

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Indrė

LAPEIKAITĖ

Amino rūgščių ir NMDA įtaka
menturdumblių *Nitellopsis obtusa*
ląstelių elektrinių signalų
parametrams

DAKTARO DISERTACIJOS SANTRAUKA

Gamtos mokslai,
Biofizika N 011

VILNIUS 2020

Disertacija rengta 2014– 2019 metais Vilniaus universitete.
Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

Mokslinis vadovas:

Prof. dr. Osvaldas Rukšėnas (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011).

Gynimo taryba:

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

Nariai:

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

Prof. dr. Saulius Bagdonas (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011),

Dr. Levonas Manusadžianas (Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, biologija – N 010),

Dr. Lourdes Rubio Valverde (Malagos universitetas, Ispanija, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2020 m. rugpjūčio mėn. 26 d. 11 val. Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva, tel. +370 5223 4420; el. paštas info@gmc.vu.lt. Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY

Indrė

LAPEIKAITĖ

Effect of amino acids and NMDA on
electrical signalling parameters of
Charophyte *Nitellopsis obtusa*

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biophysics N 011

VILNIUS 2020

This dissertation was written between 2014 and 2019 at Vilnius University. The research was supported by Research Council of Lithuania.

Academic supervisor:

Osvaldas Ruksenas PhD prof. (Vilnius University, Natural Sciences, Biophysics – N 011).

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

Chairman - **Saulius Satkauskas PhD prof.** (Vytautas Magnus University, Natural Sciences, Biophysics – N 011)

Levonas Manusadzianas PhD (Nature Research Centre, Natural Sciences, Biology – N 010)

Aidas Alaburda PhD prof. (VU, Natural Sciences, Biophysics – N 011)

Saulius Bagdonas PhD prof. (VU, Natural Sciences, Biophysics – N 011)

Lourdes Rubio Valverde PhD (University of Malaga, Spain, Natural Sciences, Biology – N 010)

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 11 p.m. on 26th August 2020 in room R401 of the Life Sciences Center (Vilnius University).

Address: Saulėtekio av. 7, Vilnius, Lithuania
Tel. +370 5223 4420 ; e-mail: info@gmc.vu.lt

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University as well as on the website of Vilnius University: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendarius>

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AMPA	– (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol propionatas)
AP-5	– DL- aminofosfovalerijono rūgštis
APW	– kontrolinis tirpalas (ang. <i>Artificial Pond Water</i>)
AR	– amino rūgštys
AtGLR	– baltažiedžio vairo (<i>Arabidopsis thaliana</i>) genai, koduojantys glutamato tipo receptorių.
DNQX	– 6,7-Dinitrokvinoxalino-2,3(1H,4H)-dionas
E_m	– membranos potencialas
E_{th}	– veikimo potencialo sužadinimo slenkstis (membranos potencialas, mV)
Gly	– glicinas
GLR	– (ang. <i>glutamate receptor-like</i>) augalų genai, koduojantys į glutamato receptorių panašius baltymus
Glu	– glutamatas
H^+ -ATPazė	– protonų siurblys
HEPES	– 4-(2-hidroksietil)piperazinil-1-etansulfo rūgštis (buferis)
Hg_2Cl_2	– kalomelio standartinis pusiauelementis
iGluRs	– (ang. <i>ionotropic glutamate receptors</i>) jonotropiniai glutamato receptoriai
IP_3	– inozitolio trisfosfatas
MP	– membranos potencialas
NMDA	– N-metil-D-aspartatas
RP	– membranos ramybės potencialas
$t_{act.}$	– jonų srauto aktyvacijos trukmė
$t_{inact.}$	– jonų srauto inaktyvacijos trukmė
TRIS	– hidroksimetilaminometanas (buferis)
VP	– veikimo potencialas

SANTRAUKA

1. ĮVADAS

Kaip ir visi organizmai, augalai, optimizuodami fiziologines funkcijas, nuolat adaptuojasi prie besikeičiančios aplinkos – fizinių, cheminių bei biologinių veiksnių. Specifiniams ir griežtai reguliuojamiems fiziologiniams pokyčiams reikalingas tikslus ir efektyvus informacijos perdavimas tarp ląstelių, audinių bei organų. Informacija apie aplinkos bei vidinius pokyčius augaluose gali būti perduodama keletu būdų: hidrauliniais svyravimais apytakiniuose audiniuose, cheminiais bei elektriniais signalais. Bioelektriniai signalai yra neatsiejama augalų fiziologijos dalis – būtent jie yra greičiausias būdas perduoti informaciją iš lokaliai veikiančių į distalines augalo dalis (Fromm ir Lautner 2007). Bioelektriniai atsakai augaluose esti keleto tipų bei mastų, nuo vietinių membranos potencialo pokyčių iki sklindančių sisteminių signalų, perduodančių informaciją ilgais atstumais (Trebacz *et al.* 2006). Elektriniai signalai yra pirminiai atsakai į apšvietimo intensyvumo, temperatūros pokyčius, mechaninius stimulus, bei tokius biologinius veiksnius kaip patogenai, mikrobai, parazitai (Pyatygin *et al.* 2008, Fromm ir Lautner 2007). Nemažiau svarbu tai, kad elektrinių signalų charakteristikos gali būti moduluojamos atsižvelgiant į aplinkos sąlygas bei endogenines ar išorines chemines medžiagas (Kisnieriene *et al.* 2018). Patys universaliausi ir kol kas geriausiai aprašyti elektriniai signalai augaluose yra veikimo potencialai (VP) – charakteringos formos, „viskas arba nieko“ principu sužadinami, diskretūs, ilgais atstumais sklindantys membranos potencialo svyravimai (apžvelgta Sukhov *et al.* 2019). Augalų karalystėje pirmi veikimo potencialai buvo užregistruoti menturdumbliuose (Umrath 1930, apžvelgta Beilby 2007), vėliau – musėkaute ar jautriojoje mimozoje, o pastaraisiais dešimtmečiais ir agrariniuose augaluose, saulėgrąžose, bei baltažiedžiame vairyneje – iki šiol daugiausia tyrimų aprašytame modeliniame aukštesniųjų augalų atstove. Elektriniai signalai yra

neatsiejama signalų transdukcijos grandis: nustatyta, kad veikimo potencialų sužadimas ir sklidimas augalų audiniuose gali sukelti įvairias fiziologines adaptacijas, pradedant fotosintezės intensyvumo bei ląstelių augimo sumažėjimu, intensyvesniu kvėpavimu; baigiant genų ekspresijos bei fitohormonų sintezės reguliavimu ir kt. (Sukhov *et al.* 2019, Pyatygin *et al.* 2008).

Skirtingų augalų rūšių audiniuose generuojami veikimo potencialai pasižymi savita trukme, amplitude bei refrakteriniu periodu. Nepaisant to, veikimo potencialai yra diskretūs vienalyčiai signalai; jų savybės nepriklauso nuo stimulo modalumo, pvz., tiek elektros srove, tiek mechaniniu stimulu standartinėmis sąlygomis sukelti veikimo potencialai pasižymi vienodomis charakteristikomis. Nepaisant to, augalų veikimo potencialai yra variabilūs – jų savybės gali būti susijusios su aplinkos sąlygų pokyčiais bei cheminėmis medžiagomis (Beilby ir Shepherd 2001, Sevriukova *et al.* 2014, Kisnieriene *et al.* 2009, Kisnieriene *et al.* 2018, Krol *et al.* 2007). Amino rūgštys (AR) – viena tokių junginių grupių.

Amino rūgštys (AR) ne tik tiesiogiai skatina augimą (azoto šaltinis), bet ir veikia kaip augalų signalinės molekulės, kurių pagalba yra reguliuojamos fiziologinės funkcijos (Miller *et al.* 2008). Glutamato signalinė funkcija augaluose kol kas yra viena plačiausiai aprašytų. Tiek šaknų augimas, tiek jų architektūra priklauso nuo Glu pasiskirstymo dirvoje (Vincill *et al.* 2013). Be to, nustatyta, kad *Arabidopsis* šakniaplaukiuose, priklausomai nuo išorinės Glu koncentracijos, sukliamas citoplazminės kalcio koncentracijos didėjimas ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) bei plazminės membranos depoliarizacija (Dennison ir Spalding 2000, Sivaguru *et al.* 2003). Viduląstelinės kalcio koncentracijos osciliacijos yra neatsiejama signalų transdukcijos grandis augaluose. Elektrinis ląstelių sužadimumas taip pat yra neatsiejamas nuo $[Ca^{2+}]_{cyt}$ svyravimų. Išaugusi $[Ca^{2+}]_{cyt}$ yra pirmas veikimo potencialų generavimo žingsnis ir sąlyga augaluose (apžvelgta Fromm ir Lautner 2007). Parodyta, kad kai kuriose augalų rūšyse, išoriškai veikiant Glu, gali būti sužadunami spontaniniai veikimo potencialai. Tokie atsakai yra aprašyti

aukštesniuosiuose augaluose – saulėgražose, miežiuose (Stolarz *et al.* 2010, Felle ir Zimmermann 2007) bei kerpsamanėse. Kerpsamanėse glutamatas ne tik sužadina veikimo potencialus, bet ir moduluoja jų formą – audinių aplinkoje esant glutamato, šviesos stimulo sukelti veikimo potencialai pasižymi didesne amplitude bei ilgesne trukme (Krol *et al.* 2007). Pastarieji atradimai paskatino glutamato ir kitų AR signalinės funkcijos tyrimus, ir, augaluose atradus glutamato tipo receptorių, paaiškėjo AR poveikio transdukcijos mechanizmas.

Augalų glutamato tipo receptoriai (GLR) yra gyvūninių jonotropinių glutamato receptorių (iGluR) homologai. Pastarieji receptoriai atsakingi už elektrinių signalų transdukciją centrinėje nervų sistemoje. Prisijungiant neurotransmiteriams (Glu/Gly) iGluRs tampa laidūs katijonams, tarp jų ir kalciumui, o šių jonų srautas depoliarizuoja posinaptinę membraną, taip yra realizuojama elektrinių signalų transdukcija sinapsėse (apžvelgta Rousseaux 2008). Šis transdukcijos mechanizmas – membranos depoliarizacija ir kalcio osciliacijos, priklausomai nuo veikiančios glutamato koncentracijos – iš dalies yra būdingas ir augalams (Qi *et al.* 2006, Stephens *et al.* 2008). GLR genai rasti magnolijūnuose, paparčiuose, samanose bei žaliadumbliuose, parodyta, kad augalų GLR agonistai gali būti tiek Glu, tiek kitos AA (apžvelgta Wudick 2018). Aprašius, kaip GLR veikia $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$, paaiškėjo vienas svarbiausių transdukcijos mechanizmų, sujungiantis išorinį stimulą su sukeliama elektriniais signalais, ir per GLR reguliuojamais fiziologiniais atsakais. GLR, greta kitų kalciumui laidžių kanalų, formuoja kalcio signalus augalinėse ląstelėse. Trumpalaikiai ar ilgalaikiai citoplazminės kalcio koncentracijos svyravimai (*calcium signatures*) yra vienas pagrindinių transdukcijos mechanizmų koduojančių ir dekoduojančių išorinius ar vidinius stimulus (Demidchik *et al.* 2018, Medvedev 2018, Mousavi *et al.* 2013). Parodyta, kad būtent kalcio signalais GLR reguliuoja tokias augalams būdingas fiziologines funkcijas kaip anglies ir azoto metabolizmas (Forde ir Roberts 2014, Kang ir Turano 2003), fitohormonų sintezė (Kang *et al.* 2004), imuniniai atsakai (Kwaaitaal *et al.* 2011), aktyvių deguonies formų generavimas (Choi

et al. 2017) pažaidos sukeltų elektrinių signalų sklidimas tarp augalo dalių ir kt. (Mousavi *et al.* 2013).

Nors parodyta, kad GLR augaluose gali būti veikiami daugelio amino rūgščių (Glu, Gly, Asn, Asp, Met ir kt.) ir kitų agonistų (gliutatio), nustatyta, kad GLR medijuojami atsakai yra inhibuojami klasikinių iGluRs antagonistų - AP-5 ir DNQX. Būtent farmakologiniais tyrimais įvairiuose augaluose patvirtinamas GLR receptorių dalyvavimas nuo amino rūgščių priklausančiose fiziologinėse adaptacijose (apžvelgta Weiland *et al.* 2016).

Nors aukštesniesiems augalams būdingi GLR, parodyta, kad šios grupės augalų GLR nėra veikiami NMDA – NMDA tipo receptorių agonisto – bei kitų sintetinių iGluR agonistų (Dennison ir Spalding 2000, Qi *et al.* 2006). iGluRs receptoriuose NMDA jungiasi prie Glu prisijungančio receptoriaus domeno, tačiau NMDA poveikis nuo Glu priklausantiems atsakams aprašytas tik viename baltažiedžio vairo tyrimo (Sivaguru *et al.* 2003) bei kerpsamanėse. Kerpsamanėse tiek Glu, tiek NMDA sukėlė tapačius atsakus – spontaninius veikimo potencialus inhibuojamus AP-5 ir DNQX (Krol *et al.* 2007). Taigi NMDA poveikis elektriniams signalams kol kas nustatytas tik vienoje augalų grupėje.

Aktyvūs sintetiniai GLR agonistai ir antagonistai leistų tikslingai taikyti farmakologinius tyrimus ir išskirti tik nuo GLR priklausančius atsakus. Juolab, kad glutamaterginė sistema yra viena nedaugelio tiesiogiai su elektriniais signalais susijusių signalinių kaskadų augaluose kur išorinio signalo transdukcijos tarpininkas yra nustatytas. Nors elektrinių signalų sklidimo ir jį lydinių fiziologinių adaptacijų reguliacijos mechanizmai nėra aiškūs, glutamaterginė sistema yra viena palankiausių elektrinių signalų moduliacijai tirti.

Pastarųjų dešimtmečių AR sukeltų signalų tyrimai rėmėsi aukštesniais augalais (apžvelgta Weiland *et al.* 2016) nors elektrinių signalų tyrimai jų audiniuose yra keblūs. VP sklindant audiniu, neįmanoma išskirti pavienių ląstelių sužadimo ir charakterizuoti atskirų veikimo potencialų, todėl nėra žinoma, kaip ir kokius elektrinių signalų parametrus veikia AR ar kiti GLR agonistai,

nors parodyta, kad AA gali juos moduluoti (Krol *et al.* 2007). Elektriniai signalai augaluose savo savybėmis skiriasi tiek tarp augalų rūšių, tiek tarp audinių, dėl to, net veikimo potencialų parametrai ir jų vertinimas yra beveik nestandartizuoti (pvz. sužadavimo slenksčio charakterizavimas). Taip pat, aukštesniųjų augalų audiniuose keblu taikyti fiksuotos įtampos metodą leidžiantį išskirti atskiras jonų pernašos sistemas ir jų moduliacijas sužadavimo metu. Taigi, detaliam aplinkos poveikio sukeltų augalų elektrinių signalų moduliacijos tyrimui reikalinga tiek metodinė standartizacija, tiek daugiaparametrinė veikimo potencialų charakteristikų analizė. Tai leidžia atlikti modelinės sistemos – menturdumblių – tyrimai. Tarpubamblinės menturdumblių ląstelės dėl savo dydžio, išreikštų ir lengvai sužadamų veikimo potencialų (Beilby 2007) leidžia atskiroje augalinėje ląstelėje tiksliai nustatyti veikimo potencialų sužadavimo slenkstį, charakterizuoti veikimo potencialų parametrus ir išskirti atskiras jonų pernašos sistemas pasitelkiant fiksuotos įtampos metodą (Kisnieriene *et al.* 2018). Todėl ši modelinė sistema tinkama tirti esmines elektrinių signalų savybes ir jų moduliacijas veikiant įvairiems aplinkos veiksniams (Sevriukova *et al.* 2014, Kisnieriene *et al.* 2018, Kisnieriene *et al.* 2019). Menturdumbliai yra sausumos augalų pirmtakai (Zhong *et al.* 2015), tačiau nei AR, nei sintetinių iGluR agonistų poveikio tyrimų menturdumbliuose iki šiol atlikta nebuvo, taigi nėra žinoma, ar šiame taksone elektriniai signalai yra veikiami GLR agonistų. Šis tyrimas skirtas pristatyti VP parametrų įvertinimo būdus bei detaliam įvertinti elektrinių signalų moduliacijas veikiant AR ir NMDA.

Darbo tikslas:

Kiekybiškai įvertinant menturdumblių augalinės ląstelės elektrinių signalų parametrus, nustatyti galimą glutamato tipo receptorių agonistų poveikį bei jo inhibiciją jonotropinių glutamato receptorių antagonistais.

Darbo uždaviniai:

- 1) Nustatyti Asn, Glu ir NMDA poveikį elektrinių signalų parametrums:
 - a. membranos ramybės potencialui ir varžai,
 - b. veikimo potencialo sužadavimo slenksčiui, amplitudei ir trukmei,
 - c. ištekancio chloro jonų srauto amplitudei ir laikinėms charakteristikoms sužadavimo metu.
- 2) Nustatyti, ar Glu, Asn ir NMDA poveikis grįžtamas.
- 3) Nustatyti jonotropinių glutamato receptorių antagonistų poveikį elektrinių signalų parametrums.
- 4) Nustatyti, ar galimas NMDA poveikis yra inhibuojamas jonotropinių glutamato receptorių antagonistų.

