšmingo poveikio membranos potencialo kitimui neturėjo. Paveikus menturdumblių ląsteles 15 kBq L⁻¹ HTO tirpalų, maksimalus membranos potencialo kitimo greitis sulėtėjo nuo kontrolinėmis sąlygomis buvusio 39.2 ± 3.1 mV s⁻¹ iki 25.5 ± 1.8 mV s⁻¹ po tričio poveikio. Tokiu būdu tritis nulėmė reikšmingą greitosios repoliarizacijos fazės greičio sumažėjimą 35% ($\Delta = 13.7 \pm 1.2$ mV s⁻¹, p = 0.006). Panašūs rezultatai buvo gauti, veikiant ląsteles 30 kBq L⁻¹ ir 65 kBq L⁻¹ HTO tirpalais,

todėl ir šiuo atveju, poveikio stiprumo priklausomybės nuo tričio aktyvumo koncentracijos nenustatyta.

Ištirus skirtingų aktyvumo koncentracijų tričio poveikį membranos ramybės potencialui, bendrajai membranos varžai bei membranos potencialo kitimo dinamikai veikimo potencialo greitosios repoliarizacijos fazėje, buvo nustatyta, kad 7 kBq L^{-1} HTO reikšmingo poveikio tirtiems parametrams neturėjo, o sukkelto 15 kBq L^{-1} , 30 kBq L^{-1} ir 65 kBq L^{-1} HTO poveikio stiprumas minėtiems parametrams nepriklausė nuo tričio aktyvumo koncentracijos, t.y. poveikio stiprumo skirtumai buvo nereikšmingi. Todėl tolimesniems tričio poveikio menturdumblių elektrogenezei tyrimams buvo naudojama 15 kBq L^{-1} HTO (toliau vadinama – HTO), kaip eksperimentiškai nustatyta mažiausią poveikį menturdumblių bioelektriniams parametrams turinti tričio aktyvumo koncentracija. Tokia tričio aktyvumo koncentracija apsprendžia $0.05 \text{ } \mu\text{Gy val}^{-1}$ išorinės dozės galią (Ulanovsky et al. 2008) virš gamtinio radiacinio fono ($0.1\text{-}0.14 \text{ } \mu\text{Gy val}^{-1}$), tačiau yra kelis tūkstančius kartų didesnė nei foninis tričio lygis Lietuvos gruntiniame, geriamajame vandenyje bei vandens telkiniuose.

Siekiant nustatyti tričio poveikį menturdumblių veikimo potencialo depoliarizacijos fazei, buvo tiriamas kalcio ir chloro jonų srovės tekančios per membraną elektrinio sužadavimo metu. Iš pradžių buvo vertinamas tričio poveikis įtampos valdomai išeinančiai Ca^{2+} srovei, paleidžiančiai veikimo potencialo generavimo procesą (**4.5 pav.**)

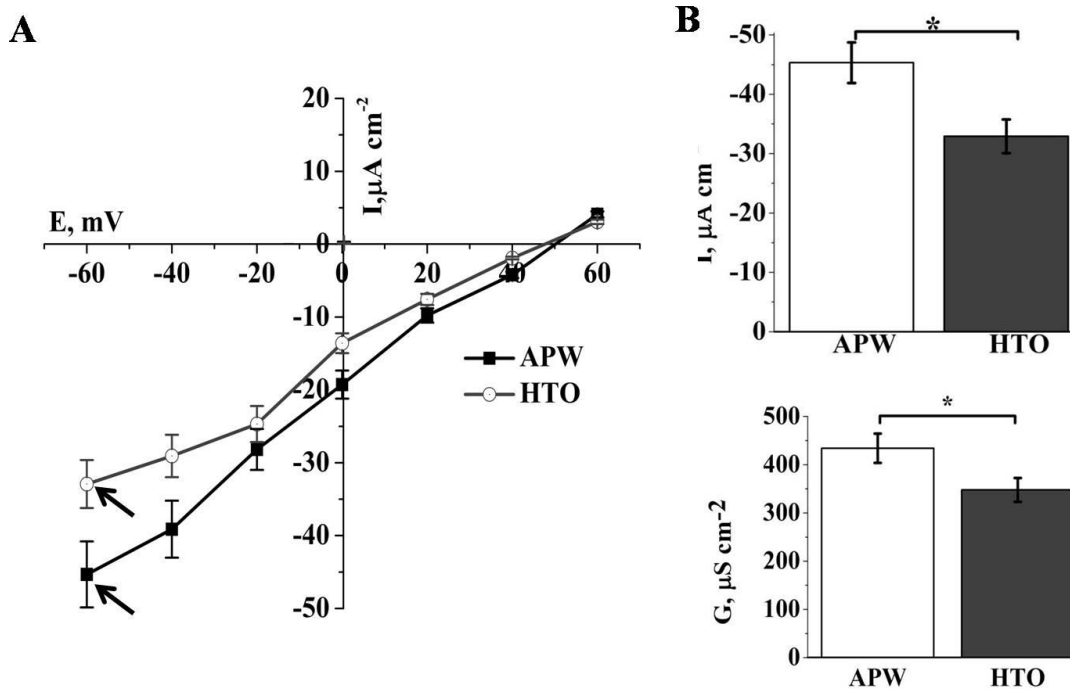


4.5. pav. Tričio poveikis menturdumblių *Nitellopsis obtusa* Ca²⁺ srovės tankiui veikimo potencialo generavimo metu (HTO - 15 kBq L⁻¹ HTO tirpalas) (n = 10): A – tipinė per membranos ploto vienetą tekančios Ca²⁺ srovės voltamperinė charakteristika APW ir HTO tirpaluose, rodyklės žymi taškus, kuriuose buvo vertinamas kalcio jonų srovės tankis ir membranos laidumas Ca²⁺; B: viršuje - kalcio jonų srovės tankis ties -60 mV įtampa; apačioje – membranos laidumas Ca²⁺, esant -60 mV įtampai (* - statistiškai reikšmingas skirtumas)

Tiriant *Nitellopsis obtusa* ląstelėse kalcio jonų srovę per membraną elektrinio sužadavimo metu, labiausiai HTO poveikis išryškėjo esant -60 mV įtampai, kur Ca²⁺ srovės tankis buvo didžiausias (4.5 pav. A). HTO sumažino maksimalios ištekančios kalcio jonų srovės tankį 64 % ($\Delta = -5.3 \pm 0.4 \mu\text{A cm}^{-2}$, $p = 0.001$). Tritis taip pat paveikė ir membranos laidumą kalcio jonams. Stipriausias HTO poveikis šiam parametru buvo ties -40 mV ÷ -60 mV įtampomis, kai membranos laidumas Ca²⁺ buvo didžiausias. Buvo nustatyta, kad, membranos laidumas kalcio jonams sumažėjo dėl tričio poveikio vidutiniškai 30 % ($p = 0.02$).

Vertinant tričio poveikį chloro jonų transportui veikimo potencialo generavimo metu, taip pat buvo analizuojama Cl⁻ srovės voltamperinė

charakteristika bei membranos laidumo chloro jonams priklausomybė nuo E (4.6 pav.)



4.6. pav. Tričio poveikis menturdumblių *Nitellopsis obtusa* Cl⁻ srovės tankiui veikimo potencialo generavimo metu (HTO - 15 kBq L⁻¹ HTO tirpalas) (n = 10): A – per membranos ploto vienetą tekančios Cl⁻ srovės voltamperinė charakteristika APW ir HTO tirpaluose, rodyklės žymi taškus kuriuose buvo vertinamas chloro srovės tankis ir membranos laidumas Cl⁻; B: viršuje - chloro jonų srovės tankis ties -60 mV įtampa; apačioje – membranos laidumas Cl⁻ chloro jonams esant -60 mV įtampai (* - statistiškai reikšmingas skirtumas)

Analizuodami Cl⁻ srovės voltamperinę charakteristiką, nustatėme, kad tritis taip pat slopina ir chloro išėjimą iš ląstelės menturdumblių elektrinio sužadavimo metu. Stipriausias tričio poveikis buvo stebimas ties -60 mV įtampa (4.4 A pav.), kai vidutinė maksimali Cl⁻ srovė sumažėjo nuo išmatuotos APW $-45.3 \pm 3.6 \mu\text{A cm}^{-2}$ iki $-32.9 \pm 2.4 \mu\text{A cm}^{-2}$ HTO tirpale. Tokiu būdu dėl tričio poveikio chloro išėjimas iš ląstelės sumažėjo 27 % ($\Delta = 12.4 \pm 1.1 \mu\text{A cm}^{-2}$, $p = 0.004$). Membranos laidumas chloro jonams taip pat sumažėjo nuo kontrolinėmis sąlygomis išmatuoto $430 \pm 30 \mu\text{S cm}^{-2}$ iki $340 \pm 20 \mu\text{S cm}^{-2}$

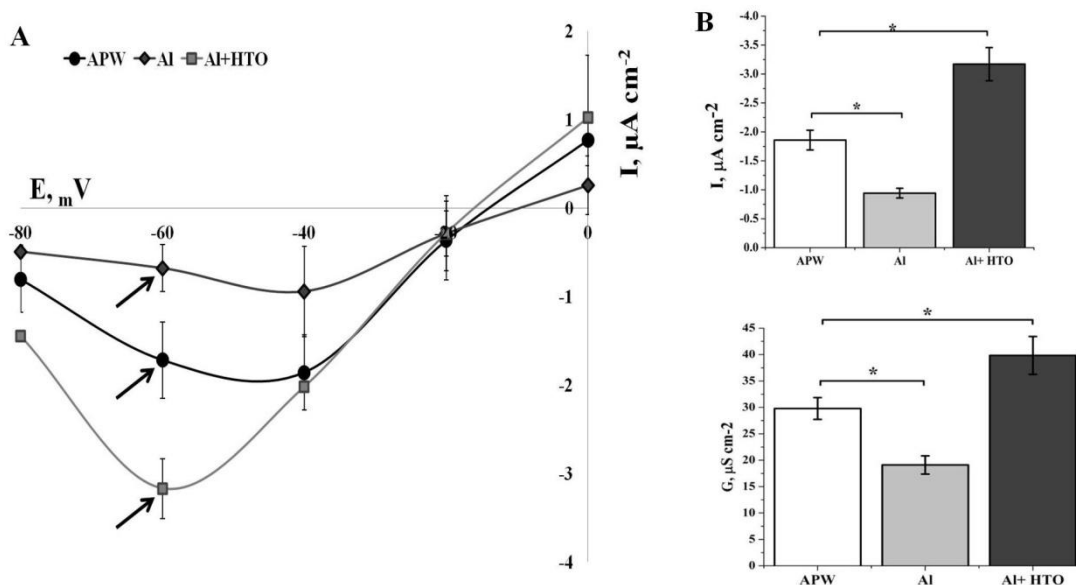
nustatyto HTO tirpale, kas nulėmė vidutinio maksimalaus membranos laidumo chloro jonams sumažėjimą 23% ($\Delta = 90 \pm 7 \mu\text{S cm}^{-2}$, $p = 0.02$).

Apibendrinant pateiktus šiame skyriuje duomenis, nustatyta kad mažą išorinės apšvitos dozę nulemiantis HTO didino *Nitellopsis obtusa* ląstelių specifinę membranos varžą, mažino Cl^- ir Ca^{2+} srovių tankį veikimo potencialo depoliarizacijos fazėje bei lėtino membranos potencialo kitimo greitį veikimo potencialo greitosios repoliarizacijos fazėje. Šie rezultatai parodė, kad menturdumblių bioelektriniai parametrai yra pakankamai jautrūs ypač mažoms JS dozėms ir gali būti naudojami mažų jonizuojančiosios spinduliuotės dozių poveikio tyrimuose.

4.3. Suminis tričio ir aliuminio poveikis menturdumblių jonų transporto sistemoms, dalyvaujančioms veikimo potencialo generavime

Kadangi, mažos jonizuojančiosios spinduliuotės dozės geba keisti organizmo reakcijas į kitus antropogeninius faktorius, siekėme nustatyti ar nedidelės aktyvumo koncentracijos tritis modifikuoja aliuminio poveikį augalinės ląstelės elektrogenezei neutralioje terpėje (pH 7.2). Buvo tiriamas tiek paties Al, tiek suminis aliuminio ir tričio (Al^+ HTO) poveikis *Nitellopsis obtusa* jonų transporto sistemoms (skyrius 3.4.2)

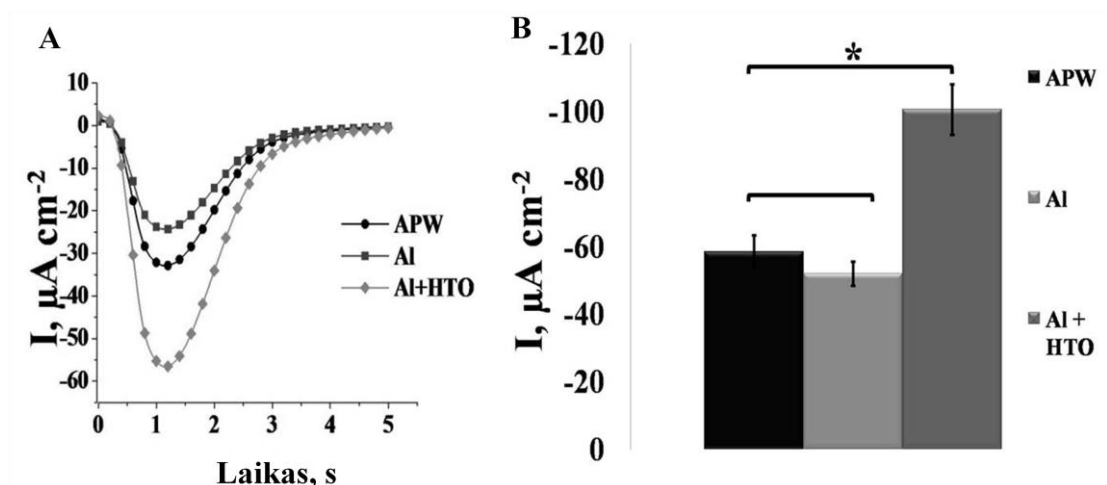
Pirmiausiai išanalizavome įtekančia kalcio jonų srovę sužadavimo metu **(4.7 pav.)**



4.7. pav. Menturdumblių *Nitellopsis obtusa* Ca^{2+} transmembraninis transportas veikimo potencialo generavimo metu APW, $\text{Al } 1 \text{ M}^{-3}$ ($n=9$) ir $1 \cdot 10^{-3} \text{ M Al} + 15 \text{ kBq L}^{-1} \text{ HTO}$ ($n=9$) tirpaluose: A – per membranos ploto vienetą tekančios Ca^{2+} srovės voltamperinė charakteristika, rodyklėmis nurodytas taškas, ties kuriuo buvo vertinamas kalcio srovės tankis ir membranos laidumas Ca^{2+} ; B – viršuje: Ca^{2+} srovės tankis esant -60 mV įtampai; apačioje: maksimalus membranos laidumas Ca^{2+} (* - statistškai reikšmingas skirtumas).

Sudarę per membranos ploto vienetą tekančios Ca^{2+} srovės voltamperinę charakteristiką (4.7 A pav.), nustatėme, kad aliuminis $49 \pm 9 \%$ mažino įeinančios krypties Ca^{2+} srovės tankį ($p = 0.03$) ir slopino membranos laidumą Ca^{2+} $38 \pm 9 \%$ ($p = 0.01$). Tačiau, suminis Al ir HTO poveikis Ca^{2+} transportui per membraną sužadavimo metu buvo priešingas. Paveikus ląsteles aliuminio ir tričio mišinių, Ca^{2+} srovės tankis padidėjo $69 \pm 9 \%$ ($p = 0.03$), o membranos laidumas kalcio jonams išaugo $33 \pm 9 \%$ ($p = 0.04$), lyginant su kontrolinėmis sąlygomis išmatuotais šių parametų dydžiais (4.7 B pav.). Pažymėtina, kad $15 \text{ kBq L}^{-1} \text{ HTO}$ be Al sąlygojo šių parametų sumažėjimą (4.5 B pav.), panašiai kaip ir atskiro Al poveikio atveju.

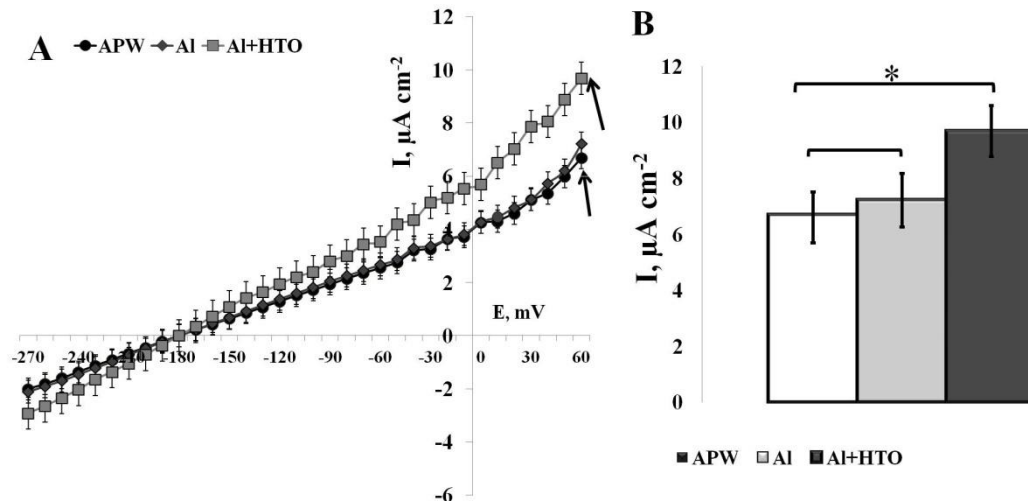
Taip pat ištyrėme suminį tričio ir aliuminio poveikį chlorinės srovės tankiui veikimo potencialo metu (4.8 pav.).