Darbo naujumas ir aktualumas:

tyrimas pirmą kartą aprašo:

- a) koreliacijas tarp elektrinių signalų parametrų, užregistruotų fiksuotos srovės ir įtampos metodais pavienėje menturdumblų ląstelėje standartinėse sąlygose;
- b) kriterijų veikimo potencialo sužadavimo slenksčiui augaluose nustatyti;
- c) ištekancio chloro jonų srauto laikines charakteristikas kaip elektrofiziologinius parametrus, veikiamus glutamato tipo receptorių agonistų;
- d) Glu ir Asn sukeltų elektrinių signalų moduliacijų atskiroje augalinėje ląstelėje pobūdį;
- e) NMDA poveikį menturdumblų ląstelių elektriniams parametrums, kurio pobūdis yra tapatus amino rūgščių poveikiui. Nustatyta, kad NMDA efektas nestebimas ląsteles veikiant NMDA kartu su NMDA ir ne NMDA tipo jonotropinių glutamato receptorių antagonistais.

Ginamieji teiginiai:

- 1) Multiparametrinė elektrinio sužadavimo analizė leidžia detaliai įvertinti glutamaterginės sistemos moduluojamus elektrinių signalų pokyčius pavienėje augalinėje ląstelėje.
- 2) Glu ir Asn didina menturdumblių ląstelių sužadimumą ir moduluoja veikimo potencialų parametrus, poveikio intensyvumas priklauso nuo koncentracijos.
- 3) Sintetinis iGluRs agonistas NMDA moduluoja menturdumblių elektrinių signalų parametrus, šio poveikio pobūdis yra tapatus tirtų amino rūgščių poveikiui, tačiau NMDA veikia intensyviau.
- 4) NMDA poveikis nestebimas ląsteles veikiant NMDA kartu su NMDA bei ne NMDA tipo jonotropinių glutamato receptorių antagonistais AP-5 ir DNQX.

2. METODIKA

Objektas

Tyrimams naudotos subrendusių žvaigždėtųjų maurašakių *Nitellopsis obtusa* (Devs.) J. Gr. (*Characeae*) tarpubamblinės ląstelės (**Pav. 2.1**).



Pav. 2.1 Žvaigždėtojo maurašakio (*Nitellopsis obtusa*) tarpubamblinė ląstelė (apačioje) ir talomo segmentas (viršuje) sudarytas iš dviejų tarpubamblinių ląstelių sujungtų daugialąsteliniais bambliais (pažymėta rodyklėmis), nuo kurių šakojasi menturiai.

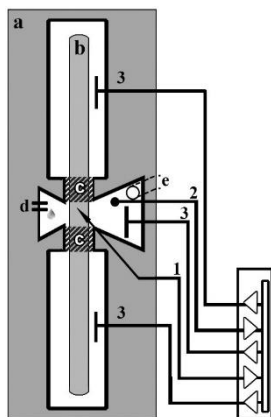
Žvaigždėtasis maurašakis (*Nitellopsis obtusa*) – Eurazijoje augantis gėlų ir pusiau sūrių vandenų dumblis, vienintelis *Nitellopsis* genties atstovas (McCourt *et al.* 1999). *Nitellopsis* priskiriami menturdumbliams (*Charophyta*), maurabraginių (*Characeae*) šeimai (Lewis ir McCourt 2004). *Characeae* yra vieni pirmųjų daugialąsčių dumblių, pasižyminčių daugeliu sausumos augalams būdingų bruožų, bei laikomi jų pirmtakais (Boot *et al.* 2012, Zhong *et al.* 2015). Maurabraginių talomas sudarytas iš daugiabranduolių, ilgų (iki 30 cm ilgio ir 0,5 mm storio), tarpubamblinių ląstelių, sujungtų bambliais. Augalas prie telkinio dugno tvirtinasi bespalviais rizoidais, sujungtais žvaigždės formos vegetatyvinio dauginimosi organais – žvaigždutėmis. Didžioji ląstelės tūrio dalis užimama vakuolės (iki

95%), endoplazmos storis tarp sienelės ir tonoplasto esti $\sim 10 \mu\text{m}$; ji nuolat spirališkai juda aplink vakuolę iki $100 \mu\text{m/s}$ greičiu (Beilby ir Casanova 2014). Dėl savo dydžio, morfologinių ir fiziologinių savybių menturdumblų tarpubamblinės ląstelės leidžia taikyti įvairias elektrofiziologines metodikas.

Užaugę žvaigždėtųjų maurašakių gniūžulai rugsėjo – lapkričio mėnesiais buvo surinkti Stankos ež. (Vilniaus apsk. Trakų r.), iš 4 – 8 m gylio, ir transportuoti ežero vandenyje. Laboratorijoje laikyti stikliniuose akvariumuose, krano vandenyje, kambario temperatūroje ($20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$), apšviesti standartiniu apšvietimu 12 val. per parą ($95 \pm 0,19 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Prieš eksperimentus, antra arba trečia tarpubamblinė ląstelė nuo talomo viršūnės būdavo atskiriama nuo gretimų tarpubamblinių ląstelių ir apšviesta per naktį laikyta kontroliniame tirpale (APW).

Mikroelektrodinė technika



Pav. 2.2 Registravimo kameros principinė schema ir elektrodų išdėstymas:

- a – organinio stiklo kamera
- b – tarpubamblinė ląstelė
- c – centrinę kameros dalį (5 mm) izoliuojantys vazelininiai tilteliai
- d, e – perfuzinė sistema (peristaltinė pompa ir siurbliukas)
- 1 – viduląstelinis stiklinis elektrodas
- 2 – referentinis stiklinis elektrodas
- 3 – išoriniai stimuliuojamieji elektrodai (Ag/AgCl).

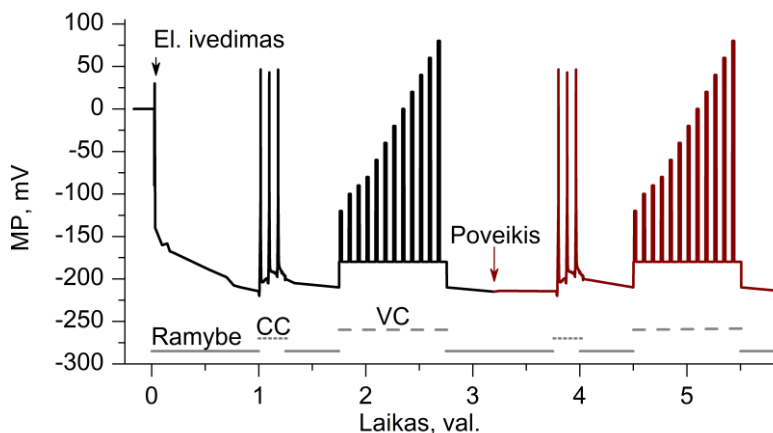
Tarpubamblinės ląstelės bioelektriniams signalams registruoti buvo naudojama viduląstelinė mikroelektrodinė technika, taikyti dviejų elektrodų porų fiksuotos srovės ir fiksuotos įtampos metodai. Registravimo kameros schema ir elektrodų išdėstymas vaizduojami **Pav. 2.2**. Viduląsteliniai mikroelektrodai buvo gaminami iš

borosilikatinių stiklo kapiliarų (vidinis \varnothing 0,84 mm, World Precision Instruments) naudojant stakles (Sutter Instrument P-1000), išgaunant 1-3 μm (8 – 20 M Ω) galiuko diametrą. Referentinio elektrodo galiuko diametras \sim 100 μm . Viduląstelinis elektrodas pildytas 3 M KCl tirpalu, referentinis – agar-agaro (2,5 %) 3 M KCl tirpalu. Elektrodo laikikliai gaminti iš kalomelio (Hg₂Cl₂) ir taip pat pildyti 3 M KCl tirpalu. Nuolatinė elektros srovė tarp atskirų kameros dalių leista išoriniais chloresidabriniais elektrodais. Registavimui naudotas fiksuotos įtampos/srovės stiprintuvas TEC-10CX (NPI Electronic), analogas-kodas keitiklis Digidata 1440A (Molecular Devices), kontroliuojamas pCLAMP 10.2 (Molecular Devices) programine įranga. Naudotas diskretizavimo dažnis: 100-1000 Hz, signalo stiprinimas 10 \times . Tirpalų pratekėjimas (\sim 1 ml/min) centrinėje kameros dalyje realizuotas naudojant peristaltinę pompą ir vakuuminį siurbli (Scientifica PPS). Mikroelektrodas į ląstelę įvestas manipulatoriumi (PatchMan, Eppendorf), stebint binokuliaru (7 \times didinimas). Dėl didelio vakuolės tūrio (\sim 95%, Beilby ir Casanova 2014), mikroelektrodas paprastai įvedamas į vakuolę, taigi, registuojami veikimo potencialai atspindi tiek plazminės membranos, tiek tonoplasto sužadinimą. Mikroelektrodo galiuko pozicija identifikuojama pagal VP formą (Kisnieriene *et al.* 2019).

Ekspimento eiga

Ekspimentai atlikti kambario temperatūroje (20 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$), dienos metu, esant standartiniam apšvietimui (95 \pm 0,19 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Tarpubamblinė ląstelė guldoma registravimo kameroje, centrinė kameros dalis (5 mm) izoliuojama vazelinu, visos kameros dalys užpildomos APW tirpalu, centrinė kameros dalis perfuzuojama. Centrinėje kameros dalyje greta ląstelės tvirtinamas referentinis elektrodas, viduląstelinis elektrodas įvedamas į ląstelę. Po elektrodo įvedimo perfuzuojant kontroliniu tirpalu laukiama mažiausiai valandą. Nusistovėjus ramybės potencialui (RP), pradedama **Pav. 2.3** apibūdinta registravimų serija. Ekspimentai atlikti tik su ląstelėmis,

kurių RP po elektrodo įvedimo buvo neigiamesnis nei -175 mV. Tokiu RP pasižymi ląstelės, esančios aktyvios protonų pompos būsenos, būdingos ląstelėmis aplinkos pH esant ~ 7 pH, o $[K^+]_{out} \sim 0,1$ mM. Plazminėje membranoje protonų pompos aktyviai perneša protonus į užląstelinę erdvę, taip hiperpolarizuojamas membranos potencialas (angl. *pump state*, Beilby ir Casanova 2014). Elektrofiziologiniai matavimai atlikti kaip nurodyta **Pav. 2.3**: trumpais hiperpolarizuojančios srovės stimulais vertinama membranos varža, tuomet 3 VP sužadinami tolydžiai kylančia nuolatine srove ($0,02$ μ A/s); kai VP sužadinamas, DC nutraukiama (**Pav. 2.4**). Po 30 min ramybės periodo taikomas fiksuotos įtampos metodas (VC), po kurio



Pav. 2.3 *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinės ląstelės elektrinių signalų registravimo protokolas. Po elektrodo įvedimo laukiama mažiausiai valandą, tuomet kartojamos identiškos registravimo serijos. Viena registravimo serija susideda iš veikimo potencialų stimuliavimo tolygiai kylančios srovės stimulais (CC) 5 min. intervalais, 30 min ramybės periodo ir po jo sekančio registravimo fiksuotos įtampos metodu (VC): centrinėje kameros dalyje MP fiksuojamas ties -180 mV ir 5 min. intervalais žadinama 10 s trukmės stačiakampiais įtampos stimulais kas 10-20 mV. Po VC seka 30 min. ramybės periodas, tuomet centrinėje kameros dalyje tirpalas keičiamas į pasirinktą ir ląstelė ramybės būsenoje veikiama 30 min. Iliustracijoje raudonas segmentas žymi kartojamą registravimų seriją ir poveikį pasirinkta medžiaga. Vieno eksperimento metu atliekamos 2-3 registravimų serijos.

taip pat seka 30 min ramybės periodas, tuomet ląstelė centriniėje kameros dalyje veikiama pasirinktu tirpalu 30 min, ir registravimų serija kartojama.

Ląstelės buvo veikiamos šiais tirpalais ir jų koncentracijomis:

- Galimi GLR agonistai:
 - L-Glu (0,1 mM ir 1 mM),
 - L-Asn (0,1 mM ir 1 mM),
 - NMDA (0,01; 0,1 ir 1 mM),
 - L-Glu + NMDA (kiekvieno po 0,1 mM);
- NMDA tipo iGluR receptorių antagonistu AP-5 (0,1 mM);
- AMPA/Kainato tipo iGluR receptorių antagonistu DNQX (0,1 mM).

AP-5 ir DNQX inhibicinis efektas buvo vertinamas ląstelę pirmiausia veikiat antagonistu tirpalu, tuomet antagonistu ir agonistu mišiniu (*pretreatment*): APW → APW + antagonistas → APW + antagonistas + agonistas.

Taip pat inhibicinis efektas tirtas ląstelę veikiat antagonistu ir agonistu tirpalų mišiniu (*co-treatment*). Tokie eksperimentai buvo atlikti naudojant NMDA ir AP-5 mišinį (kiekvieno po 0,1 mM), bei Glu ir AP-5 mišinį (kiekvieno po 0,1 mM). Visoms tyrimų grupėms buvo taikyti identiški registravimų protokolai.

Naudoti tirpalai

Kontrolinis tirpalas: APW (0,1 mM KCl, 1,0 mM NaCl, 0,1 mM CaCl₂, 3 mM TRIS, pH iki 7,2 sureguliuotas naudojant HEPES). APW' (APW + 1 mM HCl, pH 7,2) buvo naudotas kaip kontrolė 1 mM Glu(Cl) tyrimams. Visi agonistų ir antagonistų tirpalai buvo gaminti APW pagrindu, išlaikant kontrolinio tirpalo pH ir jonų koncentracijas. Naudotos medžiagos: Asn (L-asparagino monohidratas), Glu (Kalio L-glutamatas arba L-Glutamato hidrochloridas); NMDA (N-metil-D-asparto r.), AP-5 (DL-2-Amino-5-fosfopentanoninė r.), DNQX (6,7-Dinitrokvinoxalino-2,3(1H,4H)-dionas) (Sigma Aldrich).

Vertinti elektrofiziologiniai parametrai

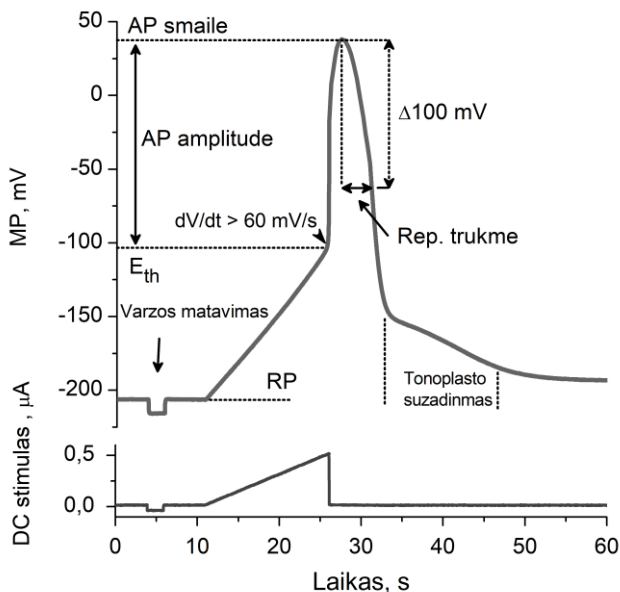
Elektrofiziologiniai parametrai buvo vertinti kaip aprašyta Kisnieriene *et al.* (2018) ir Lapeikaite *et al.* (2019). Fiksuotos srovės metodu (**Pav. 2.4**):

- RP vertintas 2 s trukmės hiperpolarizuojančiais srovės stimulais prieš sukeltant VP, prieš ir po veikimo pasirinktomis medžiagomis.
- Membranos varža vertinama stimuliuojant keliais 2 s trukmės hiperpolarizuojančios srovės stimulais prieš sukeltant VP, prieš ir po veikimo pasirinktomis medžiagomis. Membranos varža skaičiuojama Ω/m^2 pagal:

$$R = \frac{\Delta U}{I \pi d l}$$

kur ΔU - MP skirtumas (V), I – srovės stipris (A), l – ląstelės ilgis centrinėje kameros dalyje (0,005 m); d – ląstelės diametras (m), π – įprastinė konstanta.

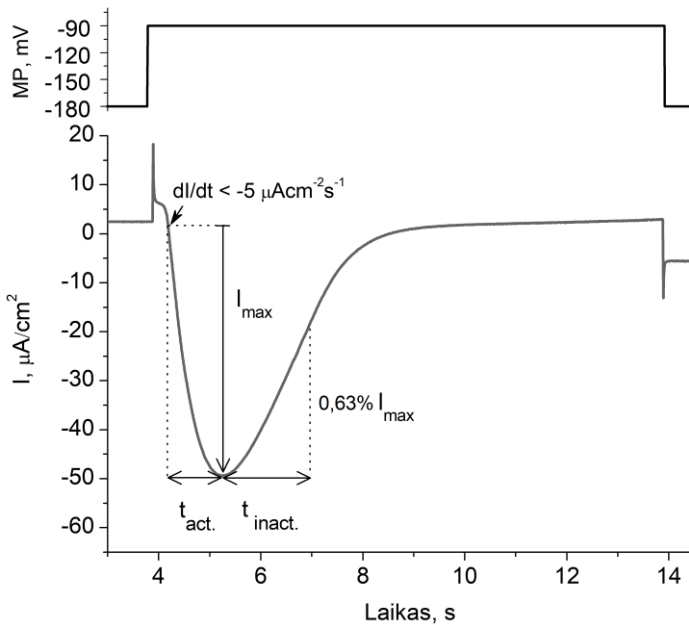
- E_{th} – VP sužadinimo slenkstis – MP, kai depolarizacijos greitis viršija 60 mV/s.
- VP smailė (MP, mV).
- VP amplitudė – skirtumas tarp E_{th} ir VP smailės potencialų.
- Repolarizacijos trukmė – laikas, per kurį MP repolarizuojasi 100 mV nuo VP smailės potencialo.



Pav. 2.4 *Nitellopsis obtusa* trapubamblinės ląstelės veikimo potencialas (VP), sukeltas tolydžiai didėjančios srovės stimulu. Vertinti elektrofiziologiniai parametrai: E_{th} – sužadavimo slenkstis - MP, kai depolarizacijos greitis viršija 60 mV/s; VP amplitudė – MP intervalas nuo E_{th} iki VP smailės MP; Repolarizacijos trukmė – laikas, per kurį MP repoliarizuojasi 100 mV nuo smailės MP; Membranos varža vertinta stimuliuojant stačiakampiais hiperpoliarizuojančiais srovės stimulai.

Fiksuotos įtampos metodu vertinta įtekančios srovės amplitudė ir laikinės charakteristikos sužadavimo metu. *Nitellopsis obtusa* didelės amplitudės įtekančios krypties srovė buvo identifikuota kaip chloro jonų srautas (Lunevsky *et al.* 1983). Šio srauto pradžia šiame darbe laikomas srautas, viršijantis $-5 \mu\text{Acm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Tyrimų metu buvo pastebėta, kad GLR agonistai veikia ne tik chloro jonų srauto amplitudę, bet ir trukmę, todėl įvesti du laikinių charakteristikų parametrai. Visi fiksuotos įtampos metodu vertinti chloro jonų srauto parametrai (**Pav. 2.5**):

- I_{\max} – maksimali ištekancio jonų srauto amplitudė (skirtumas tarp srauto vertės kur dI/dt mažesnė nei $-5 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ir maksimalios vertės).
- I_{-90} – ištekancio jonų srauto amplitudė ties -90 mV fiksuotu MP.
- $t_{\text{act.}}$ – chloro jonų srauto aktyvacijos trukmė – laiko atkarpa nuo srauto pradžios iki maksimalios vertės.
- $t_{\text{inact.}}$ - chloro jonų srauto inaktyvacijos trukmė – laiko atkarpa, per kurią srautas sumažėja 63% maksimalios vertės.



Pav. 2.5 Ištekantis chloro jonų srautas, registruotas fiksuotos įtampos metodu ties -90 mV MP. Vertinami parametrai: I_{\max} – maksimalaus srauto amplitudė ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) (skirtumas tarp srauto vertės, kur dI/dt mažesnė nei $-5 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ir maksimalios vertės); $t_{\text{act.}}$ - srauto aktyvacijos trukmė; $t_{\text{inact.}}$ – srauto aktyvacijos trukmė – laiko atkarpa, per kurią srautas sumažėja 63% nuo maksimalios vertės.

Kiekvieno parametro pokyčiai nuo verčių kontroliniame tirpale (Δ) veikiant įvairiomis agonistų koncentracijomis buvo aproksimuoti Michaelis-Menten kinetika:

$$\Delta = \frac{\Delta_{max} \cdot [X]}{K_M + [X]}$$

kur Δ_{max} – maksimalus galimas parametro pokytis, $[X]$ – agonisto koncentracija. K_M - Michaelis-Menten konstanta – koncentracija, sukianti parametro pokytį, lygų pusei Δ_{max} .

Statistiniai metodai

Eksperimentai tiriant konkrečią medžiagą/koncentraciją buvo kartojami 3-9 kartus. Ar statistinei analizei naudotos imtys pasiskirsčiusios pagal normalųjį skirstinį vertinta Shapiro-Wilk'o testu. Parametrų vertės po poveikio pasirinktomis medžiagomis buvo lyginamos su vertėmis kontroliniame tirpale toje pačioje ląstelėje. Vertinti pirmi fiksuotos srovės metodu stimuliuoti veikimo potencialai. Pokyčiams įvertinti buvo naudojamas porinis dvipusis Stjudento t-testas. Poveikiams tarp skirtingų koncentracijų ir medžiagų palyginti buvo naudojamas Stjudento t-testas nepriklausomoms imtims. Visais atvejais skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$, rezultatuose žymėti žvaigždutėmis. Koreliacijoms tarp parametrų vertinti naudotas Pearson'o koreliacijos koeficientas normaliai pasiskirsčiusioms imtims, kitu atveju – Spearman'o koreliacijos koeficientas. Duomenys pateikiami kaip vidurkis \pm standartinė paklaida (jei nenurodyta kitaip). Duomenų apdorojimas ir statistinė analizė atlikta naudojantis:

- Clampfit (Molecular Devices Corporation),
- Excel (Microsoft Office Corporation),
- OriginPro (OriginLab Corporation),
- R programine kalba (R Core Team),
- Statistica (TIBCO Software).

3. REZULTATAI

Kontrolinių eksperimentų apžvalga

Norint įsitikinti, kad ramybės periodai tarp pakartotinių ląstelės sužadinių yra pakankami, taip pat, kad naudotų *Nitellopsis* ląstelių elektrofiziologiniai parametrai nekinta laike, dienos metu, buvo atlikti laikinės kontrolės eksperimentai. Eksperimentų metu registruotos 3 iš eilės serijos kontroliniame tirpale (APW). Pirmoje serijoje užregistruoti elektrofiziologiniai parametrai buvo palyginti su užregistruotais paskutinėje (5,5 val skirtumas). Gauti rezultatai rodo ($n=5$), kad standartinėse sąlygose dienos metu *Nitellopsis obtusa* ląstelių elektrofiziologiniai parametrai yra stabilūs. Statistiškai reikšmingų skirtumų negauta vertinant ramybės potencialą ($p=0,6$), membranos varžą ($p=0,7$), VP amplitudę ($p=0,3$), sužadavimo slenkstį ($p=0,2$), smailės vertę ($p=0,6$) ir VP trukmę ($p=0,5$). Fiksuotos srovės metodu gauti duomenys taip pat rodo, kad ištekančio chloro jonų srauto I_{\max} vertė nekinta ($p=0,6$), kaip ir t_{act} ir t_{inact} trukmės ($p=0,6$ ir $p=0,5$ atitinkamai). Vidutinės elektrofiziologinių parametrų vertės pristatytos **Lentelėje 3.1**.

Tiriant 1 mM Glu(Cl) poveikį, naudotas APW' kontrolinis tirpalais ($[Cl]_o$ 2,3 mM vietoj įprastos 1,3 mM koncentracijos). Tai leidžia išskirti Glu poveikį nuo galimos didesnės chloro koncentracijos įtakos. Prieš ląstelę veikiant 1 mM Glu tirpalu, buvo atlikta dviguba kontrolė (APW→APW') ir palygintos el. parametrų vertės tarp kontrolinių tirpalų. Rezultatai rodo, kad pakitusi chloro koncentracija ląstelės aplinkoje nedaro statistiškai reikšmingo poveikio membranos RP ($p=0,7$) ir varžai ($p=0,2$), taip pat neveikia VP E_{th} ($p=0,7$) ir smailės potencialo ($p=0,1$) bei VP trukmės ($p=0,9$), tačiau reikšmingai padidina VP amplitudę: ji išaugo nuo 125 ± 4 mV APW tirpale iki 132 ± 4 mV APW' tirpale, $\Delta 6,7\pm 1,6$ mV, $p=0,01$, $n=5$). Fiksuotos įtampos metodu nustatyta, kad padidėjusi išorinio chloro koncentracija neveikia laikinių chloro srauto charakteristikų: ties -90 mV fiksuotu MP t_{act} ir t_{inact} trukmės nepasikeitė ($p=0,8$ ir $p=0,9$

atitinkamai), kaip ir visame įtampų ruože, tačiau nustatyta, kad maksimalus chloro jonų srautas išauga (nuo $-44 \pm 3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (-90 mV MP) iki $-50 \pm 3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($\Delta 6 \pm 2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $15 \pm 5\%$, $p=0,02$, $n=9$), Taip pat pasikeitė chloro srauto reversinis potencialas- nuo $\sim 88 \pm 6 \text{ mV APW}$ tirpale iki $\sim 74 \pm 7 \text{ mV APW}$ tirpale. Šis poslinkis atitinka Nernsto potencialo pokytį padidinus išorinę Cl^- koncentraciją, todėl daroma prielaida, kad viduląstelinė chloro koncentracija nekinta. Apibendrinant, galima teigti, kad tiriant AR druskų poveikį, būtina atsižvelgti jonų, tarp jų ir chloro, koncentracijos pokyčius, todėl ir šiame darbe $1 \text{ mM Glu}(\text{Cl})$ poveikio tyrimui tinkamai kontrolei buvo pasirinktas APW'.

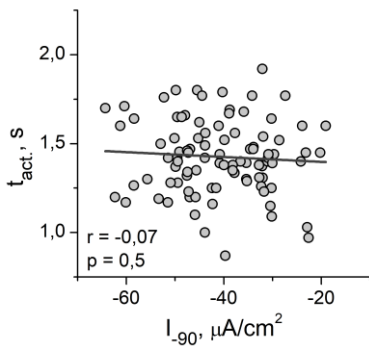
Elektrofiziologiniai parametrai standartinėse sąlygose

Eksperimentai buvo atlikti su 93-mis *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinėmis ląstelėmis. Visų vertintų elektrofiziologinių parametru vidutinės vertės standartinėse sąlygose pateiktos **3.1 Lentelėje**.

Lentelė 3.1 *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinių ląstelių elektrofiziologinių parametru vidutinės vertės standartinėse sąlygose (APW), $n=93$.

Parametras	Vidurkis \pm SD
RP, mV	-211 ± 17
E_{th} , mV	-97 ± 13
VP smailė, mV	30 ± 14
VP amplitudė, mV	128 ± 19
Rep. ($\Delta 100 \text{ mV}$), s	$3,8 \pm 1$
I_{max} , $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	-48 ± 11
I_{90} , $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	-41 ± 10
t_{act} . (at -90 mV), s	$1,43 \pm 0,2$
t_{inact} . (at -90 mV), s	$2,2 \pm 0,4$
R, Ω/m^2	$1,8 \pm 0,4$

Kadangi vertinti įvairūs elektrofiziologiniai parametrai, įskaitant chloro jonų srauto laikines charakteristikas, buvo įvertintos parametru tarpusavio koreliacijos ląstelėje (Pearson'o arba Spearman'o). Nustatyta, kad tirtoje ląstelių, esančių aktyvios protonų pompos būsenoje (*pump state*), imtyje nei VP amplitudė, nei E_{th} , ar VP trukmė nekoreliuoja su RP, pavyzdžiui, E_{th} ir RP $r=0,001$, $p=0,99$, kitų minėtų parametru $p>0,4$. Tai rodo, kad RP variacija nėra susijusi su VP parametrais. Taip pat nustatyta, kad VP



Pav. 3.1 Koreliacija tarp Cl^- srauto ties -90 mV MP ir jų aktyvacijos trukmių ($t_{\text{act.}}$) visose tirtose ląstelėse, standartinėse sąlygose (APW), $n=93$.

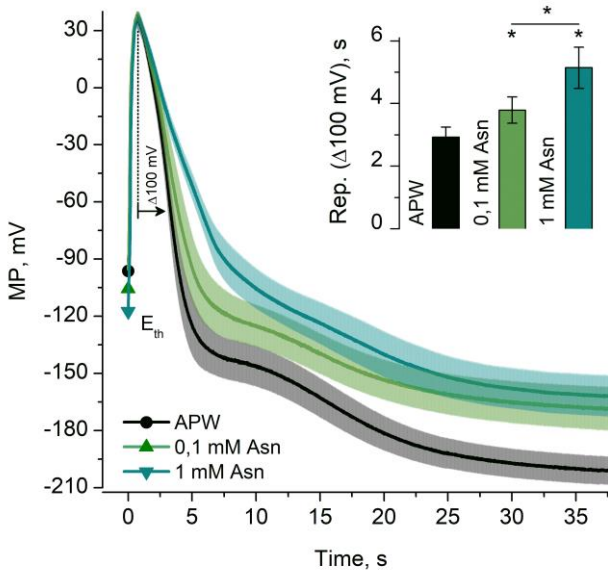
vertėmis vaizduojamos **Pav. 3.1** ($r=-0,07$, $p=0,5$). Srauto inaktyvacijos trukmė taip pat nekoreliuoja su srauto amplitude ($r=0,04$, $p=0,7$), bet $t_{\text{act.}}$ ir $t_{\text{inact.}}$ koreliuoja tarpusavyje ($r=0,3$, $p<0,001$). Šiais rezultatais remiantis, chloro srauto amplitudė ir laikinės charakteristikos vertinami kaip atskiri parametrai. $t_{\text{act.}}$ ir $t_{\text{inact.}}$ taip pat vertinami atskirai, nes jų priklausomybės nuo fiksuoto membranos potencialo turi savitas formas (**Pav. 3.4** ir **Pav. 3.5**).

GLR agonistų – Glu ir Asn – poveikis VP parametrams

Asparagino poveikis VP parametrams

$0,1$ mM ($n=7$) ir 1 mM ($n=7$) Asn tirpalų poveikis buvo tiriamas kaip nurodyta metodikos skyriuje. Nors aukštesniuosiuose augaluose parodyta, kad GLR agonistai sukelia membranos depoliarizaciją (Stephens *et al.* 2008), nei $0,1$ mM nei 1 mM Asn tirpalas nesukėlė *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranos RP ir varžos pokyčių ($n=7$ abiemis koncentracijoms) ar spontaninių VP generavimo, tačiau, elektriškai sužadinus VP, buvo stebėti reikšmingi jų parametru pokyčiai, priklausantys nuo Asn koncentracijos (**Pav. 3.2**).

parametrai nekoreliuoja tarpusavyje, pavyzdžiui VP amplitudės ir repoliarizacijos trukmės $r=-0,08$, $p>0,4$. Ištekantis Cl^- jonų srautas yra VP depoliarizacinės fazės priežastis, taigi, kaip galima tikėtis, nustatyta, kad VP amplitudė koreliuoja su maksimaliu Cl^- srautu sužadavimo metu - I_{max} ($r=-0,62$, $p<0,001$), tačiau nustatėme, kad laikiniai šio srauto parametrai nekoreliuoja su srauto amplitude. I_{90} vertės su atitinkamomis t_{act} (ties -90 mV)

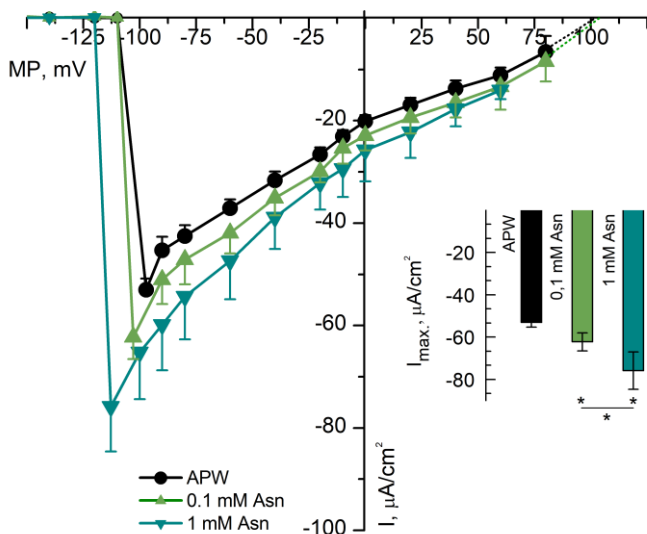


Pav. 3.2 Vidutinės VP repoliarizacijos trukmės ir sužadinimo slenkščio (E_{th}) vertės kontroliniame tirpale (APW) ir veikiant 0,1 ir 1 mM Asn tirpalu. Linijos atspindi vidutines repoliarizacijos kreives, permatomi plotai – SE. Punktyrai žymi vertintas 100 mV repoliarizacijos trukmes vaizduojamas viršutiniame grafike, $n=7$. Žvaigždutės žymi statistiškai reikšmingus skirtumus.