4.8. pav. Menturdumblių *Nitellopsis obtusa* Cl⁻ srovės tankis veikimo potencialo generavimo metu APW, 1 10⁻³ M Al (n = 9) ir 1 10⁻³ M Al + 15 kBq L⁻¹ HTO (n = 9) tirpaluose: A – tipinis Cl⁻ srovės tankio braižas ties -60 mV įtampa; B – Cl⁻ srovės tankis ties -60 mV įtampa (* - statistiškai reikšmingas skirtumas).

Registruojama chloro jonų srovė pasiekė didžiausią reikšmę per pirmąsias 1-1.5 s nuo jos aktyvacijos (4.8 A pav.). Buvo nustatyta, kad, pats aliuminis šiek tiek slopina Cl⁻ išėjimą iš ląstelės (Cl⁻ srovė mažėjo 11 ± 8 %), tačiau šis poveikis buvo nereikšmingas. Atskiras HTO poveikis pasireiškė reikšmingu Cl⁻ transporto iš ląstelės slopinimu (4.6 pav.). Tuo tarpu, suminis Al ir HTO poveikis nulėmė išeinančios krypties chloro jonų srovės tankio padidėjimą 71 ± 8 % (p = 0.004) lyginant su šios srovės tankiu, apskaičiuotu kontrolinėmis sąlygomis.

Tirdami K⁺ transportą iš ląstelės į išorinę terpę, pastebėjome, kad aliuminis išeinančios krypties K⁺ srovės tankiui poveikio neturėjo (4.9 pav.). Kalbant apie galimą HTO poveikį K⁺ transportui, galima daryti prielaidą, kad dėl HTO galėjo būti slopinamas K⁺ transportas iš ląstelės VP generavimo metu, nes buvo nustatytas reikšmingas VP greitos repoliarizacijos fazės, kuria daugiausiai apsprendžia ištekanti kalio jonų srovė, greičio sumažėjimas (4.4 pav.). Tačiau, bendras Al ir HTO poveikis pasireiškė maksimalios K⁺ srovės stiprumo padidėjimu 45 ± 9 % (p = 0.004) (4.9 B pav.).



4.9. pav. Ištekiančios krypties K^+ srovės tankis *Nitellopsis obtusa* ląstelėms esant ramybės būsenoje APW, $1 M^{-3} Al$ ($n = 9$) ir $1 M^{-3} Al + 15 kBq L^{-1} HTO$ ($n = 9$) tirpaluose: A – per membranos ploto vienetą tekančios K^+ srovės voltamperinė charakteristika, rodyklės žymi tašką, ties kuriuo buvo vertinamas kalio srovės tankis; B – ištekiančios krypties K^+ srovės tankis ties 60 mV įtampa (* - statistiškai reikšmingas skirtumas).

Apibendrinant šio tyrimų etapo rezultatus, galima daryti išvada, kad tritis modifikuoja aliuminio poveikį menturdumblių jonų transporto per membraną sistemoms neutralaus. Aliuminis ir tritis kartu skirtingai veikė Ca^{2+} ir Cl^- transportą per *Nitellopsis obtusa* ląstelių membraną, lyginant su abiejų veiksnių atskiru poveikiu šiems parametrams. Menturdumblių bioelektrinė reakciją į suminį Al ir HTO poveikį buvo panaši į augalinėse ląstelėse stebimą atsaką į toksinį aliuminio poveikį, todėl galima daryti prielaidą, kad tritis gali būti svarbiu veiksniu įtakojančiu aliuminio biologinio toksiškumo išraišką.

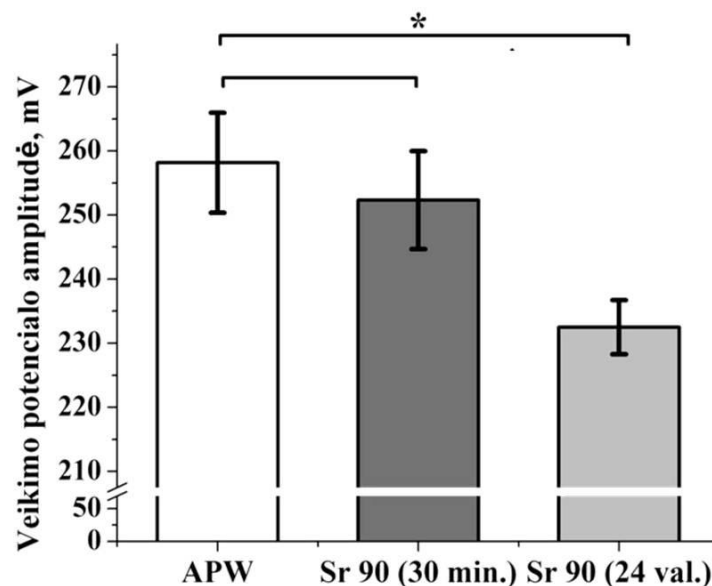
4.4. Jonizuojančiosios spinduliuotės sukeltų gretutinių reiškinių tyrimas

Švitindami vieną iš dviejų per bamblių sujungtų *Nitellopsis obtusa* tarpbamblių ląstelių uždaru neskvarbios jonizuojančiosios spinduliuotės šaltiniu, stebėjome kaimyninės neapšvitintos ląstelės bioelektrinio aktyvumo pokyčius kaip gretutinio efekto išraišką. Tyrimų rezultatai parodė, kad ląstelės švitinimas nesukėlė kaimyninėje neapšvitintoje ląstelėje membranos ramybės potencialo bei bendrosios membranos varžos pakitimų (4.1 lentelė)

4.1 lentelė. Skirtingos trukmės ląstelės švitinimo uždaru stroncio radioaktyvaus izotopo Sr 90 šaltiniu poveikis kaimyninės nepaveiktos *Nitellopsis obtusa* ląstelės membranos ramybės potencialui bei specifinei membranos varžai (n = 6)

Švitinamos ląstelės išorinė terpė	Gretimos nepaveiktos ląstelės membranos parametras	
	Specifinė membranos varža R, $k\Omega\text{ cm}^{-2}$	Membranos ramybės potencialas RP, mV
APW	13.4 ± 0.4	-223 ± 3.1
Sr 90 (30 min)	13.4 ± 0.4	-226.1 ± 3.7
Sr 90 (24 val)	13.6 ± 0.2	-225.1 ± 6.5

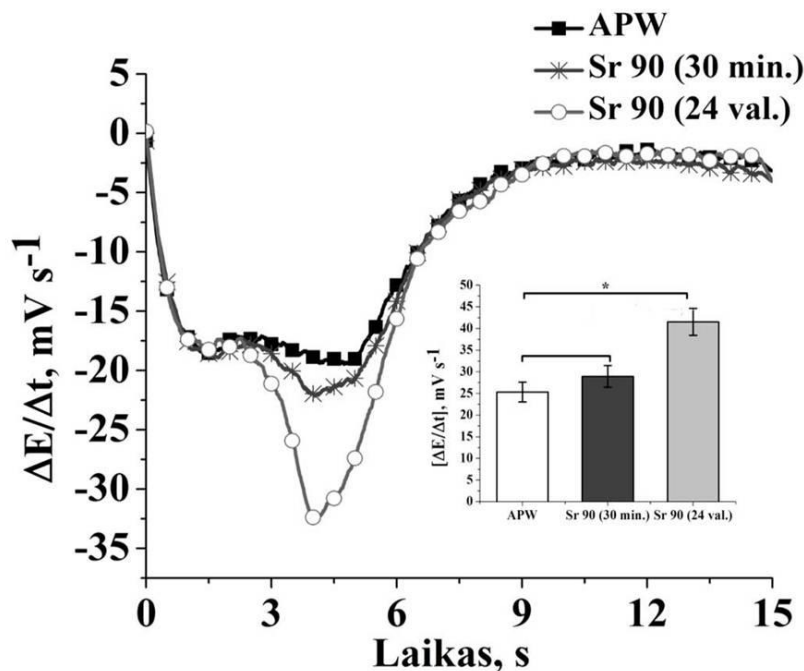
Tirdami veikimo potencialo dinamiką, nustatėme, kad, vienos iš ląstelių apšvita, kaimyninėje neapšvitintoje ląstelėje sukėlė elektrinio atsako braižo pokytį (4.10 pav.)



4.10 pav. Veikimo potencialo amplitudės kaimyninėje nepaveiktoje *Nitellopsis obtusa* ląstelėje priklausomybė nuo gretimos ląstelės švitinimo uždaru stroncio radioaktyvaus izotopo Sr 90 šaltiniu trukmės: Sr 90 (30 min) – ekspozicijos laikas 30 min.; Sr 90 (24 val) - ekspozicijos laikas 24 val), n = 6, * - statistiškai reikšmingas skirtumas.

Pastebėjome, kad, ląstelės švitinimas 30 minučių nesukėlė ženklaus poveikio veikimo potencialo amplitudės dydžiui kaimyninėje ląstelėje. Tačiau ekspozicijos laikui pailgėjus iki 24 valandų, kaimyninės ląstelės veikimo potencialo amplitudė reikšmingai sumažėjo per 23.3 ± 2.6 mV ($p = 0.015$).

Toliau analizuodami veikimo potencialo braižą, nustatėme, kad dėl vienos iš ląstelių apšvitos, kaimyninėje ląstelėje taip pat kito ir repoliarizacijos fazės dinamika (4.11 pav.)

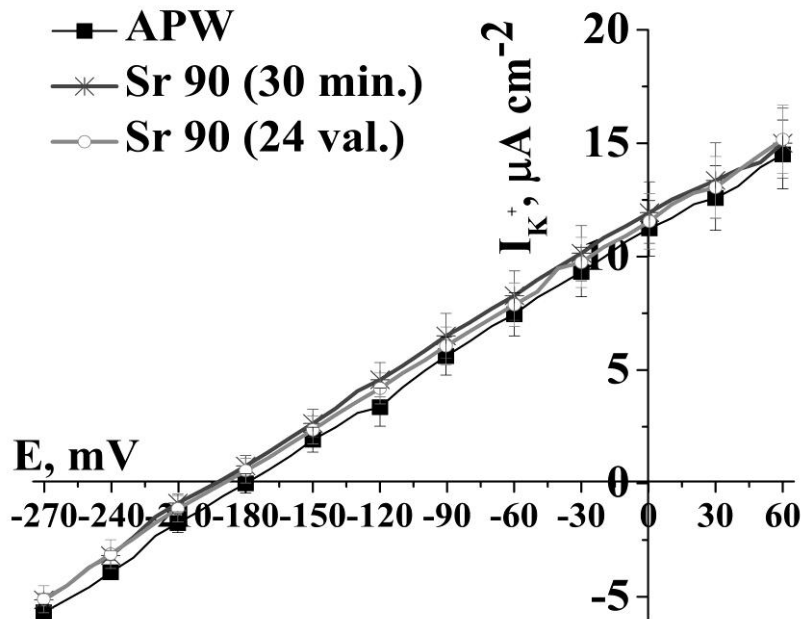


4.11 pav. Tipinė neapšvitintos *Nitellopsis obtusa* ląstelės membranos potencialo kitimo greičio veikimo potencialo greitosios repoliarizacijos fazėje priklausomybė nuo gretimos ląstelės švitinimo uždaru stroncio radioaktyvaus izotopo Sr 90 šaltiniu trukmės: Sr 90 (30 min.) – ekspozicijos trukmė 30 min; Sr 90 (24 val.) – ekspozicijos trukmė 24 val): *intarpas*: - skirtingos trukmės švitinimo uždaru stroncio radioaktyvaus izotopo Sr 90 šaltiniu poveikis neapšvitintos kaimyninės *Nitellopsis obtusa* ląstelės absoliučiam maksimaliam veikimo potencialo greitosios repoliarizacijos fazės greičiui ($n = 6$, * - statistiškai reikšmingas skirtumas)

Tiriant veikimo potencialo repoliarizacijos fazės dinamiką, pastebėjome kad gretimos ląstelės 30 min švitinimas neturėjo reikšmingos įtakos kaimyninės ląstelės membranos potencialo kitimo greičiui veikimo potencialo greitosios repoliarizacijos fazėje (4.11 pav.). Tačiau, pailgėjus švitinimo laikui

iki 24 val kaimyninės ląstelės greitosios repoliarizacijos fazės maksimalus greitis išaugo 64 % ($\Delta = 16.2 \pm 1.8 \text{ mV s}^{-1}$) lyginant su kontrolinėmis sąlygomis išmatuotu greičiu ($p = 0.027$).

Siekdami įvertinti gretutinio efekto išraišką menturdumblių jonų pernašos per membraną sistemų veikloje, ištyrėme ramybės būsenoje per membraną tekančią K^+ srovę, bei elektrinio sužadavimo metu aktyvuojamą Cl^- srovę.

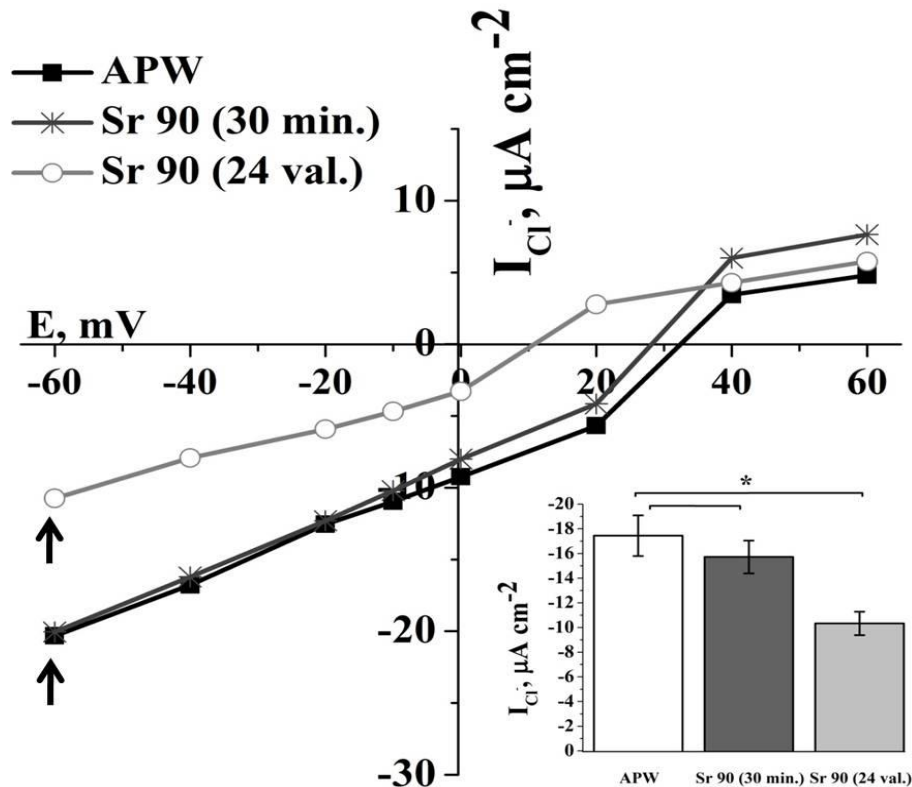


4.12 pav. Per membranos ploto vienetą tekančios K^+ srovės voltamperinės charakteristikos nepaveiktoje *Nitellopsis obtusa* ląstelėje priklausomybė nuo gretimos ląstelės švitinimo uždaru stroncio radioaktyvaus izotopo Sr 90 šaltinio trukmės ($n = 6$): Sr 90 (30 min) – ekspozicijos laikas 30 min; Sr 90 (24 val.) - ekspozicijos laikas 24 val.).

Išnagrinėję per membranos ploto vienetą tekančios kalio jonų išeinančios krypties srovės voltamperines charakteristikas, nustatėme, kad vienos iš per bamblių sujungtų menturdumblių ląstelių švitinimas tiek 30 minučių, tiek ir 24 valandas nesukėlė kaimyninėje ląstelėje K^+ transporto iš ląstelės pokyčių ramybės būsenoje (4.12 pav.).

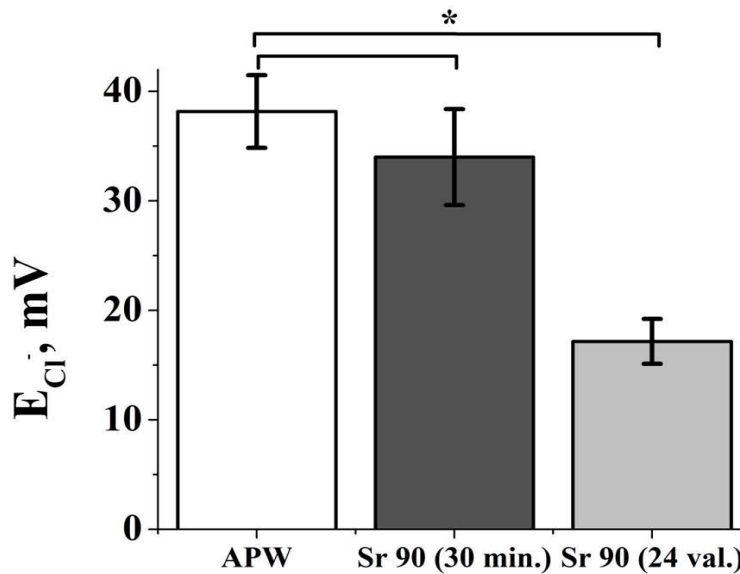
Chloro jonų srovės tyrimai parodė, kad vienos iš ląstelių 30 min neturėjo reikšmingo poveikio Cl^- transportui iš kaimyninės ląstelės elektrinio sužadavimo metu (4.13 pav.) Tačiau jonizuojančiosios spinduliuotės šaltinio ekspozicijos trukmės pratęsimas iki 24 valandų iššaukė ženklų išeinančios

krypties Cl^- srovės tankio sumažėjimą kaimyninėje ląstelėje. Tokiu būdu Cl^- srovės tankis sumažėjo 41 % ($\Delta = -7.11 \pm 0.75 \mu\text{A cm}^{-2}$, $p = 0.03$)



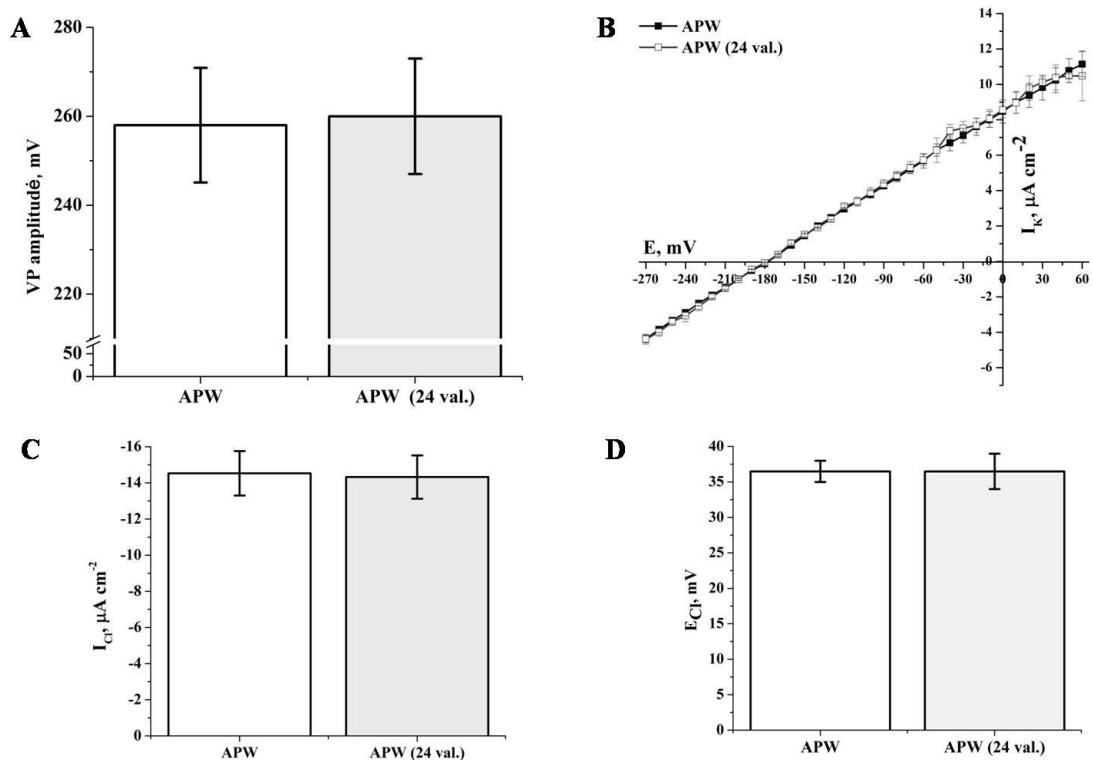
4.13 pav. Tipinės per membranos ploto vienetą tekančio Cl^- srovės voltamperinės charakteristikos nepaveiktoje *Nitellopsis obtusa* ląstelėje priklausomybė nuo gretimos ląstelės švitinimo uždaru stroncio radioaktyvaus izotopo Sr 90 šaltiniu trukmės: Sr 90 (30 min.) – ekspozicijos laikas 30 min.; Sr 90 (24 val.) - ekspozicijos laikas 24 val.), rodyklės žymi įtampos vertes, ties kuriomis buvo vertinamas chloro srovės tankis; *intarpas*: Cl^- srovės tankio ties -60 mV įtampa priklausomybė nuo gretimos ląstelės švitinimo trukmės ($n = 6$, * - statistiškai reikšmingas skirtumas)

Išanalizavus per membranos ploto vienetą tekančios chloro srovės voltamperinę charakteristiką, pastebėjome, kad po 24 val. trukusios vienos iš ląstelių apšvitos, kaimyninėje neapšvitintoje ląstelėje ne tik sumažėjo chloro srovės stiprumas, bet ir chloro jonų reversijos potencialas pasislinko mažėjimo kryptimi. Nustatėme, kad dėl 24 val. ląstelės švitinimo, jos kaimyninėje ląstelėje Cl^- reversijos potencialas pakito nuo užregistruoto kontrolinėmis sąlygomis 38 ± 3 mV iki 17 ± 2 po apšvitinimo (4.14 pav.). Taigi reversijos potencialo pokytis sudarė 45 % ($p = 0.009$).



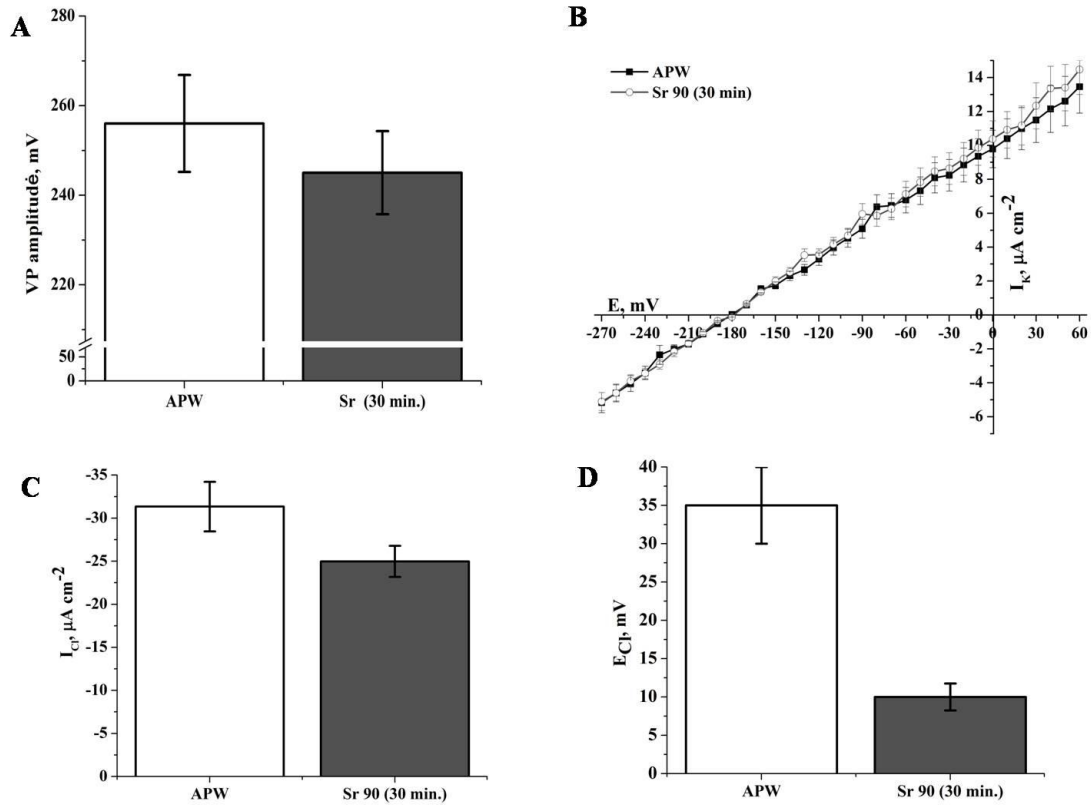
4.14 pav. Cl^- srovės reversijos potencialo nepaveiktoje *Nitellopsis obtusa* ląstelėje priklausomybė nuo gretimos ląstelės švitinimo uždaru stroncio radioaktyvaus izotopo Sr 90 šaltiniu trukmės: Sr 90 (30 min.) – ekspozicijos laikas 30 min.; Sr 90 (24 val.) - ekspozicijos laikas 24 val.), n = 6, * - statistiškai reikšmingas skirtumas

Siekiant įvertinti, ar galėjo turėti įtakos nustatytiems bioelektrinių parametrų pokyčiams neapšvitintoje ląstelėje, menturdumblių buvimo APW trukmė, atlikome kontrolinius tyrimus. Vienoje iš per bamblių sujungtų menturdumblių ląstelių patikrinom, kaip skiriasi veikimo potencialo amplitudė, per membranos ploto vienetą tekančios K^+ srovės voltamperinė charakteristika, Cl^- srovės tankio ir reversijos potencialo reikšmės atliekant standartinius matavimus kontrolinėmis sąlygomis eksperimento pradžioje ir išlaikius ląsteles APW 24 val. (4.15 pav.). Kontrolinių tyrimų rezultatai parodė, kad visų tiriamų parametrų vertės APW tirpale eksperimento pradžioje ir praėjus 24 val. reikšmingai nesiskyrė. Tokiu būdu, galima daryti prielaidą, kad ląstelių buvimo APW tirpale trukmė neturi įtakos nustatytiems neapšvitintoje ląstelėje elektrinių parametrų pokyčiams dėl jos kaimyninės ląstelės švitinimo.



4.15 pav. Laiko įtaka tiriamiems bioelektriniams parametrams, atliekant matavimus vienoje iš per bamblių sujungtų *Nitellopsis obtusa* ląstelių kontrolinėmis sąlygomis eksperimento pradžioje (APW) ir išlaikius APW 24 val. (APW (24 val.)), $n = 2$: **A** – veikimo potencialo amplitudė; **B** – per membranos ploto vienetą tekančios K^+ srovės voltamperinė charakteristika; **C** – ištekančios Cl^- srovės tankis ties -60 mV įtampa; **D** – Cl^- srovės reversijos potencialas.

Taip pat patikrinom, kaip kinta tiriami bioelektriniai parametrai tiesiogiai švitinamoje uždaru radioaktyvaus stroncio izotopo šaltiniu Sr 90 ląstelėje. Šių eksperimentų metu elektrofiziologinius matavimus atlikome vienoje iš per bamblių sujungtų *Nitellopsis obtusa* ląstelių, kuri ir buvo švitinama (**4.16 pav.**)



4.16 pav. Tiriamų bioelektrinių parametų kitimas tiesiogiai švitinamoje uždaru stroncio radioaktyvaus izotopo Sr 90 šaltiniu (Sr 90 (30 min.) – ekspozicijos laikas 30 min.) ląstelėje, $n = 3$: A – veikimo potencialo amplitudė; B – per membranos ploto vienetą tekančios K^+ srovės voltamperinė charakteristika; C – ištekiančios Cl^- srovės tankis ties -60 mV įtampa; D - Cl^- srovės reversijos potencialas.

Šių eksperimentų rezultatai parodė, kad tiesiogiai švitinamoje ląstelėje jau po 30 min apšvitos buvo galima stebėti panašias tendencijas bioelektrinių parametų pokyčiuose, kurie buvo nustatyti tiesiogiai nepaveiktoje ląstelėje po 24 val. jos kaimyninės ląstelės švitinimo. Pastebėjome, kad K^+ transportas iš ląstelės jai esant ramybės būsenoje beveik nekito (**4.16 B pav.**). Taip pat, kaip ir tiesiogiai neapšvitintoje ląstelėje, šių tyrimų rezultatai parodė VP amplitudės, chloro srovės tankio ir reversijos potencialo tiesiogiai veikiamoje ląstelėje mažėjimo tendenciją jau po 30 min. apšvitos.

5. REZULTATŲ APITARIMAS

5.1 Tričio poveikis menturdumblių membranų elektrofiziologiniams parametrams

Atliktų tyrimų rezultatai parodė, kad tritis veikia menturdumblių elektrogenezės procesus. Pažymėtina tai, kad mūsų eksperimentuose naudota 15 kBq L^{-1} tričio aktyvumo koncentracija jau po 30 minučių ekspozicijos buvo veiksminga *Nitellopsis obtusa* bioelekcinio aktyvumo atžvilgiu, nepaisant to, kad toks tričio tūrinis aktyvumas sąlygoja tik $0.05 \mu\text{Gy h}^{-1}$ išorinės apšvitos dozės galią virš natūralaus radiacinio fono. Tokia dozės galia yra daug mažesnė nei neseniai Europos Sąjungoje pasiūlyta $10 \mu\text{Gy h}^{-1}$ dozės galios riba, žemiau kurios poveikis gėlavandenėms ekosistemoms laikomas nereikšmingu.. Tokiu būdu mūsų darbo rezultatai parodo menturdumblių, kaip testinių organizmų, elektrofiziologinių savybių išskirtinį radiojautrumą, kas suteikia galimybę juos naudoti mažų jonizuojančiosios spinduliuotės dozių subletalus poveikio bei biotos apšvitos vertinimo tyrimuose. Tričio sukeltas ženklus bendrosios membranos varžos padidėjimas byloja apie ląstelės membranoje esančių jono pernašos sistemų veiklos slopinimą. Panašus rezultatai parodyti ir pelių embrionuose, kurių fibroblastų membranos pralaidumas jonams mažėjo dėl jonizuojančiosios spinduliuotės poveikio (Santini et al. 1992). Tai, kad dėl tričio pakito jonų transportas per membraną patvirtina ir mūsų Cl^- ir Ca^{2+} pernašos sistemų veiklos *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranų elektrinio sužadavimo metu tyrimų rezultatai, kurie parodė, kad, 15 kBq L^{-1} aktyvumo koncentracijos HTO ženkliai sumažino kalcio ir chloro srovių tankį (**4.5 ir 4.6 pav.**). Patekęs į ląstelės vidų HTO gali iš dalies pavirsti į organiškai surištą tritį (angl. OBT – organically bound tritium), kurio biologinis elgesys yra labai kompleksiškas. Augaluose daugiausia OBT pasigamina fotosintezės proceso metu, kuris iš dalies reguliuojamas bioelektrocheminės sistemos (Lautner 2005), todėl poveikis jos veiklai gali turėti įtakos fotosintezės aktyvumui ir su tuo susijusiu tričio įsisavinimo augalinėje ląstelėje dėsninumui. Yra žinoma, kad, tričio radiotoksiškumas

didėja jam susijungus su kitomis biologinėmis molekulėmis (Bradshaw & Jaeschke 2013). Todėl, dėl galimos tričio sąveikos su membranos jonų kanalus formuojančiais baltymais galėtų pakisti jonų kanalų, įskaitant ir chloro transporto sistemas, struktūrą bei funkcijas, sąlygojančios membranos laidumo atskiriems jonams pokyčius. Be tiesioginio tričio poveikio jonų transporto sistemų molekulinėms struktūroms, per vandens radiolizės procesą HTO gali sukelti ROS gamybos padidėjimą. Netiesioginis HTO poveikis ląstelėms susijęs su O-H ryšių nutrūkimu vandens molekulėse, susidarant hidroksilo radikalams (OH^\bullet), superoksidui ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ir vandenilio peroksidui (H_2O_2). Augaluose, kaip ir gyvūnuose priminiiais ROS taikiniai gali būti membranų fosfolipidai, baltymai, jonų pernašą reguliuojantys mechanizmai. Nustatyta, kad gyvūnų ląstelėse ROS įtakoja membranų elektrines savybes lėtindami veikimo potencialo depoliarizaciją, mažindami jo amplitudę ir trukmę. Parodyta, kad šis poveikis siejamas su Na^+ , įeinančios krypties K^+ , ar ATP jautriais K^+ ir Ca^{2+} kanalų slopinimu, ištekiančios krypties K^+ srovės, neselektyviųjų katijonų kanalų ir Ca^{2+} srovės susijęs susijusio su viduląstelinės Ca^{2+} koncentracijos palaikymu aktyvacija (Kourie 1998). Tokiu būdu, tričio toksiškumas, taip pat gali būti susijęs su dėl HTO padidėjusiu ROS, kurie gali inaktyvuoti chloro kanalus (Jeulin et al, 2000; Barth et al., 1993, Thomas et al., 2007). Kitą vertus, pastebėtas chloro srovės tankio sumažėjimas gali atspindėti ne tik tiesioginį HTO ar dėl jo padaugėjusių ROS poveikį anijonų kanalams, bet ir radiacijos sukeltus kalcio jonų homeostazės pokyčius. Augaluose kalcis yra labai svarbi signalinė molekulė, dalyvaujanti stresinio atsako į daugeliu aplinkos veiksnių formavime (Song et al. 2008). Be to, yra žinoma, kad augalinėje ląstelėje Cl^- srovės amplitudės dydis yra proporcingas Ca^{2+} koncentracijai citoplazmoje (Berestovsky & Kataev 2005). Mūsų tyrimuose taip pat buvo stebima koreliaciją tarp Ca^{2+} jonų transporto ir išeinančios krypties Cl^- srovės pokyčių membranos elektrinio sužadavimo metu: įeinančios Ca^{2+} srovės tankio sumažėjimas buvo lydimas chloro jonų išėjimo iš ląstelės intensyvumo slopinimu (**4.5 ir 4.6 pav.**). Tai gali būti aiškinama tuo, kad, dėl mažesnio Ca^{2+} kiekio patekimo į ląstelės vidų sužadavimo metu, galėjo