Asn statistiškai reikšmingai hiperpolarizavo VP E_{th} . Veikiant 0,1 mM Asn E_{th} hiperpolarizuotas 9 ± 3 mV ($10 \pm 4\%$), veikiant 1 mM Asn - 21 ± 3 mV ($22 \pm 5\%$), šie pokyčiai reikšmingai skyrėsi tarpusavyje. Kaip matoma **Pav. 3.2**, VP smailės vertės veikiant Asn nekito. Hiperpolarizuotas sužadinimo slenkstis lėmė VP amplitudės išaugimą nuo 132 ± 6 mV APW tirpale iki 143 ± 6 mV ($\Delta 9 \pm 3\%$) veikiant 0,1 mM Asn ir iki 153 ± 3 mV ($\Delta 16 \pm 3\%$) veikiant 1mM Asn. Be VP amplitudės išaugimo, buvo stebėta ilgesnė VP repoliarizacijos trukmė. APW tirpale vidutinė rep. trukmė buvo $3 \pm 0,3$ s. Veikiant 0,1 mM Asn ši trukmė pailgėjo iki $3,7 \pm 0,4$ s ($\Delta 0,9 \pm 0,2$ s, $32 \pm 11\%$), o veikiant 1 mM Asn iki $5,1 \pm 0,6$ s ($\Delta 2,2 \pm 0,5$ s, $74 \pm 16\%$). Taigi, priklausomai nuo

Asn koncentracijos išoriniame tirpale, VP amplitudė išauga, o repoliarizacijos trukmė pailgėja.

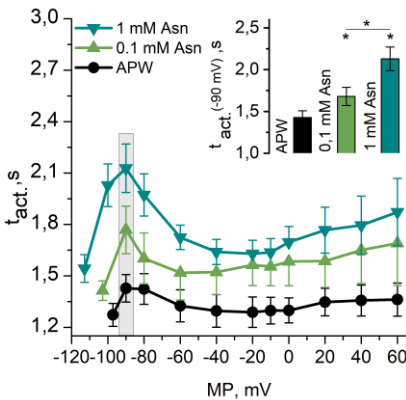
Fikuostos įtampos metodu buvo nustatyta, kad, kaip ir VP atveju, sužadavimo metu, veikiant Asn, išauga I_{\max} vertė bei aktyvacijos ir inaktyvacijos trukmės ties -90 mV MP, todėl vertės ties šia įtampa buvo naudotos statistinei analizei tiek aktyvacijos, tiek inaktyvacijos trukmėms vertinti. Vidutinė voltamperinė chloro jonų srauto charakteristika su atitinkamomis t_{act} ir t_{inact} trukmėmis pavaizduota **Pav. 3.3**, **Pav. 3.4**, **Pav. 3.5**. APW tirpale I_{\max} buvo $-53 \pm 2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (ties ~ -100 mV MP), veikiant $0,1$ mM pirmas sužadinimas buvo stebimas ties neigiamesniu nei -100 mV potencialu ir vidutinė I_{\max} vertė buvo $-62 \pm 4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($\Delta 9 \pm 4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $17 \pm 6\%$, $n=7$), tuo tarpu veikiant 1 mM Asn I_{\max} stebėtas ties neigiamesniu potencialu (< -110 mV), o vidutinė I_{\max} vertė išaugo iki $-76 \pm 9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($\Delta 24 \pm 6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $41 \pm 16\%$, $n=7$) (**Pav. 3.3**).



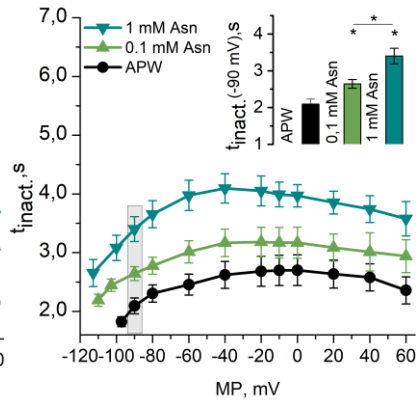
Pav. 3.3 Chloro jonų srauto priklausomybė nuo fiksuoto membranos potencialo kontroliniame tirpale (APW) ir veikiant $0,1$ ir 1 mM Asn. MP buvo fiksuotas ties -180 mV ir 10 s depoliarizuojamas $10 - 20$ mV žingsniais. I_{\max} vertės vaizduojamos histogramoje, žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus, $n=7$ kiekvienai koncentracijai.

Vidutinė I_{90} vertė APW tirpale buvo $-45 \pm 3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Nors Cl^- srauto amplitudė išaugo ties visomis MP vertėmis, statistškai reikšmingų skirtumų ties -90 mV veikiant abiem Asn koncentracijomis nebuvo stebėta.

Chloro jonų srauto aktyvacijos trukmė ties -90 mV veikiant $0,1 \text{ mM}$ Asn išaugo nuo $1,4 \pm 0,1 \text{ s}$ (APW) iki $1,7 \pm 0,1 \text{ s}$ ($\Delta 0,3 \pm 0,1 \text{ s}$, $18 \pm 5\%$); veikiant 1 mM Asn – iki $2 \pm 0,1 \text{ s}$ ($\Delta 0,7 \pm 0,2 \text{ s}$, $48 \pm 11\%$) – statistškai reikšmingai (**Pav. 3.4** histograma). Vidutinė t_{inact} trukmė ties -90 mV kontroliniame tirpale buvo $2 \pm 0,1 \text{ s}$ ir veikiant $0,1 \text{ mM}$ Asn išaugo iki $2,6 \pm 0,1$ ($\Delta 0,5 \pm 0,1 \text{ s}$ $28 \pm 5\%$), tuo tarpu veikiant 1 mM Asn – iki $3,4 \pm 0,2 \text{ s}$ ($1,3 \pm 0,1 \text{ s}$, $67 \pm 10\%$). Taigi, tiek chloro jonų srauto aktyvacijos, tiek inaktyvacijos trukmės pailgėjo priklausomai nuo Asn koncentracijos, o jų priklausomybių nuo MP pobūdis tapo ryškesnis, nors pati srauto amplitudė ties -90 mV statistškai reikšmingai nekito.



Pav. 3.4 Vidutinės Cl^- srauto aktyvacijos trukmės (t_{act}) ties fiksuotomis MP vertėmis kontroliniame tirpale (APW) ir veikiant Asn. t_{act} vertės ties -90 mV (pilkame fone) vaizduojamos histogramoje, $n=7$ kiekvienai koncentracijai, žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus.

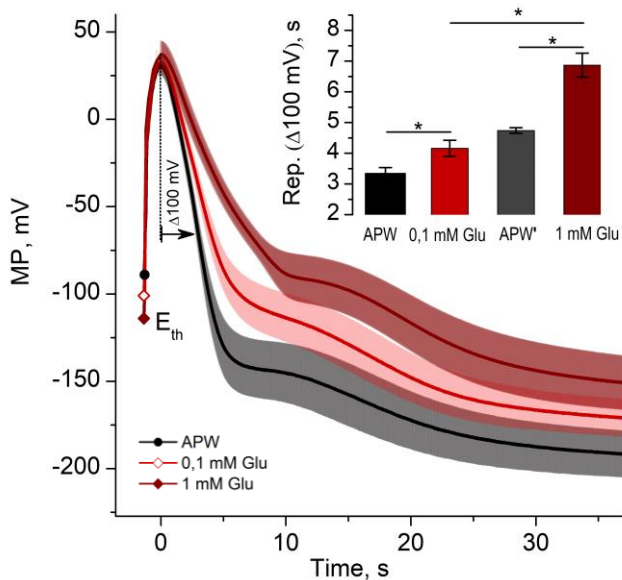


Pav. 3.5 Vidutinės Cl^- srauto inaktyvacijos trukmės (t_{inact}) ties fiksuotomis MP vertėmis kontroliniame tirpale (APW) ir veikiant Asn. t_{inact} vertės ties -90 mV (pilkame fone) vaizduojamos histogramoje, $n=7$ kiekvienai koncentracijai, žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus.

Apibendrinant, galima teigti, kad Asn moduliuoja VP parametrus – didina VP amplitudę hiperpoliarizuodamas sužadavimo slenkstį, prailgina repoliarizacinę VP fazę, didina maksimalų ištekantį chloro jonų srautą bei ilgina jo aktyvacijos ir inaktyvacijos trukmes ties -90 mV. Visi apibūdinti pokyčiai priklausė nuo Asn koncentracijos, čia, ir tolimesniuose rezultatuose, tokia poveikių visuma įvardinama kaip poveikio pobūdis.

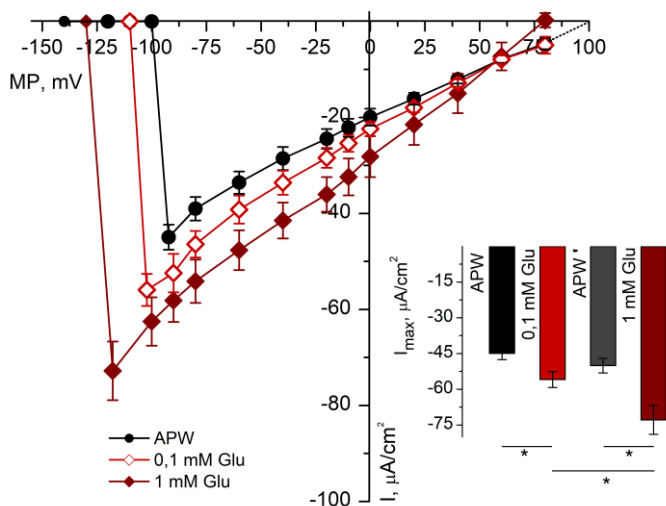
Glutamato poveikis VP parametrams

Kaip ir Asn, buvo tirtas 0,1 mM (n=9) ir 1 mM (n=8) glutamato poveikis. Tiriant 0,1 mM Glu naudotas APW kontrolinis tirpalas, tiriant 1 mM Glu(Cl) – APW' (APW+1 mM HCl).



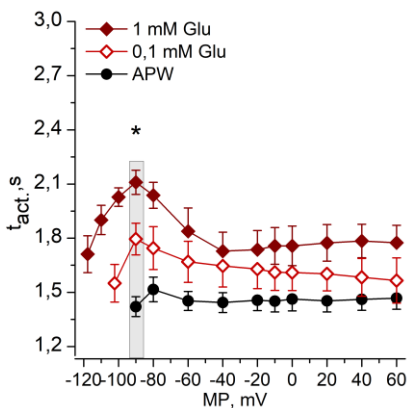
Pav. 3.6 Vidutinės VP repoliarizacijos kontroliniame tirpale (APW) ir veikiant 0,1 ir 1 mM Glu. Linijos žymi vidutinės repoliarizacijos kreives, permatomi plotai – SE, punktyrai – vertintas 100 mV repoliarizacijos trukmes, vaizduojamas viršutiniame grafike. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus nuo verčių kontroliniuose tirpaluose (APW/APW'), n=8-9 kiekvienai koncentracijai.

Nustatyta, kad Glu ir Asn poveikio pobūdžiai tapatūs, o poveikio priklausomybė nuo koncentracijos yra palyginama (plačiau 3.3 skyriuje). Kaip ir Asn, abi Glu koncentracijos nesukėlė spontaninių veikimo potencialų, abi koncentracijos nepakeitė membranos varžos, tačiau 1 mM Glu per 30 min. statistiškai reikšmingai depoliarizavo membranos RP vidutiniškai 26 ± 4 mV nuo -219 ± 5 mV iki -193 ± 9 mV ($12 \pm 2\%$, $n=9$). Sukėlus VP, kaip ir Asn atveju buvo stebėti nepakitę VP smailių potencialai, išaugusi amplitudė dėl E_{th} hiperpolarizacijos ir ilgesnė repoliarizacijos trukmė. VP amplitudė veikiant 0,1 mM Glu išaugo 14 ± 2 mV, ($11 \pm 1\%$, $n=9$), veikiant 1 mM Glu 21 ± 4 mV, ($16 \pm 3\%$, $n=9$) – reikšmingai daugiau nei 0,1 mM Glu. Vidutinis E_{th} veikiant 0,1 mM Glu – -101 ± 2 mV, veikiant 1 mM Glu – -114 ± 6 mV. VP repoliarizacijos trukmė pailgėjo nuo 3,4 s APW iki $4,2 \pm 0,3$ s ($\Delta 0,8 \pm 0,2$ s, $25 \pm 6\%$ $n=9$) veikiant 0,1 mM Glu. 1 mM Glu

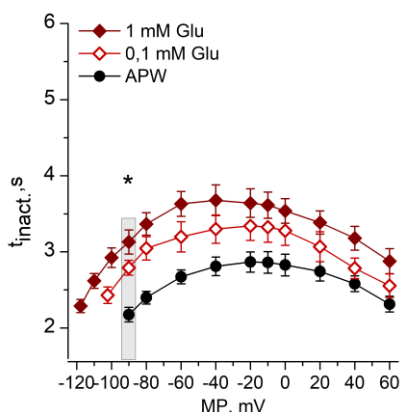


Pav. 3.6 Chloro jonų srauto priklausomybė nuo fiksuoto membranos potencialo kontroliniuose tirpaluose (APW/APW^{*}) ir veikiant 0,1 ir 1 mM Glu. MP buvo fiksuotas ties -180 mV ir 10 s depoliarizuojamas 10 - 20 mV žingsniais. I_{max} vertės vaizduojamos histogramoje, žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus, $n=8-9$ kiekvienai koncentracijai.

repolarizacijos trukmę prailgino nuo $4,7$ s (APW') iki $6,9 \pm 0,4$ s ($\Delta 2,1 \pm 0,4$ s, $45 \pm 8\%$ $n=8$) (**Pav. 3.6**). Fiksuotos įtampos metodu nustatyta, kad Glu reikšmingai didina I_{\max} , o jų sužadinimų potencialai kaip ir Asn atveju slenkasi į neigiamą pusę (APW ~ -90 mV, $0,1$ mM Glu ~ -100 mV, 1 mM Glu ~ -100 mV). $0,1$ mM Glu I_{\max} padidino nuo -45 ± 3 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ iki -56 ± 3 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($\Delta 11 \pm 2$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, $25 \pm 5\%$), tuo tarpu 1 mM Glu – nuo -50 ± 3 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (APW') iki -73 ± 6 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($\Delta 23 \pm 4$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, $45 \pm 7\%$) – reikšmingai daugiau nei $0,1$ mM Glu sukkelto pokyčio atveju (**Pav. 3.7**). Kaip ir Asn, abi Glu koncentracijos pailgino ištekencio chloro jonų srauto trukmę, o ilgiausios t_{act} trukmės irgi stebėtos tiek -90 mV membranos potencialu.



Pav. 3.7 Vidutinės Cl^- srauto aktyvacijos trukmės (t_{act}) ties fiksuotomis MP vertėmis kontroliniame tirpale (APW) ir veikiant glutamatu (Glu). t_{inact} vertės ties -90 mV išskirtos pilku fonu. $n=8-9$ kiekvienai koncentracijai, žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus.



Pav. 3.8 Vidutinės Cl^- srauto inaktyvacijos trukmės (t_{inact}) ties fiksuotomis MP vertėmis kontroliniame tirpale (APW) ir veikiant glutamatu (Glu). t_{inact} vertės ties -90 mV išskirtos pilku fonu. $n=8-9$ kiekvienai koncentracijai, žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus.

Kontroliniame tirpale (APW) t_{act} trukmė buvo $1,4 \pm 0,1$ s, veikiant $0,1$ mM Glu $-1,8 \pm 0,1$ s ($\Delta 0,4 \pm 0,1$ s, $27 \pm 3\%$). Veikiant 1 mM Glu t_{act}

trukmė pailgėjo nuo $1,5 \pm 0,1$ s (APW') iki $2,1 \pm 0,1$ s ($\Delta 0,7 \pm 0,1$ s, $51 \pm 13\%$) – reikšmingai daugiau nei veikiant $0,1$ mM Glu (**Pav. 3.7**). t_{inact} kaip ir Asn atveju pailgėjo visame įtampų ruože. Ties -90 mV. Kontroliniame tirpale (APW) t_{inact} truko $2,2 \pm 0,1$ s, veikiant $0,1$ mM Glu ši vertė pailgėjo iki $2,8 \pm 0,1$ s ($\Delta 0,6 \pm 0,1$ s, $30 \pm 5\%$), tuo tarpu 1 mM Glu šį parametą prailgino nuo $2,1 \pm 0,1$ s (APW') iki $3,1 \pm 0,2$ s ($\Delta 1,1 \pm 0,2$ s, $56 \pm 10\%$) (**Pav. 3.8**) – reikšmingai daugiau nei $0,1$ mM Glu.

Apibendrinant galima teigti, kad *Nitellopsis* ląsteles veikiant Glu ir Asn tirpalais, stebimas tapatus poveikio pobūdis, kurio išreikštumas priklauso nuo AR koncentracijos.

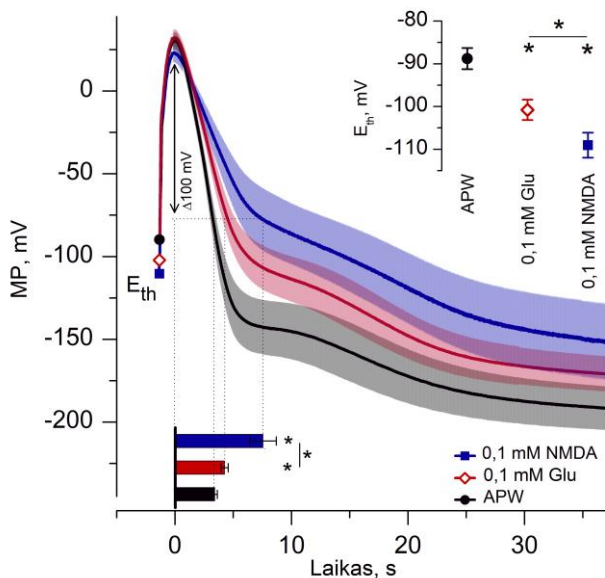
Sintetinio iGluRs agonisto NMDA poveikis VP parametrams

Įsitikinus, kad tiek $0,1$ mM Asn, tiek $0,1$ mM Glu reikšmingai veikia elektrinio sužadavimo parametrus, tokia pačia tyrimų eiga tirtas $0,1$ mM sintetinio iGluR agonisto NMDA poveikis ($n=8$). Gauti duomenys palyginti su nustatytais $0,1$ mM Glu sukeltais parametų pokyčiais. Taip pat ištirtas $0,01$ mM ($n=9$) ir 1 mM NMDA ($n=3$) poveikis.