sumažėti atidarytų įtampos ir Ca^{2+} valdomų Cl^- kanalų skaičius. Kalcio jonai vaidina svarbų vaidmenį apsaugant augalinės ląstelės sienelę nuo galimų struktūrinių pažeidimų dėl radiacijos poveikio (Kovács & Keresztes 2002). Todėl HTO sukeltas įeinančios Ca^{2+} srovės tankio mažėjimas, taip pat gali pranašauti apie sumažėjusi išorinio augalinės ląstelės barjero atsparumą aplinkos veiksniams. Augalinėse ląstelėse Ca^{2+} yra svarbus ne tik chloro bet ir kalio jonų transportui. Tričio poveikį K^+ pernašos sistemoms mes galime vertinti analizuodami membranos potencialo kitimo dinamiką veikimo potencialo repoliarizacijos fazėje. Mūsų tyrimų rezultatai parodė, kad, HTO paveikia *Nitellopsis obtusa* ląstelių elektrinio atsako dinamiką, mažindamas membranos potencialo atsistatymo po sužadavimo greitį (žr. **4.4 pav.**). Šis reiškinys gali būti susijęs su tričio poveikiu kelioms jonų transporto sistemoms: išeinančios krypties K^+ kanalams, išeinančios krypties Cl^- kanalams, H^+ -ATPazei. Yra parodyta, kad augaluose elektrinio sužadavimo metu padidėjusi ištekančios krypties Cl^- srovė dėl didesnio atidarytų chloro kanalų skaičiaus, ar jų buvimo atviroje būsenoje laiko pailgėjimo, gali būti sulėtėjęs repoliarizacijos fazės priežastimi (Gong & Bisson 2002). Tačiau, mūsų tyrimai parodė, kad dėl tričio chloro srovės stiprumas sumažėja, todėl membranos potencialo kitimo greičio pokytis šiuo atveju negali būti aiškinamas poveikiu chloro pernašai per membraną. HTO poveikis H^+ -ATPazės veiklai yra įmanomas, tuo labiau, kad tričio biologinis elgesys yra labai panašus į vandenilio, todėl jo sąveika su protonų siurbliais yra labai tikėtina. Galimą slopinantį tričio poveikį protonų siurblio veiklai parodo užsitęsęs membranos potencialo kitimo greičio sumažėjimas lėtosios repoliarizacijos fazės pradžioje (**4.4 pav. A**). Be to, yra žinoma, kad didelių ir vidutinių dozių γ spinduliuotė gali slopinančiai veikti protonų siurblio veiklą augalinėse ląstelėse (Dong et al. 1994). Kadangi menturdumbliuose greitosios repoliarizacijos fazės metu kalio jonų išėjimas iš ląstelės yra daug greitesnis ir intensyvesnis už H^+ -ATPazės veiklą (Beilby 2007b), tričio poveikio H^+ -ATPazei išraiška turėtų labiau atsispindėti lėtosios, bet ne greitosios repoliarizacijos fazėje. Todėl lieka paskutinis kandidatas – kalio jonų transporto sistemos - kurių veiklos sutrikimo

pagrindu galima būtų paaiškinti stebimus membranos potencialo kitimo dėsningumo pokyčius veikimo potencialo greitosios repoliarizacijos fazėje. Išeinančios krypties kalio jonų srovės slopinimas sąlygotų teigiamų jonų išėjimo iš ląstelės sumažėjimą, kas apspręstų membranos potencialo atsistatymo po staigos depoliarizacijos greičio sumažėjimą. Manyti, kad dėl tričio poveikio galėjo sumažėti K^+ išėjimas iš ląstelės leidžia ir tai, kad mūsų tyrimų rezultatai parodė, kad, HTO slopino Ca^{2+} patekimą į ląstelę VP generavimo metu. Todėl mažesni Ca^{2+} kiekis citoplazmoje galėjo mažinti išeinančios krypties kalio kanalų atidarymo tikimybę (Sokolik & Yurin 1986). Be to, tričio sąlygotos radiolizės susidarę ROS gali tarnauti kaip antriniai signalo tarpininkai, reguliuojantys K^+ kanalų aktyvumą augalinių ląstelių atsakuose į jonizuojančiosios spinduliuotės poveikį. Augaluose H_2O_2 gali slopinti išeinančios krypties K^+ kanalų veiklą, o OH^\bullet gali aktyvinti nuolatinę nuo įtampos nepriklausomą K^+ nuotėkio srovę per membraną. HTO poveikis K^+ srovei, taip pat gali būti išreikštas per ROS katalizuojamą vienvalenčių katijonų pernašą per membraną į ląstelės vidų ir iš jos bei divalenčių katijonų transportą į ląstelę per įtampos valdomus neselektyvius katijonų kanalus (Demidchik & Maathuis 2007; Demidchik et al. 2010). Taigi, pokyčiai visų šių kanalų aktyvume gali atsispindėti veikimo potencialo braižo greitosios repoliarizacijos fazėje pokyčius. Toks aiškinimas paremia kitų tyrėjų gautus rezultatus, kurie parodė, kad apšvita jonizuojančiąja spinduliuote sukelia membranos laidumo K^+ sumažėjimą veikimo potencialo generavimo metu *Nitella flexilis* ląstelėse (Röttinger & Hug 1972).

Apibendrinat aptartus tyrimų rezultatus, galima teigti, kad tričio sąlygotos mažos jonizuojančiosios spinduliuotės dozės sukelia pokyčius *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinių ląstelių elektrogenėzėje. Greitų elektrofiziologinių metodų taikymas leido nustatyti silpnos radiacijos realių laiku sukeltus padarinius, atsirandančius netrukus po apšvitos, todėl buvo galima ištirti HTO poveikį menturdumblių ląstelių membranų elektrinėms savybėms net ir esant labai mažai išorinės apšvitos dozės galiai. *Nitellopsis obtusa* menturdumbliai

pasirodo esą tinkamos testinės sistemos mažų jonizuojančiosios spinduliuotės dozių subletalų poveikių intaktiniuose organizmuose vandens ekosistemoje tyrimams, nes jų bioelektriniai parametrai pasižymėjo dideliu jautrumu net ir labai mažoms HTO dozėms. Nustatyti mažų tričio dozių sukelti membranos elektrinio aktyvumo pokyčiai gali būti susiję ne tik su tiesioginių poveikių membranineis struktūroms, bet gali atspindėti poveikį ir kitoms biologiškai svarbioms makromolekulėms. Todėl membranos elektrinio aktyvumo pokyčiai gali pranašauti apie galimus tolimesnius radiacinius efektus, susijusius su joninės homeostazės, signalo perdavimo bei kitų svarbių biocheminių virsmų sutrikimais. Deja, duomenų apie tričio bei kitų jonizuojančiosios spinduliuotės šaltinių poveikio augalinės ląstelės membranos bioelektrinėms savybėms mažų dozių diapazone mechanizmus yra labai mažai. Todėl išlieka poreikis tolimesnių išsamių tyrimų šioje srityje, siekiant sukaupti pakankamai duomenų, kurie taip pat galėtų būti praktiškai pritaikyti aplinkos radiologinės būklės vertinimui bei biotos radiacinės saugos sistemos kūrimui ir reglamentavimui Lietuvoje.

5.2 Suminis tričio ir aliuminio poveikis pagrindinėms jonų pernašos sistemoms, dalyvaujančioms menturdumblių elektrinėse reakcijose

Aplinkoje, kurioje gyvename, veikiant skirtingiems toksiniams elementams ir fizikiniams veiksniams, įskatinat ir JS, kartu, gali susidaryti naujų kenksmingų derinių arba pakisti jau esamų toksiškas poveikis aplinkai (Shaw 2005). Gyvų organizmų atsakas į kombinuotą kelių antropogeninių aplinkos faktorių poveikį gali skirtis nuo reakcijos į kiekvieną iš stresinių veiksnių atskirai ir neatitikti adityvaus poveikio hipotezės (Montvydiene & Marciulioniene 2004). Aliuminis - vienas labiausiai paplitusių metalų, o aliuminio jonų koncentracija aplinkoje didėja dėl antropogeninės taršos. Žalingas Al poveikis augalams parodytas daugelio tyrimų (Vardar & Ünal 2007). Manoma, kad kenksmingas Al poveikis augalams daugiausiai pasireiškia rūgštinėje terpėje ($\text{pH} < 5$), kai yra palankios sąlygos jo toksišioms formoms (Al^{3+}) susidaryti, o pirminių jo toksiškumo taikiniu gali būti ląstelės

plazminė membrana, sienelė ir citoskeletas (Vitorello et al. 2005). Aliuminio toksiškumas augaluose esant rūgštinei aplinkai gali pasireikšti membranos paviršiaus potencialo, ramybės potencialo, H⁺ATPazės funkcionavimo, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻ transmembraninio transporto pokyčiais (Bose et al. 2011). Buvo parodyta, kad Al, sąveikaudamas su moliūgų šaknų ląstelių membranos paviršiuje esančiomis įkrautomis molekulių grupėmis paslenka paviršiaus potencialą teigiamų verčių kryptimi, kas savo ruožtu nulemia jonų transporto per membraną pokyčius (Ahn et al. 2001). Slopinantis Al poveikis H⁺ ATPazės funkcionavimui buvo parodytas *Cucurbita pepo* šaknų ląstelėse (Ahn 2002). Membranos potencialo depoliarizacija Al poveikyje buvo nustatyta *Arabidopsis* šaknų ląstelėse (Illés et al. 2006), kviečių ląstelėse (Papernik et al., 1997) menturdumbliuose *Chara carolina* (Takabatake et al 1997) ir *Nitellopsis obtusa* (Kisnierienė & Sakalauskas 2005). Kviečių šaknų ląstelėse buvo parodytas kalio jonų transporto iš ląstelės ir protonų bei chloro jonų transporto į ląstelę suintensyvėjimas dėl Al buvimo išorinėje terpėje (Wherrett et al. 2005). Kviečių šaknų apikalinėse ląstelėse buvo parodyta, kad Al aktyvina anijonų kanalus, sąlygojančius Cl⁻ išėjimą iš ląstelės (Ryan et al. 1997). Kukurūzų šaknų ląstelių tyrimai parodė, kad Al patekęs į ląstelės vidų, gali blokuoti iš citoplazminės pusės K⁺ transporto sistemas, užtikrinančias kalio jonų patekimą į ląstelės vidų (Piñeros & Kochian 2001). Taip pat buvo parodyta, kad Al menturdumbliuose lėtina veikimo potencialo repoliarizacijos fazę (Kisnieriene et al. 2007). Manoma, kad svarbų vaidmenį Al fitotoksiškumo ekspresijoje atlieka Al poveikis Ca²⁺ homeostazei. Nustatyta, kad Al gali sąlygoti padidėjusią viduląstelinę kalcio koncentraciją skatindamas Ca²⁺ patekimą į ląstelės vidų iš ekstraląstelinės terpės per plazmolemoje esančius įtampos valdomus kalcio kanalus ir neselektyvius katijonų kanalus bei aktyvindamas tonoplaste esančius kanalus užtikrinančius kalcio jonų išėjimą iš vidinių saugyklų į citoplazmą (Rengel & Zhang 2003). Tačiau Al toksiškumas sąveikoje su kitais aplinkos faktoriais įskaitant ir JS nėra gerai ištirtas. Tritis, kaip jonizuojančiosios spinduliuotės šaltinis, gali nulemti didesnę ROS gamybą arba organizmo sensibilizaciją. Todėl, tričio sąlygojama

jonizuojančioji spinduliuotė potencialiai galėtų keisti Al toksiškumo biologine išraišką neutralaus pH aplinkoje.

Mūsų atliktų tyrimų rezultatai, parodė, kad aliuminiui veikiant kartu su tričiu *Nitellopsis obtusa* ląstelių elektrofiziologinis atsakas skiriasi nuo atskirai aliuminio arba tričio (žr. 4.1 sk.) sukeltos bioelektrinės ląstelių reakcijos. Nustatėme, kad, $1 \cdot 10^{-3}$ M Al nesukėlė žymių pokyčių K^+ ir Cl^- pernašos sistemų veikloje. Tačiau, buvo parodyta, kad, aliuminis sąlygojo reikšmingą membranos laidumo Ca^{2+} elektrinio slopinimą (**4.7 pav B**), įtekančios kalcio jonų srovės tankio sumažėjimą kartu su Ca^{2+} reversijos potencialo poslinkiu teigiamesnių įtampų kryptimi (**4.7 pav A**). Tokius pokyčius Ca^{2+} transporte elektrinio membranos sužadavimo metu, galėjo sąlygoti Al poveikis kalcio kanalų funkcionavimui (pvz. vartiniam mechanizmui ar atrankumo filtrui) (Лапковская и др. 2010). Šie rezultatai neprieštarauja kitų tyrėjų duomenims apie slopinantį aliuminio poveikį Ca^{2+} kanalams dėl konkurencinės sąveikos tarp Al ir Ca^{2+} , sąlygojančios kalcio homeostazės sutrikimus (Poschenrieder et al. 2008). Tačiau, veikiant menturdumblių ląsteles aliuminiu ir tričiu kartu tiek Ca^{2+} tiek Cl^- ir K^+ pernašos sistemos buvo aktyvinamos (**4.7, 4.8, 4.9 pav.**), todėl kyla klausimas kas galėjo nulemti tokius poveikio skirtumus. Tritis kaip jonizuojančiosios spinduliuotės šaltinis galėjo pakeisti menturdumblių jautrumą aliuminiui, sudarydamas palankesnes sąlygas aliuminio toksiškumo pasireiškimui arba modifikuoti paties aliuminio savybes. Buvo parodyta, kad suminis JS ir aliuminio poveikis sąlygoja intensyvesnę GFAP ekspresiją žiurkių smegenyse, lyginant su atskiru aliuminio ar mažo intensyvumo rentgeno spindulių poveikiu, siejant tai su abiejų veiksmų sąlygotu viduląstelinė Ca^{2+} koncentracijos padidėjimu (Nedzvetskii et al. 2001). Mūsų gauti rezultatai neprieštarauja šių tyrėjų iškeltai hipotezei, kadangi HTO ir Al sąlygotas įtekančios Ca^{2+} srovės padidėjimas, taip pat galėjo nulemti viduląstelinės laisvo kalcio koncentracijos padidėjimą.

Dar vienas iš galimų paaiškinimų nustatytam HTO modifikuojančiam poveikiui Al toksiškumui *Nitellopsis obtusa* ląstelių elektrogenezei, galėtų būti siejamas su oksidacinio streso sukėlimu. Buvo parodyta, kad HTO ir varis

pasižymi sinergetiniu poveikiu ROS gamybai vienaląsčiuose dumbliuose (Rety et al., 2010). HTO per vandens radiolizę gali inicijuoti ROS (ypač H_2O_2 ir OH^\bullet) kiekio padidėjimą augalinėse ląstelėse. Aliuminis taip pat per Fentono reakciją gali nulemti ROS gamybą augaluose (Vitarello et al. 2005), tačiau žymiai silpnesnę neutralaus pH aplinkoje nei rūgštinėje terpėje. Tokiu būdu HTO sąlygotas H_2O_2 kiekio padidėjimas aplinkoje paskatintų aliuminio apspręstą OH^\bullet gamybą per Fentono reakciją, kas nulemtų intensyvesnę ROS gamybą. Pavyzdžiui, nustatyta, kad veikiant lašišinių žuvų odos mėginius Al ir mažų dozių γ - spinduliuote gretutiniai efektai klonogėninėse ląstelėse pasireiškia stipriau nei apšvitos ar aliuminio atskiro poveikio atveju, kas siejama su bendru poveikiu Ca^{2+} signalinėms kaskadoms bei ROS gamybai (Mothersill et al. 2014). Be to, HTO taip pat gali įtakoti Al įsisavinimą dumblių ląstelėse arba veikti menturdumblių antioksidacinių sistemų fermentus sukeldamas jų tiolio grupių oksidaciją (Gill & Tuteja 2010). Taigi visi paminėti procesai galėtų sudaryti galimą pagrindą nustatytiems suminio aliuminio ir tričio bei atskirai kiekvieno jų poveikio menturdumblių jonų pernašos sistemoms skirtumams.