$0,1$ mM NMDA neveikė VP smailės potencialo, hiperpolarizavo VP E_{th} nuo -89 ± 3 mV iki -109 ± 3 mV ($\Delta 20 \pm 3$ mV, $23 \pm 4\%$, $n=8$) (**Pav. 3.10** viršutinis grafikas). Šis pokytis reikšmingai didesnis nei sukeltas $0,1$ mM Glu ($\Delta 12 \pm 2$ mV, $13 \pm 2\%$). VP repoliarizacinė fazė veikiant $0,1$ mM NMDA pailgėjo nuo $4,2 \pm 0,4$ s iki $7,3 \pm 0,8$ s ($\Delta 3,0 \pm 1$ s, $72 \pm 13\%$, $n=8$) - taip pat reikšmingai daugiau nei repoliarizacijos trukmė veikiant $0,1$ mM Glu ($4,2 \pm 0,3$ s, $\Delta 0,8 \pm 0,2$ s, $25 \pm 6\%$, $n=9$) (**Pav. 3.10** apatinis grafikas). Gauti rezultatai indikuoja, kad $0,1$ mM NMDA sukelia reikšmingai didesnę poveikį VP sužadavimo slenksčiui ir repoliarizacijos trukmei nei tos pačios koncentracijos Glu.

Lyginant tirtų NMDA koncentracijų poveikius tarpusavyje, nustatyta, kad $0,01$ mM NMDA reikšmingai hiperpolarizavo VP E_{th} – nuo -94 ± 4 mV iki -105 ± 4 mV ($\Delta 10 \pm 2$ mV, $10 \pm 2\%$, $n=9$). Veikiant 1 mM NMDA E_{th} vertė pakito nuo -89 ± 1 mV iki -113 ± 6 mV ($\Delta 24 \pm 7$ mV, $27 \pm 7\%$, $n=3$). $0,01$ mM ir $0,1$ mM NMDA sukelti E_{th} pokyčiai

reikšmingai skyrėsi vienas nuo kito, tuo tarpu 1 mM sukelta E_{th} hiperpolarizacija nebuvo reikšmingai didesnė nei sukelta 0,1 mM NMDA ($\Delta 20 \pm 3$ mV). Kaip Glu ir Asn atveju, VP smailės vertė nepasikeitė veikiant visomis NMDA koncentracijomis, taigi VP amplitudės augimas buvo sąlygotas slenkstinio potencialo pokyčių.



Pav. 3.9 Vidutinės VP repoliarizacijos kontroliniame tirpale (APW) ir veikiant 0,1 mM Glu ir 0,1 mM NMDA tirpalais. Linijos atspindi vidutinės repoliarizacijos kreives, permatomi plotai – SE. Punktyrai žymi vertintas 100 mV repoliarizacijos trukmes vaizduojamas apatinėje histogramoje. Atitinkamos vidutinės E_{th} vertės vaizduojamos viršutiniame grafike. Žvaigždutės žymi statistškai reikšmingus skirtumus, $n=8-9$ kiekvienai medžiagai.

VP repoliarizacijos trukmė veikiant 0,01 mM NMDA pailgėjo $0,8 \pm 0,3$ s ($26 \pm 9\%$), veikiant 0,1 mM – $3,0 \pm 0,7$ s ($72 \pm 13\%$), o veikiant 1 mM NMDA – $3,2 \pm 0,7$ s ($83 \pm 20\%$). 1 mM NMDA sukeltas pokytis reikšmingai nesiskyrė nuo 0,1 mM NMDA sukulto pokyčio.

Fiksuotos įtampos metodu nustatyta, kad kaip ir VP sužadavimo slenkstis, I_{max} slenkstinis potencialas veikiant 0,1 mM NMDA pasislinko į neigiamą įtampų pusę, I_{max} kontroliniame tirpale stebėtas

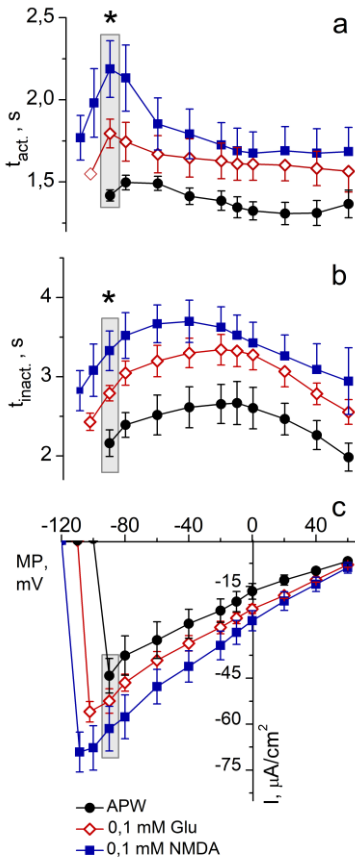


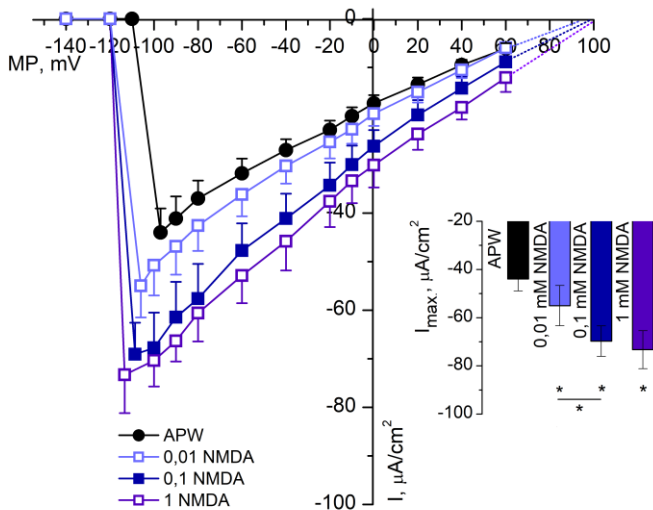
Fig 3.10 Ištakančio chloro jonų srauto amplitudžių (c) bei laikinių charakteristikų, t_{act} (a) ir t_{inact} (b) priklausomybės nuo membraninio potencialo (VC). Statistinei analizei naudotos laikinės charakteristikos (ties -90 mV) žymimos pilku fonu. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus tarp NMDA ir Glu sukeltų pokyčių, $n=8-9$ kiekvienai medžiagai.

didesnis nei $0,1$ mM NMDA (**Pav. 3.11**).

ties -90 mV, veikiant $0,1$ mM Glu ties -100 mV, o veikiant $0,1$ mM NMDA – ties -110 mV. I_{max} išaugimas veikiant $0,1$ mM NMDA (nuo $-45 \pm 3 \mu A/cm^2$ iki $-70 \pm 6 \mu A/cm^2$, $\Delta 25 \pm 5 \mu A/cm^2$, $64 \pm 17\%$, $n=8$) buvo reikšmingai didesnis nei veikiant $0,1$ mM Glu ($\Delta 11 \pm 2 \mu A/cm^2$, $25 \pm 5\%$) (**Pav. 3.10 c**). Taip pat, priešingai nei naudotos Glu koncentracijos, $0,1$ mM NMDA reikšmingai padidino I_{90} vertę: nuo $-44 \pm 6 \mu A/cm^2$ iki $-62 \pm 7 \mu A/cm^2$ ($\Delta 17 \pm 5 \mu A/cm^2$, $40 \pm 13\%$).

$0,01$ mM NMDA, kaip ir VP amplitudės atveju, reikšmingai padidino I_{max} vertę: nuo $-44 \pm 5 \mu A/cm^2$ iki $-55 \pm 8 \mu A/cm^2$ ($\Delta 11 \pm 5 \mu A/cm^2$, $22 \pm 13\%$, $n=9$), bet reikšmingai neveikė I_{90} : vidutinė registruota I_{90} vertė APW tirpale buvo $-41 \pm 5 \mu A/cm^2$, veikiant $0,01$ mM NMDA - $-47 \pm 6 \mu A/cm^2$ ($p=0,2$).

1 mM NMDA reikšmingai padidino I_{max} vertę nuo $-45 \pm 3 \mu A/cm^2$ iki $-73 \pm 8 \mu A/cm^2$ ($\Delta 28 \pm 5 \mu A/cm^2$, $64 \pm 11\%$, $n=3$), bei I_{90} : nuo $-44 \pm 3 \mu A/cm^2$ iki $-66 \pm 4 \mu A/cm^2$ ($\Delta 21 \pm 2 \mu A/cm^2$, $48 \pm 6\%$). 1 mM NMDA poveikis tiek I_{max} , tiek I_{90} nebuvo reikšmingai



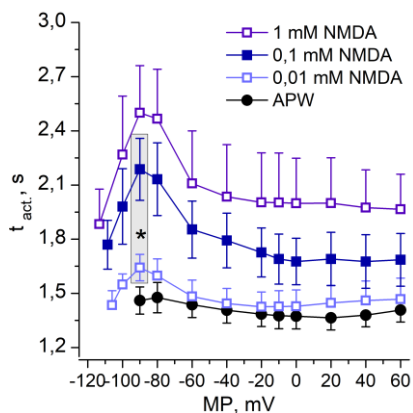
Pav 3.11 Chloro jonų srauto priklausomybė nuo fiksuoto membranos potencialo kontroliniame tirpale (APW) ir veikiant 0,01-1 mM NMDA. MP buvo fiksuotas ties -180 mV ir 10 s depoliarizuojamas 10 – 20 mV žingsniais. I_{max} vertės vaizduojamos histogramoje, žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus, $n=3-9$ kiekvienai koncentracijai.

Tokia pati tendencija stebėta ir analizuojant NMDA koncentracijų poveikį laikinėms ištekancio chloro jonų srauto charakteristikoms. 0,1 mM NMDA sukelti $t_{act.}$ ir $t_{inact.}$ trukmių (ties -90 mV) pokyčiai buvo reikšmingai didesni nei sukelti tos pačios koncentracijos Glu (**Pav. 3.10 a, b**).

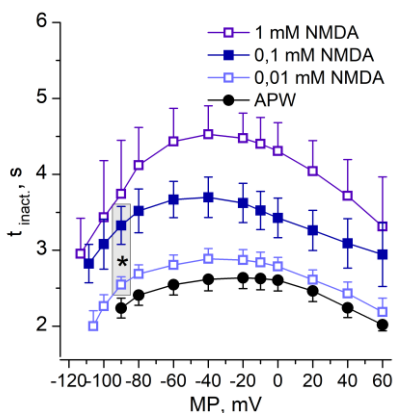
0,1 mM NMDA $t_{act.}$ vertę padidino nuo $1,4 \pm 0,1$ s iki $2,2 \pm 0,2$ s ($\Delta 0,8 \pm 0,1$ s, $53 \pm 9\%$) – reikšmingai daugiau nei 0,1 mM Glu ($\Delta 0,4 \pm 0,1$ s, $27 \pm 3\%$). Veikiant NMDA pastebima išryškėjusi AR poveikiui būdinga $t_{act.}$ priklausomybės nuo MP forma - ilgiausias $t_{act.}$ stebimas ties -90 mV, o $t_{inact.}$ priklausomybė nuo MP taip pat išlaiko charakteringą formą.

0,1 mM NMDA $t_{inact.}$ vertę pailgino nuo $2,1 \pm 0,2$ s iki $3,3 \pm 0,3$ s ($\Delta 1,2 \pm 0,2$ s, $58 \pm 12\%$) – reikšmingai daugiau nei ta pati Glu koncentracija ($\Delta 0,6 \pm 0,1$ s, $30 \pm 5\%$) (**Pav. 3.10 b**).

Kitų NMDA koncentracijų poveikio laikinems chloro jonų srauto charakteristikoms tendencija buvo tokia pati kaip ir VP parametrų ar I_{\max} : 0,01 ir 0,1 mM NMDA poveikis tarpusavyje skyrėsi reikšmingai, o 1 mM sukelti pokyčiai nebuvo reikšmingai didesni nei 0,1 mM (**Pav. 3.12** ir **Pav 3.13**). t_{act} vertė veikiant 0,01 mM NMDA pakito nuo $1,4 \pm 0,1$ s iki $1,6 \pm 0,1$ s ($\Delta 0,2 \pm 0,1$ s, $13 \pm 4\%$, $n=9$); 0,1 mM NMDA – iki $2,2 \pm 0,2$ s ($\Delta 0,8 \pm 0,1$ s, $53 \pm 9\%$, $n=7$) ir veikiant 1 mM – iki $2,5 \pm 0,3$ s ($\Delta 1 \pm 0,1$ s, 7411% , $n=3$). Inaktyvacijos trukmė t_{inact} veikiant 0,01 mM NMDA pailgėjo nuo $2,2 \pm 0,2$ s iki $2,5 \pm 0,1$ s ($\Delta 0,3 \pm 0,1$ s, $16 \pm 6\%$); 0,1 mM NMDA – iki $3,3 \pm 0,3$ s ($\Delta 1,2 \pm 0,2$ s, $58 \pm 12\%$), ir veikiant 1 mM NMDA – iki $4 \pm 0,4$ s ($\Delta 1,6 \pm 0,3$ s, $66 \pm 10\%$).



Pav. 3.12 Vidutinės Cl^- srauto aktyvacijos trukmės (t_{act}) ties fiksuotomis MP vertėmis kontroliniame tirpale (APW) ir veikiant 0,01-1 mM NMDA. t_{act} vertės ties -90 mV išskirtos pilku fonu, žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus. $n=3-9$ kiekvienai koncentracijai.



Pav. 3.13 Vidutinės Cl^- srauto inaktyvacijos trukmės (t_{inact}) ties fiksuotomis MP vertėmis kontroliniame tirpale (APW) ir veikiant 0,01-1 mM NMDA. t_{inact} vertės ties -90 mV išskirtos pilku fonu, žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus. $n=3-9$ kiekvienai koncentracijai.

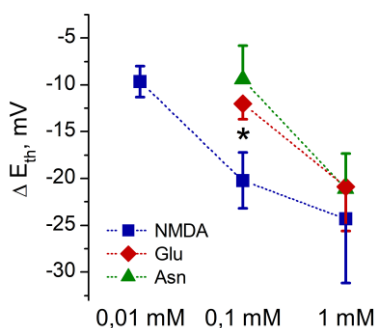
Apibendrinant, visos tirtos NMDA koncentracijos (0,01-1 mM) sukėlė reikšmingus Glu ir Asn poveikiui būdingus elektrofiziologinių parametrų pokyčius – pasižymėjo AR-ims būdingu poveikio pobūdžiu. Kaip ir natūralių AR atveju, nei viena iš naudotų NMDA

koncentracijų nesukėlė spontaninių VP, reikšmingos MP depolarizacijos ar membranos varžos pokyčių. 0,01 mM NMDA koncentracijos poveikis reikšmingai skyrėsi nuo 0,1 mM NMDA, tuo tarpu 1 mM NMDA poveikis reikšmingai nesiskyrė nuo 0,1 mM, todėl didesnės nei 0,1 mM NMDA koncentracijos laikomos įsotinančiomis. Tirtų elektrinių signalų moduliacijos, sukeltos visomis tirtomis medžiagomis ir koncentracijomis, palygintos tolimesniame skyrelyje.

Galimų GLR agonistų poveikio palyginimas

Vidutinių elektrinio sužadavimo parametrų pokyčių (Δ lyginant su vertėmis kontroliniame tirpale) priklausomybės nuo tirtos medžiagos koncentracijos buvo aproksimuotos Michaelis-Menten kinetika. Visi žemiau pristatyti atskiros medžiagos sukelti pokyčiai yra reikšmingi, žvaigždutėmis iliustracijose žymimi reikšmingi skirtumai tarp medžiagų.

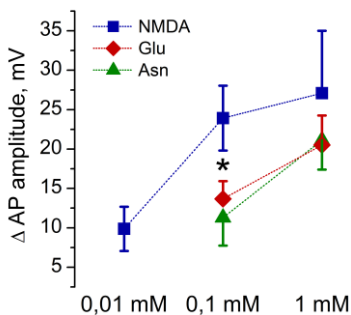
Kaip minėta, galimi GLR agonistai menturdumbliuose moduluoja



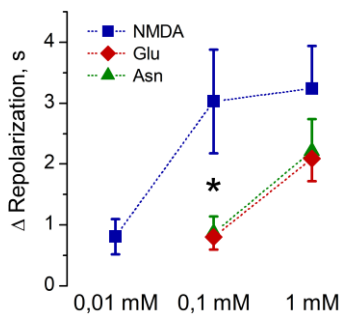
Pav. 3.14 Vidutinės VP E_{th} hiperpolarizacijos sukeltos veikiant 0,1-1 mM Glu, Asn ir 0,01-1 mM NMDA. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus tarp NMDA ir kiekvienos AA sukeltų pokyčių. $n=3-9$.

VP amplitudę, veikdami E_{th} . E_{th} pokyčiai, sukelti tirtų Asn, Glu ir NMDA koncentracijų, vaizduojami **Pav. 3.14**, o atitinkami VP amplitudžių pokyčiai – **Pav. 3.15**.

Apskaičiuotos VP amplitudžių pokyčių priklausomybės nuo koncentracijos K_M vertės veikiant Glu ir Asn buvo $\sim 0,1$ mM, o

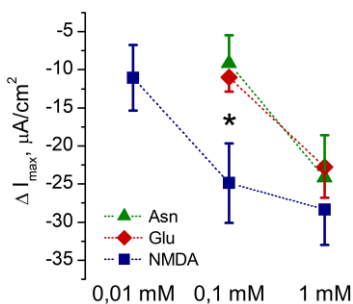


Pav. 3.15 Vidutinai VP amplitudės pokyčiai veikiant 0,1 - 1 mM Glu, Asn ir 0,01 - 1 mM NMDA. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus tarp NMDA ir kiekvienos AA sukeltų pokyčių. n=3-9.



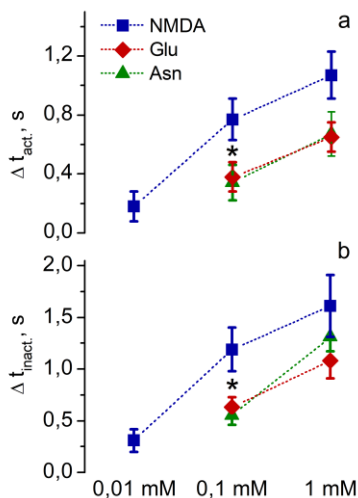
Pav. 3.16 Vidutinės VP repoliarizacinės fazės trukmės ($\Delta 100$ mV) pokyčiai veikiant 0,1-1 mM Glu, Asn ir 0,01-1 mM NMDA. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus tarp NMDA ir kiekvienos AA sukeltų pokvčių. n=3-9.

veikiant NMDA, eile mažesnės – $\sim 0,02$ mM. 0,1 mM NMDA sukeltas VP amplitudės pokytis buvo reikšmingai didesnis tiek už Asn, tiek už Glu sukeltą poveikį. Amplitudžių pasikeitimai tarp Asn ir Glu sulyginami, ir reikšmingai nesiskyrė tarpusavyje. 1 mM Glu, Asn ir



Pav 3.17 Vidutinai I_{max} pokyčiai veikiant 0,1-1 mM Glu, Asn ir 0,01-1 mM NMDA. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus tarp NMDA ir kiekvienos AA sukeltų pokyčių. n=3-9.

NMDA poveikiai taip pat reikšmingai neišsiskyrė, kaip minėta 1 mM NMDA nesukėlė reikšmingai didesnio pokyčio nei 0,1 mM NMDA. Tokie poveikio skirtumai tarp Glu, Asn ir NMDA nustatyti ir lyginant VP repoliarizacijos trukmes. Apskaičiuotas Glu ir Asn K_M šiam parametru – $\sim 0,2$ mM, tuo tarpu NMDA – $\sim 0,03$ mM. Taip pat stebėtas ir įsotinantis 1 mM NMDA poveikis (**Pav. 3. 16**).



Pav. 3.18 Ištekancio chloro jonų srauto laikinių charakteristikų ties -90 mV, t_{act} . (a) t_{inact} . (b) trukmių pokyčiai veikiant 0,1-1 mM Glu, Asn ir 0,01-1 mM NMDA. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus tarp NMDA ir kiekvienos AA sukeltų pokyčių. $n=3-9$.

Lentelė 3.2 Vertintų elektro-fiziologinių parametru priklausomybių nuo koncentracijos K_M vertės, taikant Michaelis-Menten kinetika.

Parametras	K_M , mM		
	Asn	Glu	NMDA
E_{th}	0,16	0,095	0,016
AP ampl.	0,107	0,07	0,018
Rep.	0,209	0,22	0,025
I_{max}	0,221	0,135	0,016
t_{act}	0,119	0,092	0,048
t_{inact}	0,182	0,086	0,042

Maksimalaus ištekancio chloro jonų srauto priklausomybės nuo tirtų medžiagų koncentracijos vaizduojamos **Pav. 3.17**. Veikiant Glu apskaičiuotas K_M I_{max} parametrai – $\sim 0,14$ mM, Asn – $\sim 0,2$ mM, o NMDA – $\sim 0,02$ mM.

t_{act} . ir t_{inact} trukmių ties -90 mV MP pokyčiai vaizduojami **Pav. 3.18**. Apskaičiuotas srauto aktyvacijos pokyčių K_M vertės veikiant Glu – $\sim 0,09$ mM, Asn – $\sim 0,11$ mM, ir veikiant NMDA – $\sim 0,05$ mM. Srauto inaktyvacijos pokyčių K_M vertės veikiant Glu – $\sim 0,09$ mM, Asn – $\sim 0,18$ mM, ir veikiant NMDA – $\sim 0,04$ mM.

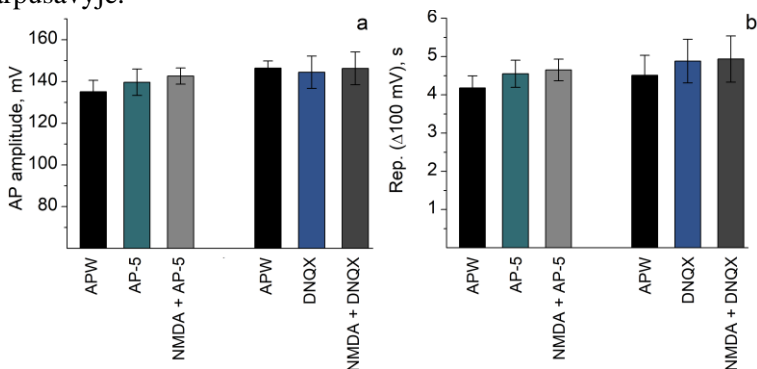
Elektrinio sužadavimo parametru moduliacijos, nustatytos fiksuotos įtampos metodu, pasižymi panašia priklausomybe nuo tirtų medžiagų koncentracijos kaip ir VP parametrai: 0,01 mM NMDA poveikis sulyginamas su eile didesnės Asn ir Glu koncentracijos poveikiu, o 0,1 mM NMDA poveikis visų tirtų chloro jonų srauto parametru pokyčiams reikšmingai didesnis nei Asn ir Glu. 1 mM NMDA, kaip ir VP parametru pokyčiuose, nesukelia reikšmingai didesnio poveikio chloro jonų srauto parametrams nei 0,1 mM NMDA.

Visų elektrofiziologinių parametų pokyčių priklausomybių nuo tirtų medžiagų koncentracijos K_M apibendrintos **Lentelėje 3.2**.

Apibendrinant pateiktus rezultatus nustatyta, kad visų tirtų galimų GLR agonistų poveikis pasižymi tapačiu poveikio pobūdžiu bei priklausomybe nuo koncentracijos. Asn ir Glu poveikio stipriai yra sulyginami, o NMDA sukelia reikšmingai didesnius elektrofiziologinių parametų pokyčius nei natūralios AR.

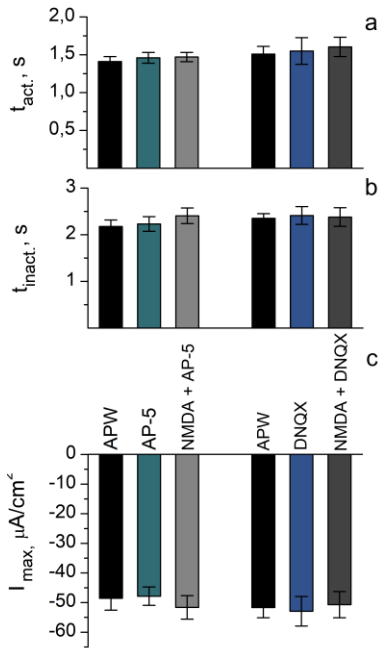
NMDA ir Glu poveikio inhibicija iGluR antagonistais

Nustačius, kad NMDA veikia menturdumblių elektrinių signalų parametrus, buvo tiriama, ar NMDA sukeltas poveikis yra inhibuojamas tiek NMDA, tiek ne NMDA tipo iGluR antagonistų – AP-5 ir DNQX. Elektrofiziologiniai parametrai ląstelėje vertinti kontroliniame tirpale, veikiant pasirinktu antagonistu (0,1 mM) tirpalu, ir paskui veikiant agonisto ir antagonistu mišiniu (po 0,1 mM). Vidutinės parametų vertės ląstelių imtyje (n=8) palygintos tarpusavyje.



Pav 3.19 Vidutinės VP amplitudės (a) ir VP repolarizacijos trukmės (b) kontroliniame tirpale (APW), veikiant 0,1 mM AP-5 arba 0,1 mM DNQX, tuomet ląsteles veikiant 0,1 mM NMDA kartu su antagonistu, AP-5 arba DNQX (n=8 abiemis antagonistams). Reikšmingų skirtumų tarp parametų nenustatyta.

Nustatyta, kad nei 0,1 mM AP-5, nei 0,1 mM DNQX patys neveikia vertintų parametų, bet inhibuoja NMDA poveikį.



Pav 3.20 Vidutinės maksimalaus ištekancio chloro jonų srauto I_{max} vertės (c), aktyvacijos t_{act} . (a) inaktivacijos t_{inact} . (b) trukmės ties -90 mV MP kontroliniame tirpale (APW), veikiant $0,1$ mM AP-5 arba DNQX, ir tuomet ląsteles veikiant $0,1$ mM NMDA kartu su antagonistu, AP-5 arba DNQX ($n=8$ kiekvienam antagonistui). Reikšmingų skirtumų tarp parametru nenurodyta.

taip pat nepakito VP E_{th} (-102 ± 3 mV, $p=0,6$ lyginant su E_{th} vertėmis veikiant DNQX), VP amplitudė (146 ± 8 mV, $p=0,6$) ir repoliarizacijos trukmė ($4,9 \pm 0,6$, $p=0,6$).

Parametrai, matuoti fiksuotos įtampos metodu, taip pat nekito šių eksperimentų eigoje (**Pav 3.20**). Vidutinė I_{max} vertė kontroliniame

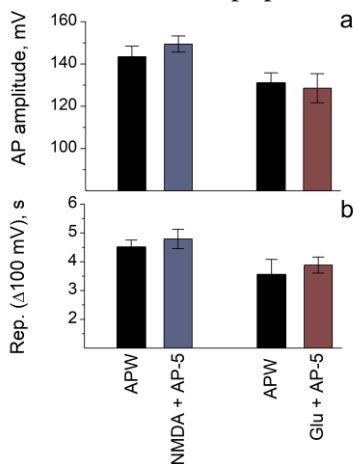
a Eksperimentų, naudojant tiek AP-5, tiek DNQX, eigoje reikšmingai nekito nei VP amplitudė, nei repoliarizacijos trukmė (**Pav. 3.19**). Tiriant AP-5 poveikį, vidutinis E_{th} kontroliniame tirpale buvo -107 ± 5 mV, VP amplitudė – 135 ± 5 mV, o repoliarizacija truko $4,2 \pm 0,2$ s. Veikiant AP-5 vidutinė E_{th} vertė buvo -111 ± 6 mV ($p=0,4$ lyginant su vertėmis APW), AP amplitudės – 139 ± 6 mV ($p=0,3$), o repoliarizacija truko $4,5 \pm 0,3$ s ($p=0,2$). Šias ląsteles veikiant NMDA kartu su AP-5, nepakito VP E_{th} (-111 ± 5 mV, $p=0,9$ lyginant su E_{th} vertėmis veikiant AP-5), amplitudė (142 ± 4 mV, $p=0,6$) ir repoliarizacijos trukmė ($4,7 \pm 0,3$, $p=0,6$).

Tiriant DNQX poveikį, vidutinis VP E_{th} kontroliniame tirpale buvo -109 ± 3 mV, AP amplitudė – 146 ± 3 mV, o repoliarizacija truko $4,5 \pm 0,5$ s. Veikiant DNQX vidutinė E_{th} vertė buvo -105 ± 4 ($p=0,3$ lyginant su vertėmis APW), VP amplitudė – 144 ± 8 mV ($p=0,5$), o repoliarizacija truko $4,8 \pm 0,6$ s ($p=0,4$). Šias ląsteles veikiant NMDA kartu su DNQX,

tirpale buvo $-48 \pm 4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, veikiant AP-5 – $-48 \pm 2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($p=0,8$), o veikiant NMDA kartu su AP-5 – $-52 \pm 4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($p=0,3$). MP ties, kuriuo buvo stebėtas I_{max} , šiuose tyrimuose taip pat nekito ($\sim -100 \text{ mV}$).

Tiriant DNQX inhibuojantį poveikį, vidutinė I_{max} vertė kontroliniame tirpale buvo $-52 \pm 3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, veikiant DNQX – $-55 \pm 7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($p=0,7$), o veikiant NMDA kartu su DNQX – $-51 \pm 4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($p=0,2$). MP, ties kuriuos buvo stebėtas I_{max} , taip pat nekito (-100 mV).

Šiuose eksperimentuose ištekancio chloro jonų srauto laikinės charakteristikos taip pat nekito. Chloro jonų srauto aktyvavimo

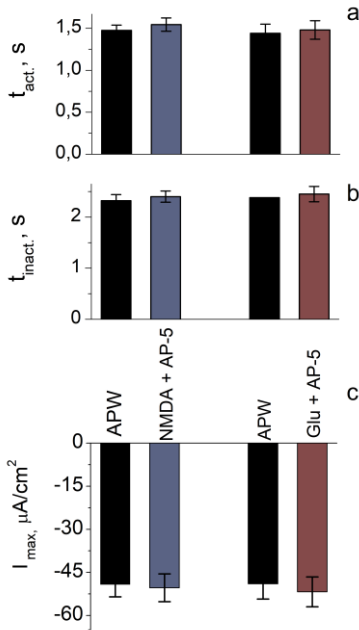


Pav. 3.21 Vidutinės VP amplitudžių (a) ir repolarizacijos (b) trukmių vertės kontroliniame tirpale (APW), ląsteles veikiant NMDA ir AP-5 mišiniu, bei Glu ir AP-5 mišiniu ($n=9$, $n=5$ atitinkamai). Reikšmingų skirtumų tarp parametru nenustatyta.

Apibendrinus rezultatus nustatyta, kad NMDA poveikis visiems tirtiems elektrofiziologiniams parametrams yra inhibuojamas tiek NMDA, tiek ne NMDA tipo iGluRs antagonistų.

Chloro jonų srauto aktyvavimo trukmė t_{act} ties -90 mV MP kontroliniame tirpale buvo $1,4 \pm 0,1 \text{ s}$, veikiant AP-5 – $1,5 \pm 0,1 \text{ s}$ ($p=0,8$), ir veikiant NMDA kartu su AP-5 – $1,5 \pm 0,1 \text{ s}$ ($p=0,9$) (**Pav. 3.20 a**). Tiriant DNQX poveikį, t_{act} kontroliniame tirpale buvo $1,5 \pm 0,1 \text{ s}$, veikiant DNQX – $1,5 \pm 0,1 \text{ s}$ ($p=0,8$), ir veikiant NMDA kartu su DNQX – $1,5 \pm 0,1 \text{ s}$ ($p=0,5$) (**Pav. 3.20 b**).

Papildomi eksperimentai buvo atlikti po kontrolinių matavimų ląsteles veikiant NMDA ir AP-5 (po $0,1 \text{ mM}$, $n=9$) mišiniu (*co-treatment*). Taip pat ląsteles veikiant Glu ir AP-5 mišiniu ($n=5$), buvo įvertinta AP-5 inhibicija Glu sukeltoms elektrofiziologinių parametru moduliacijoms.



Pav. 22 Vidutinės maksimalios chloro jonų srauto vertės (c), srauto actyvacijos t_{act} . (a) ir inaktyvacijos t_{inact} . (b) trukmės tiek -90 mV MP kontroliniame tirpale (APW), ląstelės veikiant NMDA ir AP-5 mišiniu, bei Glu ir AP-5 mišiniu ($n=9$, $n=5$ atitinkamai). Reikšmingų skirtumų tarp parametrų nenusatyta.

ląstelės veikiant agonistu ir antagonistu kartu (0,1 mM Glu ir 0,1 mM AP-5, $n=5$). Kontroliniame tirpale vidutinė VP amplitudė buvo 131 ± 5 mV, repoliarizacija truko $3,6 \pm 0,5$ s, veikiant Glu ir AP-5 AP amplitudė reikšmingai neišaugo (129 ± 7 mV, $p=0,6$), VP repoliarizacijos trukmė taip pat reikšmingai nepakito ($3,9 \pm 0,3$ s, $p=0,3$) (**Pav. 3.21**).