Taigi, atsižvelgiant į aukščiau išvardintus aspektus, galima būtų paaiškinti mūsų tyrimuose gautus rezultatus. Tai, kad, ištekančios krypties kalio jonų srovės stiprumas padidėjo dėl suminio aliuminio ir tričio poveikio ir nepakito veikiant tik Al (**4.9 pav.**), leidžia daryti prielaidą, kad dėl bendro Al ir HTO veikimo galėjo padidėti OH^\bullet koncentracija, kas sąlygotų papildomų kalio kanalų aktyvavimą (Demidchik et al. 2010). Nustatytas padidėjęs Cl^- išėjimas iš ląstelės sužadavimo metu dėl HTO ir Al bendro veikimo (**4.8 pav.**) gali būti susijęs tiek su poveikiu veikimo potencialo depoliarizaciją apsprendžiantiems chloro kanalams, tiek su papildomų jautrių ROS kanalų, praleidžiančių tiek katijonus tiek anijonus, aktyvaciją (Pottosin et al. 2014). Be to, dėl aliuminio ir tričio sukulto ROS kiekio padidėjimo, galėjo įvykti viduląstelinės terpės parūgštėjimas, kas nulemtų Al^{3+} ląstelėje atsiradimą ir ištekančios krypties Cl^- srovės padidėjimą (Ryan et al. 1997). Kitą vertus, chloro srovės tankio padidėjimas gali būti susijęs su viduląstelinės Ca^{2+} koncentracijos pokyčiais,

kadangi šie procesai menturdumbliuose yra tarpiai susiję (Berestovsky et al. 2006). Mūsų gauti rezultatai šią prielaidą patvirtina, kadangi buvo nustatyta, kad dėl HTO ir Al suminio poveikio reikšmingai padidėja membranos laidumas Ca^{2+} elektrinio sužadavimo metu. Padidėjęs dėl bendro aliuminio ir tričio poveikio įtekančios kalcio srovės tankis gali būti apspręstą papildomų OH^- jautrių neselektyvių katijonų kanalų, dalyvaujančių Ca^{2+} pernešime į ląstelės vidų, aktyvacija (Pottosin et al. 2012)

Apibendrinant gautus rezultatus, galima daryti prielaidą, kad tritis, kaip ir aplinkos pH, gali būti laikomas svarbiu aplinkos veiksniu aliuminio biologinio poveikio išraiškai augaluose. Tačiau Al ir tričio, kaip ir kitų jonizuojančiosios spinduliuotės šaltinių, sąveikos mechanizmai išlieka galutinai neišaiškinti. Todėl būtina tęsti tyrimus šioje srityje, atkreipiant ypatingą dėmesį aliuminio poveikio vertinimui padidinto radiacinio fono ar radioaktyvios taršos vietose, žmonėms patiriantiems profesinę arba medicininę apšvitą.

5.3 Jonizuojančiosios spinduliuotės sukeltų gretutinių reiškinių bioelektrinė išraiška menturdumbliuose

Siekiant įvertinti sveikoje ląstelėje atsiradusius elektrinio aktyvumo pokyčius dėl signalų perdavimo iš su ja per bamblių sujungtos apšvitintos ląstelės, tritis pasirodė netinkamas apšvitos šaltinis. Kadangi tritis pasižymi išskirtiniu mobilumu biologinėse sistemose, jis galėtų būti pernešamas kartu su kitomis medžiagomis simplastiniu transportu per plazmodezmas iš apšvitintos ląstelės į neapšvitintą. Tokiu būdu, nepašvitintoje ląstelėje atsiradę elektrofiziologiniai pokyčiai galėtų būti sukelti tiesioginio tričio poveikio šiai ląstelei, bet ne dėl gretutinių reiškinių fenomeno. Todėl šiose tyrimuose buvo naudojamas uždaras β spinduliuotės šaltinis (stroncio radioaktyvus izotopas $\text{Sr} 90$ 74 kBq), siekiant išvengti tiesioginio radiacijos poveikio kaimyninei ląstelei. Mūsų tyrimuose buvo siekiama patvirtinti tiesioginį signalo perdavimą tarp menturdumblių ląstelių per plazmodezmas, todėl abiejų ląstelių aplinkoje esančios išorinės terpės buvo atskirtos vazelinu tilteliais (**3.5 pav.**)

Jonizuojančiosios spinduliuotės sąlygoti gretutiniai reiškiniai augaluose yra mažiau ištirti. Pirmą kartą apie radiacijos sukeltus gretutinius reiškinius augaluose buvo paskelbta visai neseniai, 2007 metais. Ši tyrėjų grupė parodė, kad, tiesioginė *Arabidopsis* gemalo apšvita α dalelėmis su dideliu tiesinės energijos perdavimu, sukelia postembrioninius šaknų vystymosi sutrikimus (Yang 2007). Vėliau buvo parodyta, kad augaluose tarp ląstelių gretutinių reiškinų signalinės molekulės gali sklirti kryptingai nuo apšvitos taško simplastiniu keliu, būtent plazmodezmomis sujungtais membraniniais tinklais (Wang et al. 2012). Mūsų tyrimų rezultatai taip pat paremia šią teoriją. 24 valandas trukusi *Nitellopsis obtusa* ląstelės apšvita uždaru stroncio radioaktyvaus izotopo ($Sr\ 90$, 74 kBq) šaltinių sukėlė su ją per bamblių sujungtoje kaimyninėje ląstelėje bioelektrinio aktyvumo pokyčius. Šie pokyčiai buvo sukelti gretutinių reiškinų signalo perdavimo per plazmodezmą, nes eksperimentinėmis sąlygomis buvo užtikrinta, kad signalinių molekulių mainai per tarpinę išorinę terpe būtų neįmanomi (žr. sk. 3.3.2 (3.5 pav.) ir sk. 3.4.3). Ląstelės 30 minučių apšvita neturėjo reikšmingo poveikio tirtiems kaimyninės ląstelės bioelektriniams parametrų. Toks rezultatas buvo tikėtinas, kadangi šiuo atveju (skirtingai nuo tiesioginio tričio poveikio tiriamai ląstelei) reikia daugiau laiko kad signalas apie radiacinius efektus apšvitintoje ląstelėje nukeliautų iki kaimyninės ląstelės ir kad pastarojoje įvyktų atitinkami pokyčiai, kurie galėtų atsispindėti jos bioelektrinėje reakcijoje.

Tarpusavyje tarpiai susijusi ROS gamyba, MAPkinazės ir Ca^{2+} paleidžiamos signalinės kaskados yra dažnas augalų atsakas į aplinkos faktorius, todėl šie veiksniai augaluose kaip ir gyvūnuose galėtų būti laikomi potencialiais gretutinių reiškinų nešikliais. Menturdumbliose ROS į Ca^{2+} signaliniai keliai aktyvuojami, reaguojant į biotinių ir abiotinių veiksnių. Informacijos apie signalo perdavime dalyvaujančias MAPK kaskadas dumbliuose yra palyginti nedaug, bet parodyta, kad MAPK kaskadų elementų randama *Volvox*, *Chlamydomonas*, *Osterococcus*, *Dunaliella viridis* ir *Dunaliella salina* (Chitlaru et al., 1997; Lei et al., 2008; Merchant et al., 2007; Palenik et al., 2007). Mūsų laboratorijos ankstesni tyrimai parodė, kad

Nitellopsis obtusa ląstelėje reaguojant į osmosinį ir temperatūrinį stresą generuojami spontaniniai veikimo potencialai ir aktyvinamos mažiausiai dvi MAPkinazės, kurių molekulinė masė yra ~ 48 kDa ir ~ 30 kDa (nepublikuoti duomenys). Todėl galime daryti prielaidą, kad MAPK kaip ROS ir Ca²⁺ galėtų dalyvauti gretutinių reiškinų ekspresijoje neapšvitintoje ląstelėje.

Analizuojant veikimo potencialo braižą neapšvitintoje ląstelėje, nustatėme, kad kaimyninės ląstelės 24 val. švitinimas sukėlė reikšmingą VP amplitudės sumažėjimą (**4.10 pav.**). Svarbu pažymėti tai, kad, amplitudė kito ne dėl ramybės potencialo pokyčio, bet dėl veikimo potencialo smailės viršūnės padėties įtampų ašyje poslinkio neigiamesnių įtampu kryptimi. Kitų autorių buvo parodyta, kad, augaluose veikimo potencialo smailės vertė tampriai susijusi su chloro reversijos potencialo dydžiu (Воденеев и др. 2009). Mūsų atliktos Cl⁻ srovės voltamperinės charakteristikos analizės rezultatai neprieštarauja šiai hipotezei. Tyrimai parodė, kad 24 val. ląstelės apšvita jos kaimyninėje ląstelėje sukėlė įtekančios krypties chloro jonų srovės stiprumo veikimo potencialo generavimo metu sumažėjimą bei Cl⁻ reversijos potencialo poslinkį neigiamesnių įtampų kryptimi (**4.13 pav.**). Buvo nustatyta, kad chloro jonų pusiausvyros potencialas pasislenka nuo ~38 mV iki ~17 mV (**4.14 pav.**). Tai parodo, kad dėl ląstelės apšvitos kaimyninėje neapšvitintoje ląstelėje sumažėjo viduląstelinė Cl⁻ koncentracija. Tai greičiausiai ir galėjo būti sumažėjusio chloro jonų išėjimo iš ląstelės sužadavimo metu priežastimi.. Viduląstelinės chloro koncentracijos sumažėjimą galėtų nulemti H⁺/Cl⁻ - ATPazės, palaikančia chloro jonų koncentraciją ląstelėje dėka 2H⁺/Cl⁻ simporto į ląstelę po membranos depoliarizacijos (Beilby & Walker 1981), veiklos slopinimas. Literatūroje randama duomenų apie ROS slopinantį poveikį membranos protonų siurbliams (Trouverie et al. 2008). Kita vertus, chloro koncentracija taip pat galėjo sumažėti ir dėl ląstelių apsauginės reakcijos iniciacijos. Augaluose anijonų kanalai tarnauja kaip atsako į stresą jungikliai ir dalyvauja tarpląsteliniam signalo perdavime (Roelfsema et al. 2012). Dalis apsauginės reakcijos metu aktyvuojamų anijonų kanalų yra pralaidūs organinėms rūgštims ir Cl⁻, todėl,

dalį chloro jonų per juos galėjo būti pašalinta iš ląstelės per 24 val tunkančios kaimyninės ląstelės apšvitos. Tiriant membranos potencialo atsistatymo dinamiką po elektrinio sužadavimo, pastebėjome, kad dėl vienos iš ląstelių apšvitos jos kaimyninėje neapšvitintoje ląstelėje padidėjo membranos potencialo kitimo greitis greitosios repoliarizacijos fazėje (**4.11 pav.**). Menturdumbliuose už greitosios repoliarizacijos fazę daugiausiai yra atsakingos K^+ pernašos sistemos, išnešančios kalio jonus iš ląstelės. Kadangi mūsų tyrimuose nebuvo nustatytas apšvitos poveikis išeinančios krypties K^+ srovei *Nitellopsis obtusa* ląstelėms esant ramybės būsenoje, tikėtina kad kalio jonų transportas nebuvo lemiamas veiksnys, apsprendžiantis greitosios repoliarizacijos fazės braižo pokyčius, nors aišku negalima atmesti tikimybės kitų K^+ transporto sistemų, kurios galėjo būti aktyvinamos elektrinio sužadavimo metu įtakos. Tačiau yra žinoma, kad augaluose veikimo potencialo repoliarizacijos fazėje lygiagrečiai vyksta K^+ transporto sistemų aktyvinimas ir Cl^- pernašos iš ląstelės slopinimas (Thiel et al. 1995). Tokiu būdu chloro srovės stiprumo bei veikimo potencialo amplitudės sumažėjimas galėjo sąlygoti repoliarizacijos fazės pagreitėjimą, kadangi ląstelei reikėjo sunaudoti mažiau resursų atstatant membranos potencialą po staigios depoliarizacijos.

Šiuos bioelektrinius pokyčius neapšvitintoje *Nitellopsis obtusa* ląstelėje galėjo nulemti tiek plazmodezmomis iš apšvitintos ląstelės atkeliavę tiek biocheminiai tiek elektriniai signalai. Atsklidęs elektrinis signalas ląstelėje gali tiesiogiai veikti jos bioelektrocheminę sistemą, arba sukelti joje fiziologinio atsako iniciaciją (Pyatygin et al. 2011) pvz. stresinių hormonų biosintezę (Davies 2004). Nustatyti membranos bioelektrinio aktyvumo pokyčiai gali nulemti arba atspindėti kaip subgentinius taip ir genetinius efektus ląstelėje, kadangi genų raiškos pakitimai gali įtakoti reguliatorines ir barjerines biologinių membranų funkcijas (Cramp et al., 1994; Santini et al., 1992; Somosy et al., 2000; Stanković et al., 1996), o elektriniai signalai augaluose savo ruožtu gali dalyvauti genų ekspresijoje (Volkov 2012). Todėl mūsų tyrimų rezultatai neprieštaruoja kitų tyrėjų darbams, grindžiantiems radiacijos sukeltus gretutinius reiškinius genetiniais pokyčiais ląstelėje.

Apibendrinus šių tyrimų duomenis, nustatyta, kad jonizuojančiosios spinduliuotės poveikis vienai iš per bamblių sujungtų menturdumblių ląstelių jos kaimyninėje neapšvitintoje ląstelėje sukėlė bioelektrinio aktyvumo pokyčius, pagreitindamas joje veikimo potencialo greitosios repoliarizacijos fazę, slopindamas chloro jonų transportą iš ląstelės elektrinio sužadavimo metu bei pakeisdamas Cl^- reversijos potencialą. Kontrolinių tyrimų rezultatai, parodantys, kad tiriamieji parametrai APW tirpale 24 val. bėgyje nekinta (**4.15 pav.**), leido atmesti ląstelių buvimo APW trukmės galimą įtaką nustatytiems elektrofiziologiniams pokyčiams. Tiesiogiai švitnamoje ląstelėje pastebėtų veikimo potencialo amplitudės, per membranos ploto vienetą tekančios K^+ srovės voltamperinės charakteristikos, Cl^- srovės tankio ir reversijos potencialo kitimo tendencijų (4.16 pav.) panašumas su neapšvitintoje ląstelėje nustatytais šių parametrų pokyčiais parodo, kad mažų dozių jonizuojančiosios spinduliuotės sukeliama gretutiniai efektai gali būti išreikšti elektrofiziologinių savybių pokyčiais. Be to, gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad gretutinių reiškinių fenomenas *Nitellopsis obtusa* ląstelėse stebimas dėl signalo apie apšvitą perdavimą tarp ląstelių tiesiogiai per tarpląstelinius kontaktus, o ne per tarpines medžiagas išorinėje terpėje. Mūsų tyrimuose pritaikytas eksperimento protokolas, leidžia visiškai atskirus abiejų ląstelių išorines terpes, tirti radiacijos sukeltus gretutinius reiškinius menturdumblių ląstelėse, sąlygotus signalų perdavimų tik per plazmodezmas. Toks metodas atveria naujas galimybes tirti gretutinius reiškinius remiantis signalų perdavimu per tarpląstelinius kontaktus natūraliomis tiriamoms ląstelėms sąlygomis, be farmakologinės intervencijos.

6. IŠVADOS

1. 15 kBq L⁻¹ aktyvumo koncentracijos tritis didina specifinę menturdumblių *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranos varžą, mažina Cl⁻ ir Ca²⁺ srovių tankį veikimo potencialo depoliarizacijos fazėje bei lėtina membranos potencialo atsistatymą veikimo potencialo greitosios repoliarizacijos fazėje.

2. Veikiant menturdumblių ląsteles tričiu ir aliuminiu vienu metu jos reagavo skirtingai lyginant su jų atsakais į tričio ar aliuminio atskirą poveikį: suminio tričio ir aliuminio poveikyje buvo aktyvinamos K⁺, Ca²⁺ ir Cl⁻ pernašos sistemos.

3. Vienos iš per bamblių sujungtų *Nitellopsis obtusa* ląstelių švitinimas uždaru jonizuojančiosios spinduliuotės šaltiniu, sąlygojo chloro jonų transporto slopinimą, Cl⁻ srovės reversijos potencialo pokytį bei veikimo potencialo greitosios repoliarizacijos fazės pagreitėjimą kaimyninėje neapšvitintoje ląstelėje.

4. Mažų jonizuojančiosios spinduliuotės dozių sukeltų gretutinių reiškinų mechanizmas menturdumbliuose galėtų būti aiškinamas tiesioginiu signalo perdavimu iš apšvitą patyrusios ląstelės per plazmodezmas jos kaimyninėms neapšvitintoms ląstelėms.

7. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adliene, D. et al., 2006. Assessment of the environmental contamination with long-lived radionuclides around an operating RBMK reactor station. *Journal of environmental radioactivity*, 90(1), pp.68–77.
2. Ahn, S.J., 2002. Aluminium-induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx of H⁺ across the plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*). *Journal of Experimental Botany*, 53(376), pp.1959–1966.
3. Ahn, S.J. et al., 2001. Aluminum inhibits the H⁽⁺⁾-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant physiology*, 126(4), pp.1381–90.
4. Al-Arifx, M., 2003. Oxygen Effects in Irradiated Cells. *Radiation Protection Management*, 20(2), pp.28–31.
5. Alvim, M.N. et al., 2012. Aluminium localization and toxicity symptoms related to root growth inhibition in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Journal of Biosciences*, 37(S1), pp.1079–1088.
6. Anan'eva, T. V., Likholat, E. A. and Dvoretiskii, A.I., 2000. The biological effects of combined exposure to low-dose irradiation and heavy metal ions. *Radiats. Biol. Radioecol.*, (40), pp.410–415.
7. Baisch, H, Bluhm, H., 1978. Effects of X-Rays on Cell Membranes. *Radiation and environmental biophysics*, 15(1978), pp.213–219.
8. Baluška F, M.S., 2013. Ion channels in plants: From bioelectricity, via signaling, to behavioral actions. *Plant Signaling & Behavior*, 8(1), pp.176 – 179.
9. Barber, M., 1911. The Effect on the Protoplasm of *Nitella* of Various Chemical Substances and of Micro- Organisms Introduced into the Cavity of the Living Cell. *The Journal of Infectious Diseases*, 9(2), pp.117–129.
10. Barbier-Brygoo, H. et al., 2000. Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochimica et biophysica acta*, 1465(1-2), pp.199–218.
11. Barth C., Stark G., W.M., 1993. Inactivation by ionizing radiation of ion channels formed by polyene antibiotics amphotericin B and nystatin in lipid

- membranes: An inverse dose-rate behavior. *Biophysical journal*, 64, pp.92–97.
12. Bartusevičienė B, M.L., 2003. Identification of Toxicant Classes in the Effluent Sample and Assessment of their Toxicity Using Electrophysiological Algal (Charatox) Test. *Environmental research, engineering and management*, 2(24), pp.20–27.
 13. Baumgartner, F. & Kim, M.A., 2000. Tritium / protium fractionation near and inside DNA. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 243(2), pp.295–298.
 14. Baumgärtner, F, Kardinal, Ch, Müllen, G., 2001. Distribution of tritium between water and exchangeable hydrogen bridges of biomolecules. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 249(2), pp.513–517.
 15. Beilby, M.J., 2007. Action potential in charophytes. *International review of cytology*, 257(07), pp.43–82.
 16. Beilby, M.J. & Blatt, M.R., 1986. Simultaneous Measurements of Cytoplasmic K Concentration and the Plasma Membrane Electrical Parameters in Single Membrane Samples of *Chara corallina*. *Plant physiology*, 82(2), pp.417–22.
 17. Beilby, M.J. & Casanova, M.T., 2014. *The Physiology of Characean Cells*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
 18. Beilby, M.J. & Walker, N. A., 1981. Chloride Transport in *Chara*. *Journal of Experimental Botany*, 32(1), pp.43–54.
 19. Beilby MJ, B.M., 1992. *Chara* plasmalemma at high pH: voltage dependence of the conductance at rest and during excitation. *Journal of Membrane Biology*, 125(1), pp.25–39.
 20. Berecki, G. et al., 2001. Tonoplast Anion Channel Activity Modulation by pH in *Chara corallina*. *Journal of Membrane Biology*, 184(2), pp.131–141.
 21. Berestovsky, G.N., Kataev, a. a. & Tsyganov, M. a., 2006. Transient currents and Ca²⁺ gradient relaxation in characean algae cells: Theory and experiment. *Biophysics*, 51(6), pp.873–881.
 22. Berestovsky, G.N. & Kataev, A.A., 2005. Voltage-gated calcium and Ca²⁺-activated chloride channels and Ca²⁺ transients: voltage-clamp studies of

- perfused and intact cells of Chara. *European biophysics journal : EBJ*, 34(8), pp.973–986.
23. Bisson, M. a, Beilby, M.J. & Shepherd, V. a, 2006. Electrophysiology of turgor regulation in marine siphonous green algae. *The Journal of membrane biology*, 211(1), pp.1–14.
 24. Boyer, C. et al., 2009. Tritium in plants: A review of current knowledge. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), pp.34–51.
 25. Bose, J., Babourina, O. & Rengel, Z., 2011. Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants. *Journal of experimental botany*, 62(7), pp.2251–64.
 26. Bradshaw, C. & Jaeschke, B.C., 2013. Bioaccumulation of tritiated water in phytoplankton and trophic transfer of organically bound tritium to the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Journal of Environmental Radioactivity*, 115, pp.28–33.
 27. Burlakova EB, 1995. Low Intensity Radiation: Radiobiological Aspects. *Radiation Protection Dosimetry*, 62(1-2), pp.13–18.
 28. RSC, 2012. Radiacinės saugos centro 2012 metų ataskaita
 29. Chicea D., R.M., 2007. On the effects of low doses (0–1.2 gy) beta radiation on *Zea mays* seeds on 12 days plantlets. *Rom. Journ. Phys.*, 52, pp.633–640.
 30. Chitlaru, E., Seger, R. & Pick, U., 1997. Activation of a 74 kDa plasma membrane protein kinase by hyperosmotic shocks in the halotolerant alga *Dunaliella salina* activation of a 74 kDa plasma membrane protein kinase. , 157, pp.429–436.
 31. Cramp W. A., Yatvin M. B., 1994. Recent developments in the radiobiology of cellular membranes. *Acta Oncologica Vol.*, 33(8), pp.945–952.
 32. Crum, SJH., Leistra, M., 1999. Environmental Contamination and Toxicology Sorption of Nine Pesticides to Three Aquatic Macrophytes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 37, pp.310–316.
 33. Daillant, O, Boilley, D, Gerzabek, M, Tesch, R., 1996. Metabolised Tritium and Radiocarbon in Lichens and Their Use as Biomonitors. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 49, pp.329–341.

34. Dallas, L.J. et al., 2012. Assessing the Impact of Ionizing Radiation on Aquatic Invertebrates : A Critical Review. *Radiation research*, 177, pp.693–716.
35. Daňová, D. et al., 2010. The Effect of Low Dose Ionizing Radiation and Cadmium Chloride on Glucose Metabolism in Broiler Chickens. *Acta Veterinaria Brno*, 79(3), pp.415–418.
36. Darbre, PD, Bakir, A, Iskakova, E., 2013. Effect of aluminium on migratory and invasive properties of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *Journal of Inorganic Biochemistri*, 128, pp.245–249.
37. Davenport, R., Reid, R.J. & Smith, F. a., 1996. Control of sodium influx by calcium and turgor in two charophytes differing in salinity tolerance. *Plant, Cell and Environment*, 19(6), pp.721–728.
38. Davies E, S.B., 2006. Electrical Signals , the Cytoskeleton , and Gene Expression : a Hypothesis on the Coherence of the Cellular Responses to Environmental Insult. In *Communication in Plants – Neuronal Aspects of Plant Life*. pp. 1–5.
39. Davies, E., 2004. New functions for electrical signals in plants. *New Phytologist*, 161, pp.607–610.
40. Delistraty, D., 2008. Radioprotection of non human biota. *Journal of environmental radioactivity*, 99(12), pp.1863–1869.
41. Demidchik, V. et al., 2010. Arabidopsis root K⁺-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of cell science*, 123(Pt 9), pp.1468–1479.
42. Demidchik, V., Bowen, H.C., et al., 2002. Arabidopsis thaliana root non-selective cation channels mediate calcium uptake and are involved in growth. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 32(5), pp.799–808.
43. Demidchik, V. et al., 2014. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of experimental botany*, 65(5), pp.1259–70.
44. Demidchik, V., Davenport, R.J. & Tester, M., 2002. Nonselective Cation Channels In Plants. , pp.67–107.

45. Demidchik, V. & Maathuis, F.J.M., 2007. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *The New phytologist*, 175(3), pp.387–404.
46. Demidchik, V., Sokolik, A. & Yurin, V., 2001. Characteristics of non-specific permeability and H⁺-ATPase inhibition induced in the plasma membrane of *Nitella flexilis* by excessive Cu²⁺. *Planta*, 212, pp.583–590.
47. Demidchik, V. et al., 2001. Alteration of Ion Channels in the Plasmalemma of *Nitella flexilis* Cells during Long-Term Hyperthermia. , 48(3), pp.294–299.
48. Demidchik, V, Sokolik, A, Y., 1997. The Effect of Cu²⁺ on Ion Transport Systems of the Plant. *Plant physiology*, 114, pp.1313–1325.
49. Ding LH, Shingyoji M, Chen F, Hwang JJ, Burma S, Lee C, Cheng JF, C.D., 2005. Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses. *Radiation research*, 164(1), pp.17–26.
50. Dmitriev, A. et al., 2009. Effects Of Low Dose Chronic Radiation And Heavy Metals On Plants And Their Fungal And Virus. *Data Science Journal*, 8, pp.49–66.
51. Dobson RL, K.T., 1978. The tritium RBE at low-level exposure--variation with dose, dose rate, and exposure duration. *Curr Top Radiat Res Q.*, 12(1-4), pp.44–62.
52. Dong, C.-Z., Montillet, J.-L. & Triantaphylidès, C., 1994. Effects of gamma irradiation on the plasma membrane of suspension-cultured apple cells. Rapid irreversible inhibition of H⁺-ATPase activity. *Physiologia Plantarum*, 90(2), pp.307–312.
53. Doughty, CJ, Hope, A., 1973. Effects of Ultraviolet Radiation on the Membranes of *Chara corallina*. *Journal of Membrane Biology*, 13, pp.185–198.
54. Dreyer, I. & Uozumi, N., 2011. Potassium channels in plant cells. *The FEBS journal*, 278(22), pp.4293–303.
55. Dunkel, M. et al., 2008. Targeting of vacuolar membrane localized members of the TPK channel family. *Molecular plant*, 1(6), pp.938–49.
56. Elmore, J.M. & Coaker, G., 2011. The role of the plasma membrane H⁺-ATPase in plant-microbe interactions. *Molecular plant*, 4(3), pp.416–27.

57. Esch, H.E., 1966. Dose-Dependent Gamma Irradiation Effects on the Resting Potential of *Nitella flexilis*. *Radiation research*, 27, pp.355 – 362.
58. Fairbrother, A, Wenstel, R, Sappington, K, Wood, W., 2007. Framework for metals risk assessment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 68(2), pp.145–227.
59. Fisahn, J. et al., 2004. Analysis of the transient increase in cytosolic Ca²⁺ during the action potential of higher plants with high temporal resolution: requirement of Ca²⁺ transients for induction of jasmonic acid biosynthesis and PINII gene expression. *Plant & cell physiology*, 45(4), pp.456–9.
60. Forsberg, C., 1965. Nutritional Studies of *Chara* in Axenic Cultures. *Physiologia plantarum*, 18, pp.275–291.
61. Fromm, J. & Lautner, S., 2007. Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, cell & environment*, 30(3), pp.249–57.
62. Furlong, H. et al., 2013. Apoptosis is signalled early by low doses of ionising radiation in a radiation-induced bystander effect. *Mutation research*, 741-742, pp.35–43.
63. Galeriu, D. et al., 2013. An overview of organically bound tritium experiments in plants following a short atmospheric HTO exposure. *Journal of environmental radioactivity*, 118, pp.40–56.
64. Garnier-Laplace, J. et al., 2013. Are radiosensitivity data derived from natural field conditions consistent with data from controlled exposures? A case study of Chernobyl wildlife chronically exposed to low dose rates. *Journal of Environmental Radioactivity*, 121, pp.12–21.
65. Geffey, C., 1972. Stimulation of action potentials with radiation in single cells of *Nitella gracilis*. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 21(11), pp.11–29.
66. Gen Yang a, Lijun Wu , Lianyun Chen, Bei Pei , Yugang Wang, Furu Zhan, Yuejin Wu, Z.Y., 2007. Targeted Irradiation of Shoot Apical Meristem of *Arabidopsis* Embryos Induces Long-Distance Bystander/Abscopal Effects. *Radiation Research*., 167(3), pp.298 – 305.
67. Geras'kin, S.A. et al., 2007. Cytogenetic effect of low dose gamma-radiation in *Hordeum vulgare* seedlings: non-linear dose-effect relationship. *Radiation and environmental biophysics*, 46(1), pp.31–41.

68. Germany, K.I.T., Diabate, S. & Strack, S., 1994. Overview on tritium transfer from air to plants and conversion to OBT with focus on night cases. , pp.1–41.
69. Gierth, M. & Mäser, P., 2007. Potassium transporters in plants--involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. FEBS letters, 581(12), pp.2348–56.
70. Gill, S.S. & Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale, 48(12), pp.909–30.
71. Gillet G., K.L., 1965. Calcium flux from x- irradiated Nitella cells. Life Sciences, 4, pp.1561–1565.
72. Glaviano, a et al., 2009. Effects of hTERT on genomic instability caused by either metal or radiation or combined exposure. Mutagenesis, 24(1), pp.25–33.
73. Gong, X.-Q. & Bisson, M. a, 2002. Acetylcholine-activated Cl⁻ channel in the Chara tonoplast. The Journal of membrane biology, 188(2), pp.107–13.
74. Grams, T.E.E. et al., 2009. Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf. Plant, cell & environment, 32(4), pp.319–26.
75. Grigutyte, R. et al., 2009. Response of oxidative stress enzymes in charophyte *Nitellopsis obtusa* exposed to allochthonous leaf extracts from beech *Fagus sylvatica*. Biologija, 55(3), pp.142–149.
76. Gupta, N., Gaurav, S.S. & Kumar, A., 2013. Molecular Basis of Aluminium Toxicity in Plants : A Review. American Journal of Plant Science, 4, pp.21–37.
77. Hedrich, R., 2012. Ion channels in plants. Physiological reviews, 92(4), pp.1777–811.
78. Hetherington, A.M. & Brownlee, C., 2004. The generation of Ca²⁺ signals in plants. Annual review of plant biology, 55, pp.401–27.
79. Hills, A. & Blatt, M.R., 2003. Control of Guard Cell Ion Channels by Hydrogen Peroxide and Abscisic Acid Indicates Their Action through Alternate Signaling Pathways 1. , 131(February), pp.385–388.

80. Horváth, F. et al., 2002. Deltamethrin rescues run down of K⁺ outward rectifying channels in *Vicia faba* guard cells. , 46(2 mM), pp.19–20.
81. I James B. Mitchell, DeGraff, William, Kaufman, Dwight, Krishna, Murali C., Samuni, Amram Finkelstein, Eli Ahn, Min S., Hahn, Stephen M., Gamson, Janet, Russo, A., 1991. Inhibition of oxygen-dependent radiation-induced damage by the nitroxide superoxide dismutase mimic, Tempol. Archives of Biochemistry and Biophysics, 289(1), pp.62–70.
82. IAEA, 2012. Environmental Modelling for Radiation Safety (EMRAS) A Summary Report of the Results of the EMRAS Programme (2003-2007),
83. IAEA , 1992. Effects of Ionizing Radiation on Plants and Animals at Levels Implied by Current Radiation Protection Standards. Technical Reports Series 332
84. ICRP, 2008. Environmental Protection - the Concept and Use of Reference Animals and Plants. ICRP Publication 108. Ann. ICRP, 38 (4-6).
85. ICRP, 2003. Framework for Assessing the Impact of Ionising Radiation on Non-human Species. ICRP Publication 91. Ann. ICRP 33 (3),
86. ICRP, 2007. ICRP publication 103: The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection,
87. Illés, P. et al., 2006. Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. Journal of experimental botany, 57(15), pp.4201–13.
88. Iwabuchi, K., Kaneko, T. & Kikuyama, M., 2005. Ionic mechanism of mechano-perception in Characeae. Plant & cell physiology, 46(11), pp.1863–71.
89. Yamada Y, Itoh M, Kiriyaama N, Komura K, Ueno,K., 1989. Measurement of tritium in tree rings: Relationship between tritium concentrations in pine tree rings and environmental samples. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 132, pp.59–64.
90. Yan, X. et al., 2009. Research progress on electrical signals in higher plants. Progress in Natural Science, 19(5), pp.531–541.

91. Yehuda, G. et al., 2013. Microscale Adaptive Response of Charophytes of the Negev Desert , Israel : Species Divergences by AFLP. *Natural Resources and Conservation*, 1(3), pp.55–64.
92. Jaeschke, B.C. et al., 2011. Tissue-specific incorporation and genotoxicity of different forms of tritium in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 159(1), pp.274–80.
93. Jakimavičiūtė-Maselienė V, Mažeika, J, Petrošius, R., 2003. Tričio ir radioanglies pasiskirstymas Ignalinos AE regione. *Sveikatos mokslai*, 3, pp.46–49.
94. Jean-Baptiste, P. & Fourré, E., 2013. The distribution of tritium between water and suspended matter in a laboratory experiment exposing sediment to tritiated water. *Journal of environmental radioactivity*, 116, pp.193–196.
95. Jeffers, R.S. & Parker, G.T., 2014. Development, description and validation of a Tritium Environmental Release Model (TERM). *Journal of environmental radioactivity*, 127, pp.95–104.
96. Jeulin, C., Fournier, J., Marano, F., Dazy, A.-C., 2000. Effects of hydroxyl radicals on outwardly rectifying chloride channels in a cultured human bronchial cell line. *Eur. J. Physiol.*, 439, pp.331–338.
97. Jha, A.N. et al., 2005. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. *Mutation research*, 586(1), pp.47–57.
98. Johansson, I. et al., 2006. External K⁺ modulates the activity of the *Arabidopsis* potassium channel SKOR via an unusual mechanism. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 46(2), pp.269–81.
99. Johnson, B.R. et al., 2002. Action potentials in a giant algal cell: a comparative approach to mechanisms and evolution of excitability. *Journal of undergraduate neuroscience education : JUNE : a publication of FUN, Faculty for Undergraduate Neuroscience*, 1(1), pp.A23–7.
100. Jurkonienė, S. et al., 2004. Leachate toxicity assessment by responses of algae *Nitellopsis obtusa* membrane ATPase and cell resting potential, and with Daphtoxkit F magna test. *Environmental toxicology*, 19(4), pp.403–8.