Tiriant AP-5 ir NMDA poveikį kartu, vidutinė VP amplitudė kontroliniame tirpale buvo 143 ± 5 mV, o repoliarizacija truko $4,5 \pm 0,3$ s, veikiant AP-5 ir NMDA mišiniu, AP amplitudė buvo 149 ± 4 mV ($p=0,3$ lyginant su verte APW), o repoliarizacijos trukmė – $4,8 \pm 0,3$ s. ($p=0,2$). Vidutinis I_{max} kontroliniame tirpale buvo -49 ± 4 $\mu A/cm^2$, veikiant AP-5 ir NMDA mišiniu – -50 ± 5 $\mu A/cm^2$ ($p=0,9$). Abiem atvejais I_{max} stebėtas ties ~ 100 mV. Chloro jonų srauto t_{act} kontroliniame tirpale ties -90 mV truko $1,5 \pm 0,1$ s, o t_{inact} – $2,3 \pm 0,1$ s. Veikiant AP-5 ir NMDA t_{act} trukmė buvo $1,5 \pm 0,1$ s ($p=0,4$), o t_{inact} – $2,4 \pm 0,1$ s ($p=0,4$). Reikšmingų skirtumų tarp parametrų nestebėta, taigi, *Nitellopsis obtusa* ląstelėse AP-5 inhibuoja NMDA poveikį net veikiant agonistu ir antagonistu kartu.

Galimas AP-5 inhibicinis poveikis Glu buvo įvertintas

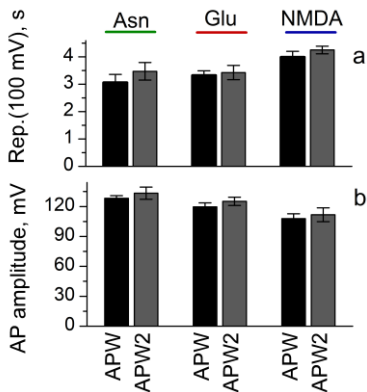
Šiuose eksperimentuose fiksuotos įtampos metodu registruoti parametrai iliustruojami **Pav. 3.22**. I_{\max} kontroliniame tirpale buvo $-49 \pm 5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (ties ~ -100 mV), veikiant Glu ir AP-5 – $-52 \pm 5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($p=0,4$), I_{\max} taip stebėtas ties ~ -100 mV. Chloro jonų srauto laikinės charakteristikos ties -90 mV taip pat nepakito: kontroliniame tirpale $t_{\text{act.}}$ truko $1,4 \pm 0,1$ s, o $t_{\text{inact.}}$ – $2,4 \pm 0,1$ s. Veikiant medžiagų mišiniu $t_{\text{act.}}$ vidutiniškai truko $1,5 \pm 0,1$ s, ($p=0,6$), o $t_{\text{inact.}}$ $2,5 \pm 0,2$ ($p=0,7$). Reikšmingų skirtumų nebūta nei tarp fiksuotos srovės, nei fiksuotos įtampos metodais registruotų elektrofiziologinių parametru – nustatyta, kad ląsteles veikiant Glu kartu su AP-5 yra inhibuojamas Glu poveikis elektrinių signalų parametrams.

Apibendrinant rezultatus daroma išvada, kad *Nitellopsis obtusa* ląstelę veikiant sintetiniu NMDA tipo iGluRs antagonistu AP-5 yra inhibuojamas tiek Glu, tiek NMDA būdingas poveikis elektrinių signalų parametrams.

Galimų GLR agonistų poveikio grįžtamumas

Norint įvertinti, ar galimų GLR agonistų Asn, Glu ir NMDA poveikis elektriniams signalams yra grįžtamas, elektrofiziologiniai parametrai registruoti ląsteles pakartotinai veikiant kontroliniu tirpalu (APW2) po veikimo agonistu. Pastebėta, kad parametrai pakartotinai veikiant kontroliniu tirpalu grįžta į vertes, registruotas pirmoje matavimų serijoje (APW). **Pav. 3.23** ir **Pav. 3.24** pristatomi parametrai užregistruoti po 1 val. pakartotinio veikimo kontroliniu tirpalu (APW2), kai ląstelės įprasta registravimo seka buvo veiktos $0,1$ mM Glu, Asn ir NMDA. Parametru vertės palygintos tarp APW ir APW2 ($n=5$ kiekvienam agonistui).

Vidutinė VP amplitudė ir repoliarizacijos trukmė prieš veikiant $0,1$ mM Asn buvo 128 ± 3 mV ir $3,1 \pm 0,2$ s, po pakartotinio veikimo kontroliniu tirpalu (APW2) – 133 ± 6 mV ($p=0,3$ lyginant su APW) ir $3,4 \pm 0,4$ s ($p=0,4$). Tiriant $0,1$ mM Glu poveikio grįžtamumą, VP amplitudė ir rep. trukmė kontroliniame tirpale buvo 120 ± 4 mV ir $3,3 \pm 0,2$ s, veikiant APW2 – 125 ± 4 mV ($p=0,2$) ir $3,4 \pm 0,3$ s ($p=0,8$).



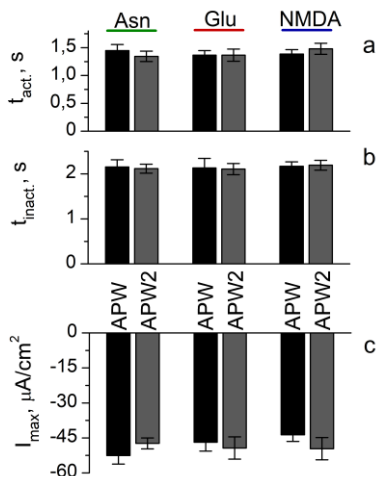
Pav. 3.23 Vidutinės VP amplitudės ir repoliarizacijos trukmės kontroliniame tirpale prieš (APW) ir po veikimo 0,1 mM galimais GLR agonistais (APW2). APW2 ląstelės veiktos valandą (kiekvienai medžiagai $n=5$). Reikšmingų skirtumų tarp parametrų nenustatyta.

Tiriant 0,1 mM NMDA grįžtamumą, VP amplitudė ir rep. trukmė buvo 108 ± 5 mV ir $4 \pm 0,2$ s, pakartotinai veikiant kontroliniu tirpalu – 112 ± 7 mV ($p=0,6$) ir $4,3 \pm 0,1$ ($p=0,4$) (**Pav. 3.23**), taigi VP parametrai grįžta į kontrolinėms sąlygoms būdingas vertes net po intensyvaus NMDA poveikio (veikiant 0,1 mM NMDA VP amplitudė padidėja iki 132 ± 5 mV, o rep. trukmė iki $7,3 \pm 0,8$ s).

Ištekančio chloro jonų srauto charakteristikos taip pat sugrįžta į kontrolinėms sąlygoms būdingas vertes. I_{max} prieš veikiant 0,1 mM Asn stebėtas ties ~ -100 mV MP, vidutinė vertė – $-53 \pm 4 \mu A/cm^2$. t_{act} ties -90 mV MP truko $1,5 \pm 0,1$ s, o t_{inact} – $2,2 \pm 0,2$. Po pakartotinio veikimo kontroliniu tirpalu nustatyta

I_{max} vertė – $-48 \pm 2 \mu A/cm^2$ (stebėta irgi ties ~ -100 mV MP) ($p=0,2$), t_{act} – $1,3 \pm 0,1$ s ($p=0,4$), t_{inact} – $2,2 \pm 0,1$ s ($p=0,9$).

Prieš veikiant 0,1 mM Glu I_{max} stebėtas ties ~ -90 mV MP, vidutiniškai $-47 \pm 4 \mu A/cm^2$ vertės, t_{act} truko $1,4 \pm 0,1$ s, t_{inact} – $2,1 \pm 0,2$ s. Po pakartotinio veikimo kontroliniu tirpalu I_{max} taip pat stebėtas ties -90 mV MP, vidutiniškai $-49 \pm 5 \mu A/cm^2$ vertės ($p=0,6$), ties -90 mV t_{act} truko $1,4 \pm 0,1$ s ($p=0,9$), t_{inact} – $2,2 \pm 0,1$ s ($p=0,7$).



Pav. 3.24 Vidutinės maksimalios ištekančio chloro jonų srauto vertės (c), ir laikinės charakteristikos ties -90 mV MP: aktyvavimo trukmė t_{act} . (a), inaktyvavimo trukmė t_{inact} . (b) kontroliniame tirpale prieš (APW) ir po veikimo 0,1 mM galimais GLR agonistais (APW2). APW2 ląstelės veiktos valandą (kiekvienai medžiagai n=5). Reikšmingų skirtumų tarp parametrų nenustatyta.

Tiriant 0,1 mM NMDA poveikio grįžtamumą, I_{max} vertė kontroliniame tirpale buvo $-44 \pm 3 \mu A/cm^2$ (ties ~ -90 mV MP), t_{act} truko $1,4 \pm 0,1$ s, t_{act} . – $2,2 \pm 0,1$ s. Po pakartotinio veikimo kontroliniu tirpalu I_{max} stebėtas taip pat ties ~ -90 mV MP, vidutiniškai $-50 \pm 5 \mu A/cm^2$ vertės ($p=0,2$), t_{act} . truko $1,5 \pm 0,1$ s ($p=0,8$), o t_{inact} . $-2,2 \pm 0,1$ s ($p=0,4$) (**Pav. 3.24**).

Apibendrinus rezultatus galima teigti, kad elektrofiziologinių parametrų pokyčiai, sukelti Asn, Glu ir NMDA, yra grįžtami. *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinių ląstelių elektrofiziologiniai parametrai po 2,5 val. veikimo GLR agonistais ir grąžinus ląsteles į kontrolinėms sąlygas valandos eigoje atsistato.

4. DISKUSIJA

Elektrinių signalų parametrai kontrolinėse sąlygose

Augalų ląstelių sužadavimo metu, ištekančio chloro jonų srauto laikinės charakteristikos ir jų priklausomybės nuo membranos potencialo ar srauto amplitudės nėra aprašytos literatūroje, todėl buvo nustatytos tiek jų, tiek kitų elektrofiziologinių parametru tarpusavio koreliacijos standartinėse sąlygose ($n=93$). Svarbiausi pastebėjimai yra šie: *Nitellopsis obtusa* tarpubamblių ląstelių VP amplitudė koreliuoja su maksimalia ištekančio chloro jonų srauto verte (I_{\max}), o laikiniai chloro jonų srauto parametrai – aktyvacijos trukmė ($t_{\text{act.}}$), bei inaktyvacijos trukmė ($t_{\text{inact.}}$) – nekoreliuoja su srauto amplitude (vertinta ties -90 mV) (**Pav. 3.1**), todėl tikėtini atskiri šių srauto parametru reguliavimo mechanizmai. Veikimo potencialų parametrai (amplitudė ir reploliarizacijos trukmė) nekoreliuoja tarpusavyje, taip pat nekoreliuoja su membranos RP verte ląstelėse, pasižyminčiose hiperpolarizuotu MP (lemiama aktyvios protonų pompos veiklos - *pump state*). Šie pastebėjimai sutampa su rezultatais gautais tiriant VP amplitudes ir chloro jonų srautus veikiant AR ir NMDA: šių medžiagų sukeltų VP amplitudės ir maksimalaus chloro jonų srauto pokyčių priklausomybės nuo medžiagos koncentracijos K_M vertės yra sulyginamos (**Lentelė 3.2**). Taip pat, ląsteles veikiant APW['] (1 mM didesnė išorinė chloro jonų koncentracija nei APW), išaugo tiek VP amplitudė, tiek I_{\max} vertė.

VP parametru priklausomybė nuo $[Cl^-]_o$

3.1 skyrelyje aprašyta, kaip padidėjusi išorinė chloro jonų koncentracija $[Cl^-]_o$ veikia VP parametrus. Nustatyta, kad tarp tirtų VP parametru reikšmingai padidėja tik VP amplitudė ir I_{\max} – bet ne laikinės chloro srauto charakteristikos.

ANKSTESNIUOSE TYRIMUOSE nustatyta, kad $[Cl^-]_o$ reikšmingai neveikia menturdumblių VP smailės (koncentraciją padidinus eile), bet gali

pailginti repoliarizacijos trukmę (Findlay 1970). Toks poveikis nebuvo stebėtas šiame tyrime, tačiau sąlyginai nedidelis (1 mM) $[Cl^-]_o$ pokytis reikšmingai padidino I_{max} vertę. Šis rezultatas kontraintuityvus, nes chloro jonų elektrocheminis gradientas nukreiptas į ląstelės išorę. Ankstesniuose augalų tyrimuose nustatyta, kad padidinus $[Cl^-]_o$, dėl H^+/Cl^- simporto į ląstelę gali išaugti citoplazminė chloro jonų koncentracija ($[Cl^-]_{cyt}$), kaip aprašyta baltosios garstyčios šakniaplaukiuose (Felle 1994). Menturdumbliuose $2H^+/Cl^-$ simporto veikla pastebima ląsteles laikant mažai chloro turinčioje aplinkoje (Beilby ir Walker 1981). Sūriame vandenyje augančio menturdumblio *Lamprothamnium* atsakų į druskingumą matematinio modeliavimu nustatyta, kad $[Cl^-]_{cyt}$ padidėjimas galėtų padidinti ištekantį chloro jonų srautą sužadavimo metu (Beilby ir Shepherd 2001), taip pat lemti būdingą padidėjusį *Lamprothamnium* jautrumą mechaniniams stimulams sūriose aplinkoje (Shepherd *et al.* 2008). Vis dėlto *Nitellopsis obtusa* tyrimai rodo, kad citoplazmos ir vakuolės $[Cl^-]$ nesikeičia veikiant NaCl (1 val. 100 mM) (Katsuhara ir Tazawa 1986). Šiame darbe pristatyti rezultatai taip pat neindikuoja pasikeitusios $[Cl^-]_{cyt}$, (remiantis chloro srauto reversiniu potencialu).

Nustatyta, kad augaluose į išorę rektifikuojančių anijonų kanalų aktyvumas gali būti inversiškai valdomas išorinės chloro koncentracijos – kaip parodyta *pach-clamp* metodu tiriant GCACl (įtampos valdomas anijonų kanalas) aktyvumą baltažiedžio vairinio žiotelių ląstelėse – didėjant $[Cl^-]_o$ (nuo 0 iki 300 mM), didėja ir anijonų srovė per kanalą (Hedrich 1994). Taigi, neatmestinas ir panašus VP metu aktyvių nuo kalcio priklausomų chloro jonų kanalų reguliavimas. Apibendrinant, maksimalios chloro jonų srauto vertės išaugimo esant didesnei chloro jonų koncentracijai aplinkoje mechanizmas nėra žinomas. Vandens telkiniuose chloro jonų koncentracija esti įvairi, *Nitellopsis* gali augti pusiau sūriuose vandenyse, kuriuose NaCl koncentracija neviršija 50 mM. Tuo tarpu chloro koncentracija net mažai druskinguose ežeruose gali siekti ~15 mM (Winter *et al.* 1999). Taigi, nuo chloro jonų koncentracijos

priklausomi prisitaikymo mechanizmai, tarp jų ir elektrinių signalų parametrų pokyčiai, yra neatmestini, o elektrofiziologiniuose AR poveikio tyrimuose būtina atsižvelgti ir į išorinės chloro jonų koncentracijos pasikeitimus dėl naudojamų amino rūgščių druskų.

VP parametrų pokyčiai veikiant AR ir NMDA

Glu, Asn ir NMDA reikšmingai nedepoliarizavo *Nitellopsis obtusa* membranos potencialo (išskyrus 1 mM Glu), reikšmingai nekeitė membranos varžos ramybės būsenoje ir nesukėlė spontaninių VP generavimo. AR sukelta MP depoliarizacija dėl GLR yra gausiai aprašyta baltažiedžiame vairyne (apžvelgta Weiland *et al.* 2016). MP depoliarizacija veikiant AR taip pat galėtų vykti dėl AR ir protonų importo (Ortiz-Lopez *et al.* 2000). Kita vertus, *Nitellopsis* tarpubamblinių ląstelių ramybės potencialas yra lemiamas ne tik pasyvios difuzijos, bet ir aktyvaus protonų transporto plazmalemoje: dėl aktyvios protonų pompos membranos RP menturdumbliuose gali siekti -255 mV (Tsutsui *et al.* 1987). Kadangi šiame darbe buvo tirtos ląstelės, kurių RP buvo neigiamesnis nei -175 mV (*pump-state*), depoliarizuojantis AR ir NMDA poveikis galėjo būti kompensuojamas protonų pompos veiklos. Reikšmingas depoliarizuojantis AR poveikis galimai išryškėtų ląstelėse, kurių membranoje dominuoja laidumas kaliui ir pasižyminčiose ne tokiu neigiamu RP (*potassium-state*) – artimesniu VP sužadavimo slenksčio potencialui E_{th} (Beilby, 2007). Neatmestina, kad AR poveikio pobūdis galėtų skirtis tarp ląstelių, esančių skirtingose būsenose. Šiame darbe aprašytuose tyrimuose spontaninis aktyvumas veikiant AR buvo stebėtas tik keliuose ląstelėse, todėl galima teigti, kad hiperpoliarizuotos būsenos *Nitellopsis* ląstelių atsakams į išorines AR, kai jų koncentracija neviršija 1 mM, nėra būdingas spontaninis VP generavimas. Ankstesniuose tyrimuose parodyta, kad *Nitellopsis* gali būti būdingas spontaninis aktyvumas veikiant signalinėmis molekulėmis, pvz., 5 mM acetilcholino sukelia MP depoliarizaciją ir spontaninius VP (Kisnieriene *et al.* 2012).