101. Kaneko, T. et al., 2005. Possible involvement of mechanosensitive Ca²⁺ channels of plasma membrane in mechanoperception in Chara. *Plant & cell physiology*, 46(1), pp.130–5.
102. Kawahara, M. & Kato-Negishi, M., 2011. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011, p.276 - 393.
103. Kesavan, P., 2005. Oxygen effect in radiation biology: Caffeine and serendipity. *Current science*, 89(2), pp.318–328.
104. Kim, S.B., Baglan, N. & Davis, P.A., 2013. Current understanding of organically bound tritium (OBT) in the environment. *Journal of environmental radioactivity*, 126C, pp.83–91.
105. Kisnieriene, V. et al., 2012. The effect of acetylcholine on Characeae K⁺ channels at rest and during action potential generation. *Central European Journal of Biology*, 7(6), pp.1066–1075.
106. Kisnierienė, V. et al., 2009. The combined effect of Cd²⁺ and ACh on action potentials of *Nitellopsis obtusa* cells. *Central European Journal of Biology*, 4(3), pp.343–350.
107. Kisnieriene, V. & Sakalauskas, V., 2005. Al³⁺ induced membrane potential changes in *Nitellopsis obtusa* cells. , (1), pp.31–34.
108. Kisnieriene, V. & Sakalauskas, V., 2007. The effect of aluminium on bioelectrical activity of the *Nitellopsis obtusa* cell membrane after H⁺-ATPase inhibition. *Central European Journal of Biology*, 2(2), pp.222–232.
109. Kitasato, H., 1968. The influence of H⁺ on the membrane potential and ion fluxes of *Nitella*. *The Journal of general physiology*, 52(1), pp.60–87.
110. Knowles, J.F., Greenwood, L.N., 1997. A comparison of the effects of long-term β- and γ-irradiation on the reproductive performance of a marine invertebrate *Ophryotrocha diadema* (Polychaeta, Dorvilleidae). *Journal of Environmental Radioactivity*, 34(1), pp.1–7.
111. Koteles, G., 1982. Radiation Effects on Cell Membranes *. *Radiation and environmental biophysics*, 21, pp.1–18.

112. Kourie, J.I., 1998. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 275, pp.C1–C24.
113. Kovács, E. & Keresztes, A., 2002. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 33(2), pp.199–210.
114. Krol, E., 2000. Ways of Ion Channel Gating in Plant Cells. *Annals of Botany*, 86(3), pp.449–469.
115. Krupenina, N. a & Bulychev, A. a, 2007. Action potential in a plant cell lowers the light requirement for non-photochemical energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et biophysica acta*, 1767(6), pp.781–8.
116. Kwiatkowska, M., 2003. Plasmodesmal changes are related to different developmental stages of antheridia of *Chara* species. *Protoplasma*, 222(1-2), pp.1–11.
117. Lambert, S.J. & Davy, A.J., 2011. Water quality as a threat to aquatic plants: discriminating between the effects of nitrate, phosphate, boron and heavy metals on charophytes. *The New phytologist*, 189(4), pp.1051–9.
118. Lautner, S. et al., 2005. Characteristics of Electrical Signals in Poplar and Responses in Photosynthesis 1. *Plant physiology*, 138, pp.2200–2209.
119. LaVerne, J., 2000. OH Radicals and Oxidizing Products in the Gamma Radiolysis of Water. *Radiation Research*, 153(2), pp.196–200.
120. Lei G, Qiao D, B.L., 2008. Isolation and characterization of a mitogen-activated protein kinase gene in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*, 20, pp.13–17.
121. Little, M.P. & Lambert, B.E., 2008. Systematic review of experimental studies on the relative biological effectiveness of tritium. *Radiation and environmental biophysics*, 47(1), pp.71–93.
122. Lyng, F.M. et al., 2006. The involvement of calcium and MAP kinase signaling pathways in the production of radiation-induced bystander effects. *Radiation research*, 165(4), pp.400–9.
123. Lukšienė, B. et al., 2013. Accumulation and transfer of ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr in the plants of the forest ecosystem near the Ignalina Nuclear Power Plant. *Journal of environmental radioactivity*, 116, pp.1–9.

124. Maathuis, F., 2004. Ligand – gated ion channels. In Blatt MR, ed. Annual Plant Reviews. Blackwell Publishing, pp. 193–221.
125. Mancuso, S., 2006. Communication in Plants F. Baluška, S. Mancuso, & D. Volkmann, eds., Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
126. Manusadzianas L, Vitkus R., 1999. Phytotoxicities of Selected Chemicals and Industrial Effluents to *Nitellopsis obtusa* Cells , Assessed by Using a Rapid Electrophysiological Charophyte Test. *ATLA*, 27, pp.379–386.
127. Manusadzianas, L. et al., 2003. Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands), 63(1), pp.27–41.
128. Manusadzianas, L. et al., 2002. Response of the charophyte *Nitellopsis obtusa* to heavy metals at the cellular, cell membrane, and enzyme levels. *Environmental toxicology*, 17(3), pp.275–283.
129. Manusadzianas, L. et al., 2012. Toxicity of copper oxide nanoparticle suspensions to aquatic biota. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 31(1), pp.108–14.
130. Manusadzianas, L, Vitkus, R, Sakalauskas, V., 1995. Wastewater toxicity assessment using the electrophysiological response of a charophyte *Nitellopsis obtusa*. *Environmental toxicology and Water Quality*, 10(1), pp.49–56.
131. Marcu, L., 2009. Cellular bystander effects and radiation hormesis. *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*, XVI(1), pp.66–70.
132. Marčiulionienė, D., 2003. Technogeninio radionuklidø akumuliacija vandens augaluose cheminės ir terminės tarðos fone. *Ekologija*, 4, pp.28–35.
133. Marples, B, Lambin, P, Skov , K, A, Joiner, M, C., 1997. Low dose hyper-radiosensitivity and increased radioresistance in mammalian cells. *International Journal of Radiobiology*, 71(6), pp.725–735.
134. Martac L, Podgorac J, S.S., 2010. Evaluation of the neurotoxic effect of aluminum on the wistar rat. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 62(3), pp.585–588.
135. McAinsh, M.R, Pittman, J., 2009. Shaping the calcium signature. *New Phytologist*, 181, pp.275–294.

136. McCourt, R.M., Delwiche, C.F. & Karol, K.G., 2004. Charophyte algae and land plant origins. *Trends in ecology & evolution*, 19(12), pp.661–6.
137. Melintescu, A. & Galeriu, D., 2011. Dynamic model for tritium transfer in an aquatic food chain. *Radiation and environmental biophysics*, 50(3), pp.459–473.
138. Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, M.-D.L. et al., 2007. Display Settings : The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions . *Journal of Applied Phycology*, 318, pp.245–250.
139. Montvydiene, D. & Marciulioniene, D., 2004. Assessment of toxic interactions of heavy metals in a multicomponent mixture using *Lepidium sativum* and *Spirodela polyrrhiza*. *Environmental toxicology*, 19(4), pp.351–8.
140. Morgan, W.F. & Sowa, M.B., 2013. Non-targeted effects induced by ionizing radiation: Mechanisms and potential impact on radiation induced health effects. *Cancer letters*, pp.1–5.
141. Morgan WF, 2013. Issues in low dose radiation biology: the controversy continues. A perspective. *Radiation research*, 179(5), pp.501–510.
142. Moskalev, Y.I., Zhuravlev, V.F., Istomina, A.G., Petrovich, I.K., Kazbekova, D.A., 1973. Relative biological effectiveness of tritium. In M. W. Moghissi, A.A. Carter, ed. *Messenger Graphics*, Nevada, USA.
143. Mossor-Pietraszewska, T., 2001. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. *Acta biochimica Polonica*, 48(3), pp.673–86.
144. Mothersill, C. et al., 2014. Radiation-induced bystander effects in the Atlantic salmon (*salmo salar* L.) following mixed exposure to copper and aluminum combined with low-dose gamma radiation. *Radiation and environmental biophysics*, 53(1), pp.103–14.
145. Mothersill, C. & Seymour, C., 2005. Display Settings : Radiation-induced bystander effects : are they good , bad or both ? *Med Confl Surviv*, 21(2), pp.101–110.
146. Mothersill, C. & Seymour, C., 2006. Radiation-induced bystander effects: evidence for an adaptive response to low dose exposures? Dose-response : a publication of International Hormesis Society, 4(4), pp.283–90.

147. Mothersill, C.E., Smith, R.W. & Seymour, C.B., 2009. Molecular Tools and the Biology of Low-dose Effects. *BioScience*, 59(8), pp.649–655.
148. Murata, Y. et al., 2001. Abscisic Acid Activation of Plasma Membrane Ca²⁺ Channels in Guard Cells Requires Cytosolic NADPH and Is Differentially Disrupted Upstream and Downstream of Reactive Oxygen Species Production in *abi1-1* and *abi2-1* Protein Phosphatase 2C Mutants. *The plant Cell*, 13, pp.2513–2523.
149. Musayev N and Ismailov E, 2007. Bioelectrical Properties of *Chara gymnophylla* Plasmamembrane during Interaction with Cobalt , (Co²⁺). *Ekoloji*, 16(63), pp.1–6.
150. Natalia A. Krupenina, Alexander A. Bulychev et al., 2008. Action potential in *Chara* cells intensifies spatial patterns of photosynthetic electron flow and non-photochemical quenching in parallel with inhibition of pH banding. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 7, pp.681–688.
151. Nedveckaite, T. et al., 2007. Exposure of biota in the cooling pond of Ignalina NPP: hydrophytes. *Journal of environmental radioactivity*, 97(2-3), pp.137–147.
152. Nedveckaitė, T. et al., 2010. LIETDOS-BIO assessment approach to the environment non-human biota exposure by ionizing radiation. *Lithuanian Journal of Physics*, 50(1), pp.151–160.
153. Nedveckaite, T., Gudelis, A. & Vives i Batlle, J., 2013. Impact assessment of ionizing radiation on human and non-human biota from the vicinity of a near-surface radioactive waste repository. *Radiation and environmental biophysics*, 52(2), pp.221–234.
154. Nedveckaite, T. & Marciulioniene, D., 2011. Radiological and Environmental Effects in Ignalina Nuclear Power Plant Cooling Pond – Lake Druksiai : From Plant put in Operation to Shut Down Period of Time. In P. Tsvetkov, ed. *Nuclear Power - Operation, Safety and Environment. In Tech.*, pp. 261–286.
155. Nedzvetskii V. S., Nerush P. A., Tikhomirov A. A., R.L.A., 2001. Effects of Ionizing Radiation and Aluminum Chloride on Protein of Glial intermediate Filaments in the Rat Brain. *Neurophysiology*, 33, pp.33–38.

156. Opritov, V. et al., 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(6), pp.801–808.
157. Palenik, B. et al., 2007. The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), pp.7705–10.
158. Palmgren, M., 2001. Plant plasma membrane H-ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52(817), p.845.
159. Panda, S.K., Baluska, F. & Matsumoto, H., 2009. Aluminum stress signaling in plants. *Plant signaling & behavior*, 4(7), pp.592–7.
160. Papernik, L. a. & Kochian, L. V., 1997. Possible Involvement of Al-Induced Electrical Signals in Al Tolerance in Wheat. *Plant physiology*, 115(2), pp.657–667.
161. Paszewski, a. et al., 1982. Electrical activity of the liver-wort *Conocephalum conicum*.: Method of investigation and general characteristics of excitation. *Physiologia Plantarum*, 54(1), pp.83–87.
162. Pietrzak-Flis, Z. & Wasilewska-Gomułka, M., 1984. Effect of lifetime intake of organically bound tritium and tritiated water on the oocytes of rats. *Radiation and environmental biophysics*, 23(1), pp.61–8.
163. Piñeros, M. a & Kochian, L. V, 2001. A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al(3+)-induced anion channels. *Plant physiology*, 125(1), pp.292–305.
164. Pyatygin, S.S., 2008. Распространяющиеся электрические сигналы в растениях. *Citologija*, 50(2), pp.1–6.
165. Pyatygin, S.S., Opritov, V. a. & Vodeneev, V. a., 2008. Signaling role of action potential in higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(2), pp.285–291.
166. Poschenrieder, C. et al., 2008. A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *The Science of the total environment*, 400(1-3), pp.356–68.
167. Pottosin, I. et al., 2014. Cross-talk between reactive oxygen species and polyamines in regulation of ion transport across the plasma membrane:

- implications for plant adaptive responses. *Journal of experimental botany*, 65(5), pp.1271–83.
168. Pottosin, I. et al., 2012. Synergism between polyamines and ROS in the induction of Ca (2+) and K (+) fluxes in roots. *Plant signaling & behavior*, 7(9), pp.1084–7.
 169. Pullman DG, C.G., 2010. *Starry_Stonewort_Lakeline_Report.pdf*. Lakeline, pp.36–42.
 170. Raleigh JA, Kremers W, G.B., 1977. Dose-rate and oxygen effects in models of lipid membranes: linoleic acid. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 31(3), pp.203–213.
 171. Rengel, Z. & Zhang, W.-H., 2003. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytologist*, 159(2), pp.295–314.
 172. Rety, C., Gilbin, R. & Gomez, E., 2010. Induction of Reactive Oxygen Species and Algal Growth Inhibition by Tritiated Water with or Without Copper. *Environmental toxicology*, 1, pp.155–165.
 173. Riley, P.A., 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International journal of radiation biology*, 65(1), pp.27–33.
 174. Rip WJ, Outboter MRL, L.H., 2007. Impact of climatic fluctuations on characeae biomass in a shallow , restored lake in The Netherlands. In D. E. Gulati RD, Lammens E, Pauw N, ed. *Shallow Lakes in a Changing World*. pp. 415–424.
 175. Ryan, P.R. et al., 1997. Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), pp.6547–52.
 176. Roberts, S.K., 2006. Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *The New phytologist*, 169(4), pp.647–66.
 177. Roelfsema, M.R.G., Hedrich, R. & Geiger, D., 2012. Anion channels: master switches of stress responses. *Trends in plant science*, 17(4), pp.221–229.
 178. Röttinger, E.M. & Hug, O., 1972. The effects of low energy x-rays on membrane potential, membrane resistance and action potential of *Nitella flexilis*. *Radiation research*, 50(3), pp.491–503.
 179. Rout, GR, Samantaray, S, Das, P., 2001. Aluminium toxicity in plants : a review. *Agronomie*, 21, pp.3–21.

180. Sanders, D. et al., 2002. Calcium at the Crossroads of Signaling Calcium Signals : A Central Paradigm in. , pp.401–418.
181. Santini, M.T. et al., 1992. Differences in membrane electrical properties between C3H 10T1/2 mouse embryo fibroblasts and their ionizing radiation and chemically transformed counterparts. *European biophysics journal : EBJ*, 20(6), pp.305–9.
182. Scho, G., Universitario, C. & Biomedicas, D.I., 2007. Vacuolar calcium channels. , 58(7), pp.1559–1569.
183. Scott, B.R., 2008. It's time for a new low-dose-radiation risk assessment paradigm--one that acknowledges hormesis. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*, 6(4), pp.333–51.
184. Shaw, G., 2005. Applying radioecology in a world of multiple contaminants. *Journal of environmental radioactivity*, 81(2-3), pp.117–30.
185. Sheldon Wolff, Veena Afzal, J.K. Wiencke, G.O. and A.M., 1988. Human Lymphocytes Exposed to Low Doses of Ionizing Radiations Become Refractory to High Doses of Radiation as Well as to Chemical Mutagens that Induce Double-strand Breaks in DNA. *International Journal of Radiation Biology*, 53(1), pp.39–48.
186. Shepherd, V. a et al., 2008. Mechano-perception in Chara cells: the influence of salinity and calcium on touch-activated receptor potentials, action potentials and ion transport. *Plant, cell & environment*, 31(11), pp.1575–91.
187. Shepherd, V. , Beilby, M.J. & Shimmen, T., 2002. Mechanosensory ion channels in charophyte cells: the response to touch and salinity stress. *European biophysics journal : EBJ*, 31(5), pp.341–55.
188. Shimmen, T. et al., 1994. Characean Cells as a Tool for Studying Electrophysiological of Plant Cells Characteristics. , 278, pp.263–278.
189. Shimmen, T., 2002. Electrical perception of “death message” in chara: analysis of rapid component and ionic process. *Plant & cell physiology*, 43(12), pp.1575–84.
190. Shimmen, T., 1997. Studies on Mechano-Perception in Characeae : Effects of External Ca²⁺ and Cl⁻. , 38(6), pp.691–697.

191. Shirley, B.W., Hanley, S. & Goodman, H.M., 1992. Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations. *The Plant cell*, 4(3), pp.333–47.
192. Silva, S. et al., 2012. Aluminium long-term stress differently affects photosynthesis in rye genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 54, pp.105–112.
193. Singh, V.K. & Yadav, V.S., 2005. Role of cytokines and growth factors in radioprotection. *Experimental and molecular pathology*, 78(2), pp.156–69.
194. Soderberg, S.M. and M., 2013. Radiation Protection in Nuclear Medicine. In S. Mattsson & C. Hoeschen, eds. *Radiation Protection in Nuclear Medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 7–18.
195. Sokolik, A.I. & Yurin, V.M., 1986. Potassium channels in Plasmalemma of *Nitella* Cells at rest. *Journal of Membrane Biology*, 89, pp.9–22.
196. Sokolov, M. & Neumann, R., 2014. Effects of low doses of ionizing radiation exposures on stress-responsive gene expression in human embryonic stem cells. *International journal of molecular sciences*, 15(1), pp.588–604.
197. Somosy, Z., 2000. Radiation response of cell organelles. *Micron* (Oxford, England : 1993), 31(2), pp.165–181.
198. Song, W.-Y. et al., 2008. Relationship between calcium decoding elements and plant abiotic-stress resistance. *International journal of biological sciences*, 4(2), pp.116–25.
199. Spanswick, R.M., 1972. Electrical coupling between cells of higher plants: A direct demonstration of intercellular communication. *Planta*, 102(3), pp.215–27.
200. Spiewla, E., 1995. Dependence of oscillatory changes in electrical resistance of *Nitellopsis obtusa* cell membrane on the vegetation season. *Acta Societatis Botanicorum Polanie*, 64(4), pp.375–377.
201. Stahlberg, R., 2006. Historical overview on plant neurobiology. *Plant signaling & behavior*, 1(1), pp.6–8.
202. Stahlberg R., 2006. Slow wave potentials – a propagating electrical signal unique to higher plants. In Baluska, ed. *Communication in Plants – Neuronal Aspects of Plant Life*. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, pp. 291–308.

203. Stanković, B. & Davies, E., 1996. Both action potentials and variation potentials induce proteinase inhibitor gene expression in tomato. *FEBS letters*, 390(3), pp.275–9.
204. Su, H. et al., 2001. Expression and stress-dependent induction of potassium channel transcripts in the common ice plant. *Plant physiology*, 125(2), pp.604–14.
205. Sukhov, V. et al., 2011. Simulation of action potential propagation in plants. *Journal of theoretical biology*, 291, pp.47–55.
206. Sze, H., Li, X. & Palmgren, M., 1999. Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases. Regulation and biosynthesis. *The Plant cell*, 11(4), pp.677–90.
207. Tabata, T. & Sibaoka, T., 1987. Conduction Velocity and Blockage of Action Potential in Chara Internod. *Plant & cell physiology*, 28(7), pp.1187–1194.
208. Takabatake, R. & Shimmen, T., 1997. Inhibition of Electrogenesis by Aluminum in Characean Cells. *Plant and Cell Physiology*, 38(11), pp.1264–1271.
209. Takashi Asaeda and Tanjeena Zaman, 2013. Heavy Metal Uptake and Tolerance of Charophytes. In P. J. Gupta DK, Corpas FJ, ed. *Heavy Metal Stress in Plants*. pp. 111–120.
210. Tavares, B. et al., 2011. The essential role of anionic transport in plant cells: the pollen tube as a case study. *Journal of experimental botany*, 62(7), pp.2273–98.
211. Tazawa, M., Shimmen, T. & Mimura, T., 1987. Membrane Control in the Characeae. , (88), pp.95–117.
212. Tekpli, X. et al., 2013. Role for membrane remodeling in cell death: implication for health and disease. *Toxicology*, 304, pp.141–57.
213. Tester, M., 1987. Blockade of Potassium Channels in the Plasmalemma of Chara corallina by Tetraethylammonium, Ba²⁺, Na⁺ and Cs⁺. *Journal of Membrane Biology*, 105, pp.77–85.
214. 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*, 4, pp.609–622.

215. Thiel, G., 1995. Dynamics of chloride and potassium currents during the action potential in *Chara* studied with action potential clamp. *European biophysics journal : EBJ*, 24, pp.85–92.
216. Thomas, M.P., Chartand K., Reynolds, A., Vitvitsky, V., Banerjee, R., Gendelman, H.E., 2007. ROS ir K ir chloras.pdf. *Journal of Neurochemistry*, 100, pp.503–519.
217. Torn, K. et al., 2004. Distribution of charophyte species in Estonian coastal water (NE Baltic Sea). *Scientia Marina*, 68, pp.129–136.
218. Trebacz, K. et al., 2007. Characteristics of anion channels in the tonoplast of the liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant & cell physiology*, 48(12), pp.1747–57.
219. Trebacz, K., Dziubinska, H. & Krol, E., 2006. Electrical Signals in Long-Distance Communication in Plants. In *Communication in Plants – Neuronal Aspects of Plant Life*. pp. 277–290.
220. Trouverie, J. et al., 2008. Anion channel activation and proton pumping inhibition involved in the plasma membrane depolarization induced by ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells are both ROS dependent. *Plant & cell physiology*, 49(10), pp.1495–507.
221. Turner, A., Millward, G.E. & Stemp, M., 2009. Distribution of tritium in estuarine waters: the role of organic matter. *Journal of environmental radioactivity*, 100(10), pp.890–895.
222. Ulanovsky, a, Pröhl, G. & Gómez-Ros, J.M., 2008. Methods for calculating dose conversion coefficients for terrestrial and aquatic biota. *Journal of environmental radioactivity*, 99(9), pp.1440–8.
223. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR), 2012. *Biological mechanisms of radiation actions at low doses* U. Nations, ed., New York.
224. UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation), 2008. *UNSCEAR 2008 Report: Volume I “Sources and effects of ionizing radiation,”*
225. Vahisalu, T. et al., 2008. SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature*, 452(7186), pp.487–91.

226. Vardar, F. & Ünal, M., 2007. Aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Advances in Molecular Biology*, 1, pp.1–12.
227. Very, A, Sentenac, H., 2003. Molecular mechanisms and regulation of K^+ transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, pp.575–603.
228. Vieira J, N.O., 2003. Photosynthetic characteristics of charophytes from tropical lotic ecosystems. *Phycological Research*, 51(November 2002), pp.51–60.
229. Vitorello, VA, Capaldi, FR, Stefanuto, V., 2005. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17(1), pp.129–143.
230. Vodeneev, V. a., Opritov, V. a. & Pyatygin, S.S., 2006. Reversible changes of extracellular pH during action potential generation in a higher plant *Cucurbita pepo*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(4), pp.481–487.
231. Volkov, A.G. et al., 2009. Electrical memory in Venus flytrap. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 75(2), pp.142–7.
232. Volkov, A.G., 2000. Green plants: electrochemical interfaces. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 483(1-2), pp.150–156.
233. Volkov, A.G. ed., 2012. *Plant Elektrophysiology: Signaling and Responses*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
234. Volkov, A.G. & Ranatunga, D.R.A., 2006. Plants as environmental biosensors. *Plant signaling & behavior*, 1(3), pp.105–15.
235. Wang, T. et al., 2012. Novel features of radiation-induced bystander signaling in *Arabidopsis thaliana* demonstrated using root micro-grafting. *Plant signaling & behavior*, 7(12), pp.1566–72.
236. Ward, J.M., Mäser, P. & Schroeder, J.I., 2009. Plant ion channels: gene families, physiology, and functional genomics analyses. *Annual review of physiology*, 71, pp.59–82.
237. Van der Welle, M.E.W. et al., 2006. Detoxifying toxicants: interactions between sulfide and iron toxicity in freshwater wetlands. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 25(6), pp.1592–7.
238. Wherrett, T, Ryan, PR, Delhaize, E, Shabala, S., 2005. Effect of aluminium on membrane potential and ion fluxes at the apices of wheat roots. *Functional Plant Biology*, 32(3), pp.199–208.

239. Zemp, F.J., Sidler, C. & Kovalchuk, I., 2012. Increase in recombination rate in *Arabidopsis thaliana* plants sharing gaseous environment with X-ray and UVC-irradiated plants depends on production of radicals. *Plant signaling & behavior*, 7(7), pp.782–7.
240. Zhizhina, G.P., 2011. The effects of low doses of low-intensity ionizing radiation on DNA structure and function. *Biophysics*, 56(4), pp.738–746.
241. Бондарева, Л., 2011. Механизмы переноса трития в пресноводных экосистемах. Периодический научно-технический журнал национального ядерного центра республики Казахстан, 45(1), pp.10–22.
242. Воденеев В.А., Сухов В.С, Опритов В.А., Царева Ю.В., Яковлева Е.В., Неруш В.Н, А.Е.К., 2009. Динамика внеклеточной концентрации ионов хлора при генерации холодоиндуцированного потенциал действия у высших растений. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, 2, pp.111–115.
243. Лапковская, ЕМ, Филипцова, ГГ, Соколик, АИ, Юрин, В., 2010. Влияние синтетических аналогов простаноидов на Ca²⁺ проницаемые каналы плазматической мембраны растительной клетки. Физиология растений. Труды БГУ, 5(1), pp.95–99.
244. О.В. Орлова, В.С. Сухов, В.А.В., 2009. Анализ возможности использования разности электрических потенциалов для оценки влияния повышенного радиационного фона на солеустойчивость проростков пшеницы. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, 5, pp.118–122.
245. Юрин, В.М. & Дитченко, Т.И., 2009. Механизмы модификации ион-транспортных свойств плазматической мембраны растительной клетки под действием фунгицида пропиконазола. *Агрехимия*, 9, pp.43–53.
246. Юрин В.М., Соколик А.И., К.А.П., 1991. Регуляция функций мембран растительной клетки, *Навука і тэхніка*, Минск.

8. PUBLIKACIJOS IR REZULTATŲ SKLAIDA

Straipsniai disertacijos tema tarptautiniuose periodiniuose leidiniuose, įtrauktuose į Mokslinės informacijos instituto pagrindinį sąrašą (Thomson ISI Web of Science):

1. **Olga Sevriukova**, Auste Kanapeckaite, Vilma Kisnieriene, Rima Ladygiene, Indre Lapeikaite, and Vidmantas Sakalauskas. Modifying action of tritium on the charophytes bioelectrical response to anthropogenic pollution. Trace Elements and Electrolytes. 2014, 31 (2), p. 60-66, ISSN 0946-2104.
2. **Olga Sevriukova**, Auste Kanapeckaite, Indre Lapeikaite, Vilma Kisnieriene, Rima Ladygiene, Vidmantas Sakalauskas. Charophyte Electrogenesis as a Biomarker for Assessing the Risk from Low-Dose Ionizing Radiation to a Single Plant Cell. Journal of Environmental Radioactivity, 2014. Statusas: priimtas spaudai. DOI 10.1016/j.jenvrad.2014.04.016, ISSN 0265-931X
3. **Olga Sevriukova**, Auste Kanapeckaite, Indre Lapeikaite, Vilma Kisnieriene, Vidmantas Sakalauskas. Impact of low dose Tritium on the bioelectrical activity of Charophyte cell. Proceedings of 11th International Conference on Medical Physics Kaunas University of Technology, 2013, p. 61-66. ISSN 1822-5721.

Straipsniai recenzuojamuose mokslo leidiniuose, konferencijų pranešimų medžiagoje (nesusiję su disertacijos tema):

1. Olga Sevriukova, Ieva Lebednikienė, Jūratė Vaicekavičiūtė. Radiacinės saugos mokymo žinių poreikių analizė Lietuvoje. Visuomenės sveikata. 2009, nr. 3/(46), p. 33-38. ISSN 1392-2696
2. O. Sevriukova, V. Sakaluskas, V. Kisnierienė. Application of intracellular microelectrode measurements and voltage clamp techniques for the investigation of the effect of acetylcholine on plant cells membrane parameters. Konferencijos „Biomedicininė inžinerija“ medžiaga. 2009, p. 124-127. ISSN 2029-3380

Konferencijų pranešimų tezės (disertacijos tema):

1. **О. Севрюкова**, В. Сакалаускас, В. Киснериене. Воздействие малых доз трития на механизмы генерации потенциала действия в растительной клетке. Сборник докладов 17 международной школы – конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века», 2013, стр. 149-150
2. **Olga Sevriukova**, Vidmantas Sakalauskas, Indrė Lapeikaite, Jonas Burneika, Kristina Panaciova, Vilma Kisnieriene. The combined effect of Aluminium and tritium on the plant cell membrane bioelectrical parameters. 10th Keele Meeting Abstracts Book, 2013, p. 48
3. Vilma Kisnieriene, Jonas Burneika, Indrė Lapeikaite, **Olga Sevriukova**, Vidmantas Sakalauskas. Influence of Al³⁺ on light-induced membrane potential changes of *Nitellopsis obtusa* cells. 10th Keele Meeting Abstracts Book, 2013, p. 41
4. **О. Севрюкова**, В. Сакалаускас, В. Киснериене, Й. Бурнейка, И. Лапейкайте. Воздействие малых доз ионизирующего излучения на биоэлектрические параметры растительной клетки. Сборник докладов международной научно – практической конференции «Клеточная биология и биотехнология растений». 2013, стр. 109

Konferencijų pranešimų tezės (nesusiję su disertacijos tema):

1. Kisnieriene V., Sakalauskas V., **Sevriukova O.**, The application of action potential analysis to define metals impact on plants cells. Proceedings of 3rd International Symposium on Metallomics Münster/Germany, June 15 - 18, 2011
2. V. Kisnierienė, V. Sakalauskas, **O. Sevriukova**. Paveldimas spazminis paralyžius. Ar *Arabidopsis thaliana* šakniaplaukių augimo viduląsteliniai procesai gali padėti suprasti neuronų degeneracines ligas. Antrosios mokslinės Lietuvos neuromokslų asociacijos konferencijos pranešimų medžiaga. 2010, p.16

3. **О. Севрюкова**, В. Сакалаускас, В. Киснериене. Воздействие ацетилхолина на биоэлектрические параметры растительной клетки. Сборник докладов 14 Международной школы – конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века», 2010, Том 1, стр. 216
4. **О. Sevriukova**, V. Sakalauskas, V. Kisnierienė. Acetylcholino įtaka bioelektrinių signalų perdavimui augalinėse ląstelėse. Pirmosios mokslinės Lietuvos neuromokslų asociacijos konferencijos „Nervų sistemos tyrimai Lietuvoje“ pranešimų medžiaga. 2009, p. 23

9. PADĖKA

Norėčiau išreikšti didžiausią padėką savo moksliniam vadovui dr. Vidmantui Sakalauskui už perduotą patirtį, suteiktą pagalbą, rūpinimąsi ir pasitikėjimą, doktorantūros studijų laikotarpiu.

Norėčiau padėkoti kolegei dr. Vilmai Kisnierienei ir studentams Austei Kanapeckaitėi, Indrei Lapeikaitei ir Jonui Burneika už supratimą, paramą, mokslines diskusijas, vertingus patarimus, pagalbą rengiant mokslines publikacijas, ir šiltą draugišką darbinę atmosferą.

Taip pat esu dėkinga Radiacinės saugos centrui už materialinę, techninę ir konsultacinę pagalbą.

Esu dėkinga visiems Gamtos mokslų fakulteto neurobiologijos ir biofizikos katedros darbuotojams už galimybę prisijungti prie draugiško, rūpestingo darbo kolektyvo.

Dėkoju dr. Rimantei Zinkutei ir dr. Ingai Griškovai-Bulanovai už pagalbą rengiant disertaciją ir jos santrauką.

Labai ačiū visai mano šeimai ir draugams, už tai, kad jie visa laiką buvo šalia, palaikė mane, rūpinosi ir tikėjo manimi

10. GYVENIMO APRAŠYMAS

Vardas, Pavardė Olga Sevriukova
Gimimo data ir vieta 1984 03 18, Vilnius, Lietuva
Adresas d. Kalvarijų g. 153, Vilnius, Lietuva
n. Kanto al. 11-57, Vilnius, Lietuva
Telefonas +37061495489
E - paštas olga.sevriukova@gmail.com
Šeimyninė padėtis du vaikai
Išsilavinimas

2003 – 2007 – Universitetinės pirmos pakopos studijos Vilniaus Universitete, Gamtos mokslų fakultete. Biofizikos bakalauro kvalifikacinis laipsnis.

2007 – 2009 – Universitetinės antros pakopos studijos Vilniaus Universitete, Gamtos mokslų fakultete. Neurobiologijos magistro kvalifikacinis laipsnis

2009 – iki šiol: biofizikos krypties doktorantūros studijos Vilniaus Universitetas, Gamtos mokslų fakultete

Darbo patirtis:

2008.04- iki šiol: Radiacinės saugos centro Ekspertizės ir apšvitos stebėsenos departamento mokymo skyriaus vyriausioji specialistė

Profesinė narystė

IRPA (International Radiation Protection Association)

LRSD (Lietuvos radiacinės saugos draugija)

FENS (Federation of European Neuroscience Societies)

LNA (Lietuvos neuromokslų asociacija)

Kvalifikacijos kėlimas

2007.11.26-2007.11.30 - Tarptautinė biofizikos mokykla „Advanced methods in biophysics“, Trakai, Lietuva

2008.09.08-12 - Tarptautinės atominės energijos agentūros mokymai „IAEA Regional Train-the-Trainers Course for Radiation Protection Officers“, Maskva, Rusijos Federacija

2009.01-2009.03 - 40 akad. valandų trukmės valstybės tarnautojų įvadinis mokymas, Vilnius, Lietuva

2009.10.26-30 - Jungtinių Amerikos Valstijų NNSA Energijos departamento Pasaulinės grėsmės mažinimo tarnybos ir Radiacinės saugos centro jungtiniai mokymai „Orphan Source Search and Secure Training”, Vilnius, Lietuva

2010.03.01-2010.03.26 - Tarptautinės atominės energijos agentūros mokymai „IAEA Regional Training Course for Regulators on Authorization and Inspection of Radiation Sources“, Vilnius, Lietuva

2010.04.19 – 23 - 14^{ta} tarptautinė jaunųjų mokslininkų konferencija-mokyklą ts «Biology – science of XXI century», Puščinas, Rusijos Federacija

2013.02.12-15 – tarptautinė mokslinė-praktinė konferencija “Plant cell biology and biotechnology”, Minskas, Baltarusija