Glu sukeltas spontaninis VP generavimas aprašytas miežiuose: panardinus lapą į 1 mM Glu tirpalą, stebėti spontaniniai VP (Felle ir Zimmermann 2007). Kerpsamanėse, išoriškai veikiant 5 mM Glu arba Gly, taip pat buvo sukėti VP (Krol *et al.* 2007). Saulėgražoje tiesioginė 5 mM Glu injekcija į stiebą sukėlė VP, taip pat registruotas jų sklidimas stiebu į abi puses (Stolarz ir Dziubinska 2017). Menturdumbliuose spontaniniai VP nestebėti galimai dėl per mažo veikiamo paviršiaus ploto (5 mm ląstelės ilgio, <5% ląstelės paviršiaus ploto), nepakankamos koncentracijos, arba depoliarizuojančio AR ir NMDA sukulto laidumo (pvz. Ca^{2+} , per GLR) kompensacijos protonų pompos veikla. Kita vertus, AR ir NMDA poveikiui gali būti nebūdingas toks atsakas šiame taksone.

Glu, Asn ir NMDA poveikis *Nitellopsis* ląstelėms pasireiškė pakitusiais elektriniu stimulu sukeltų VP parametrais. Aprašytame darbe parodyta, kad 0,1-1 mM Glu, Asn bei 0,01-1 mM NMDA priklausomai nuo koncentracijos moduliuoja VP parametrus: hiperpolarizuoja VP E_{th} , padidina VP amplitudę, prailgina VP repoliarizacinės fazės trukmę, padidina maksimalią ištekiančio chloro jonų srauto vertę, bei prailgina chloro jonų srauto aktyvacijos ir inaktyvacijos trukmes ties -90 mV (registruota fiksuotos įtampos metodu). Panašus glutamaterginių junginių poveikio pobūdis (padidėjusi VP amplitudė ir repoliarizacijos trukmė) buvo aprašytas kerpsamanėse (Krol *et al.* 2007). Glu ir Gly sukėlė spontaninius VP, pasižyminčius didesne amplitude bei iki trijų kartų ilgesne repoliarizacinės fazės trukme, o kerpsamanes laikant Glu ar Gly tirpaluose padidėjo kitais stimulais sukeltų VP amplitudė (iki pusantrą karto). Aprašytame darbe *Nitellopsis* ląstelėse 1 mM Glu repoliarizacijos trukmę pailgino 2 s (44%), o 1 mM NMDA 3 s (66%). VP amplitudės veikiant 1 mM Glu padidėjo 16%, ir 26% veikiant 1 mM NMDA. Galimybė tiksliai įvertinti VP E_{th} leido priėti išvadą, kad šis amplitudės išaugimas yra lemiamas slenksčio hiperpolarizacijos.

VP sužadavimo slenksčio hiperpolarizacija veikiant AR ir NMDA

Veikimo potencialų sužadavimo slenkstis yra vienas pagrindinių parametru, lemiančių ląstelių elektrinį sužadimumą – VP generavimą veikiant įvairiais stimulais (Stolarz *et al.* 2010). VP yra generuojamas tik kai MP yra depoliarizuojamas iki E_{th} potencialo, tačiau šio parametro reguliavimo mechanizmai augaluose nėra aiškūs. Tarp atskirų ląstelių E_{th} vertė skiriasi, priklausomai nuo viduląstelinės kalcio koncentracijos $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ir kalciumi laidžių pernašos sistemų aktyvumo (Beilby, 2007) bei kalcio aktyvuojamų chloro kanalų priklausomybės nuo membranos potencialo (Thiel *et al.* 1997). $[Ca^{2+}]_{cyt}$ laikinai padidėja VP metu, šis pokytis yra griežtai reguliuojamas ir vyksta viskas-arba-nieko principu (Wacke *et al.* 2003). Kalcio homeostazės pokyčiai atsispindi VP generacijoje, kuri paremta ne tik anijonų kanalų, sukeliančių MP depoliarizaciją, priklausomybe nuo membranos potencialo, bet, kaip manoma, ir iki šiol neaiškiais signalų transdukcijos kaskadomis (Beilby ir Al Khazaaly 2016). Augaluose ištekancio chloro jonų srauto vertė sužadavimo metu yra tiesiogiai susijusi su $[Ca^{2+}]_{cyt}$: menturdumbliuose parodyta, kad depoliarizuojančio chloro jonų srauto amplitudė proporcinga $[Ca^{2+}]_{cyt}$ kvadratui (Berestovsky ir Kataev 2005). Taigi, šiame darbe stebėta E_{th} hiperpolarizacija (**Pav. 3.14**) ir VP amplitudės išaugimas (**Pav. 3.15**) veikiant Glu, Asn ir NMDA galėtų būti lemtas padidėjusio kalciumi laidžių membranos kanalų laidumo ir išaugusios $[Ca^{2+}]_{cyt}$, kaip siūlyta interpretuojant E_{th} ir VP amplitudės pokyčius kerpsamanėse ir jautriajame musėkaute (Krol *et al.* 2007, Krol *et al.* 2006).

Šio darbo metodika neleidžia tiesiogiai nustatyti E_{th} pokyčio priežasties, tačiau $[Ca^{2+}]_{cyt}$ padidėjimas sąlygotų didesnę ištekancio chloro jonų srautą ir to nulemtą didesnę VP amplitudę nepakintant smailės vertei (**Pav. 3.2**, **Pav. 3.6**). Pastebėtina, kad veikiant AR ir NDMA sužadavimo metu nesikeičia chloro jonų srauto reversinis potencialas.

Priešingai rezultatams, gautiems tiriant kerpsamanes (Krol *et al.* 2007), kur VP amplitudės priklausomybė nuo AR koncentracijos nebuvo nustatyta, *Nitellopsis* atsakai į AR ir NMDA priklauso nuo medžiagų koncentracijos (**Pav. 3.14 – 3.18**). Tai galėjo būti lemta mažesnės šiame darbe naudotos AR koncentracijos (0,1 mM veikiant menturdumblius ir 5-15 mM – kerpsamanes), ir skirtingų AP amplitudės vertinimo metodikų. Įprasta augalų VP amplitudę vertinti nuo RP iki smailės, toks vertinimo metodas į VP amplitudės parametą įtraukia itin variabilų membranos RP ir su elektriniu sužadinimu nesusijusias membranos transporto sistemas. VP amplitudę vertinant nuo E_{th} šis variabilumas atmetamas. Tikslus E_{th} vertinimas yra kritiškas, kai norima detalčiai vertinti VP parametrus bei augalinių ląstelių sužadinamumą.

Galima E_{th} pokyčio, veikiant AR ir NMDA, priežastis galėtų būti antrinės signalinės molekulės aktyvumo ar jos trasndukcijos kaskadų moduliavimas. Menturdumbliuose nustatyta, kad kalcis sužadinimo metu gali patekti į citoplazmą iš užląstelinės erdvės per TRP (*transient receptor potential*) tipo kanalus, bei iš viduląstelinų saugyklų (vakuolės ir endoplazminio tinklo) per antrinės signalinės molekulės (IP_3 – inozitolio 1,4,5-trisfosfatas ar kt.) aktyvuojamus kalcio kanalus. Aukštesnieji augalai neturi IP_3 receptorių, tačiau antrinės signalinės molekulės dalyvavimas sužadinant VP augaluose yra stipriai remiamas matematinio modeliavimo. Pasak esamų matematinių modelių, viskas-arba-nieko sužadinimo pobūdis augaluose yra realizuojamas antrinei signalinei molekulei griūtiškai aktyvuojant kalciumi laidžius kanalus (Wacke *et al.* 2003, Munnik ir Vermeer 2010, Beilby ir Al Khazaaly 2016, Kisnieriene *et al.* 2019). Jei veikiant AR padidėtų antrinės signalinės molekulės koncentracija sužadinimo metu, išaugtų ir kalcio srautas į citoplazmą iš viduląstelinų saugyklų, tokiu būdu, galėtų būti hiperpoliarizuojamas ir E_{th} potencialas bei išaugti VP amplitudė, tiesiogiai nedalyvaujant plazmalemos pernašos sistemoms.

VP repoliarizacinės fazės trukmė

Šiame darbe nustatyta, kad be E_{th} hiperpolarizacijos, Glu, Asn ir NMDA pailgina VP repoliarizacinės fazės trukmę (**Pav. 3.2, Pav. 3.6, Pav. 3.16**), minėtame kerpsamanių tyrime Glu ir Gly taip pat reikšmingai prailgino VP trukmę (Krol *et al.* 2007). Tokios signalinės molekulės kaip acetilcholinai taip pat reikšmingai prailgina VP repoliarizacinę fazę *Nitellopsis* ląstelėse (Kisnierienė *et al.* 2009). Nors šiame darbe aprašyta VP repoliarizacijos trukmė pailgėja ne daugiau 66%, šio parametro pokytis priklauso nuo AR ar NMDA koncentracijos. VP repoliarizacijos trukmės pailgėjimas gali būti aiškinamas keleto pernašos sistemų reguliavimu.

VP trukmė gali ilgėti sužadavimo metu sulėtėjus kalcio pašalinimui iš citoplazmos, kaip siūlyta Krol (*et al.* 2007). Toks mechanizmas paaiškintų tiek pailgėjusią VP, tiek šiame darbe fiksuotos įtampos metodu aprašytą, išaugusią chloro jonų srauto aktyvavimo trukmę. Literatūroje teigiama, kad nuo kalcio priklausomi ir įtampos valdomi chloro kanalai inaktyvuojasi mažėjant $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Berestovsky ir Kataev 2005). Chloro kanalų laidumo mažėjimas būtinas MP repoliarizacijai VP metu (Beilby 2007). Lėtesnis kalcio pašalinimas iš citoplazmos galėtų paaiškinti ilgesnes chloro jonų srauto trukmes, išaugusią maksimalią chloro jonų srauto amplitudę, bei pailgėjusią repoliarizaciją. Parodyta, kad menturdumblyje *Chara australis* druskingumo sukeltas VP trukmės išaugimas yra lemiamas ilgesnio kalcio aktyvuojamų chloro kanalų aktyvumo (Shepherd *et al.* 2008). *Nitellopsis obtusa* ir *Chara australis* VP formos esant padidėjusiam aplinkos druskingumui matematinis modeliavimas (Thiel-Beilby modelis) rodo, kad *Nitellopsis* rūšiai būdinga ilgesnė VP trukmė (lyginant su *Chara*) yra lemiamas mažesnio kalcio pompos, aktyviai pernešančios kalcį iš citoplazmos į endoplazminį tinklą VP metu, aktyvumo dėl stochiometrinių skirtumų (Kisnieriene *et al.* 2019).

Kadangi AR veikiamos molekulinės struktūros *Nitellopsis* nėra žinomos, aprašyti rezultatai gali būti aiškinami ir kalio K^+_{out} kanalų aktyvumo moduliavimu. Menturdumbliuose nustatyta, kad šie į išorę

rektifikuojantys kanalai sąlygoja MP repoliarizaciją VP metu (Thiel *et al.* 1997). Kaip ir kalcio aktyvuojamų chloro kanalų atveju, K_{out}^+ kanalų aktyvacija/inaktyvacija priklauso nuo $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Katsuhara ir Tazawa 1992, Homann ir Thiel 1994, Thiel *et al.* 1997).

Baltažiedžiame vairyneje parodyta, kad VP forma tiesiogiai priklauso nuo GORK kanalų aktyvumo (*Gated Outwardly-Rectifying K^+ channels* - į išorę rektifikuojantys kaliui selektyvūs jonų kanalai). GORK geno mutantai (*knock-out*) pasižymėjo didesnės amplitudės (dėl teigiamesnės smailės) ir ilgesniais VP (Cuin *et al.* 2018). Taigi, nuo kalcio nepriklausoma kalio kanalų reguliacija yra neatmestina.

Padidėjusi ištekancio chloro jonų srauto amplitudė ir trukmė

Kaip minėta, išaugusi chloro jonų srauto amplitudė sužadavimo metu ir pailgėjusi šio srauto aktyvacijos ir inaktyvacijos trukmė veikiant Glu, Asn ir NMDA, gali būti siejama su kalcio kiekiu citoplazmoje pasikeitimais: padidėjusia $[Ca^{2+}]_{cyt}$ arba sulėtėjusiu jo pašalinimu sužadavimo metu – ištekantis chloro jonų srautas tiesiogiai priklauso nuo citoplazminės kalcio koncentracijos (Berestovsky ir Kataev 2005). Vis dėlto, taip pat galimas chloro jonų srauto reguliavimas dalyvaujant antrinei signalinei molekulei. *Chara corallina* tyrimai parodė, kad inhibitorius neomicinas (*neomycin*, fosfolipazės C inhibitorius, užkertantis kelią IP_3 sintezei) sukėlė chlorų kanalų laidumo sumažėjimą ir laikinį aktyvumo sulėtėjimą stimuliuojant elektriškai (Biskup *et al.* 1999). Deja, IP_3 dalyvavimas augalų VP generacijoje yra diskutuotinas dėl vienas kitam prieštaraujančių rezultatų (Tazawa ir Kikuyama 2003). Nepaisant to, matematinis neomicino poveikio modeliavimas atskleidė, kad lėtesnis chloro jonų srauto aktyvavimas ir mažesnė maksimali srauto vertė yra lemiama mažesnės greičio konstantos, aprašančios nuo IP_3 priklausomą kalcio srauto aktyvavimą iš viduląstelių saugyklų. Toks mechanizmas galėtų paaiškinti šiame darbe aprašytą pailgėjusią t_{act} trukmę, ties E_{th} būdingu MP, bet ne lygiagrečiai išaugusią srauto amplitudę sužadavimo metu. Kadangi AR ir NMDA sukelia I_{max} išaugimą, galima būtų svarstyti apie padidėjusią chloro kanalų atsidadymo tikimybę arba

padidėjusį laidumą chloro jonams. $[Cl^-]_{\text{cyt}}$ pokyčiai mažai tikėtini, nes veikiant AR ir NMDA chloro srauto reversiniai potencialai nekinta. Remiantis Bishop (*et al.* 1999) įžvalgomis, galima diskutuoti, kad ilgesnė chloro jonų srauto trukmė yra lemiamą laiką atsiskyrusių didelių chloro kanalų populiacijų aktyvavimo, dėl kvantuotų ir šuoliškų kalcio srautų iš viduląstelių saugyklų. Apibendrinant, iki šiol nėra nei eksperimentinių duomenų, nei matematinio modelio, aiškinančio padidėjusią chloro jonų srauto amplitudę kartu su ilgesne srauto trukme.

Nitellopsis ląstelėse, Glu ir NMDA pasižymi tapačiu poveikio pobūdžiu, bet NMDA sukelti elektrofiziologinių parametrų pokyčiai yra reikšmingai didesni: veikiant Glu, visų tirtų parametrų pokyčių priklausomybės nuo koncentracijos K_M yra bent du kartus didesnis nei NMDA. *Nitellopsis* atsakų į Glu priklausomybė nuo koncentracijos yra sulyginama su baltažiedžio vairo šakniaplaukiuose aprašytų Glu sukeltų katijonų srautų priklausomybe nuo Glu koncentracijos, kur pusė maksimalaus poveikio buvo sukelta 0,2–0,5 mM Glu (Demidchik *et al.* 2004). Dėl tapataus poveikio pobūdžio galima manyti, kad Glu, Asn ir NMDA veikia tas pačias jonų pernašos sistemas – galimai GLR receptorius. Nepaisant aprašytų rezultatų ir tiesioginio evoliucinio ryšio tarp menturdumblių ir sausumos augalų (Lewis ir McCourt 2004), GLR homologai nebuvo rasti *Chara braunii* genome. *Chara braunii* yra vienintelis menturdumblių atstovas, kurio genomas yra nustatytas (Nishiyama *et al.* 2018). Šio tyrimo rezultatai netikėti, nes GLR homologai yra identifikuoti tiek rudadumbliuose, tiek žaliadumbliuose (De Bortoli *et al.* 2016), kerpasamėse ir samanose (Wudick *et al.* 2018). Remiantis sekoskaita, nustatyta, kad augalų GLR yra panašūs tiek į NMDA, tiek į ne NMDA tipo jonotropinius glutamato receptorius – manoma, kad GLR divergavo dar prieš išsiskiriant šių receptorių kladams (Weiland *et al.* 2016).

Keletą dešimtmečių (Dennison ir Spalding 2000) NMDA buvo laikomas neaktyviu augalų GLR agonistu. Baltažiedžiame vairyje NMDA nesukelia glutamato poveikiui būdingo $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ padidėjimo. Dėl šių rezultatų NMDA poveikis buvo retai tiriamas analizuojant

glutamaterginę sistemą augaluose – NMDA poveikis elektriniams signalams aprašytas tik kerpsamanėse (Krol *et al.* 2007). Šiame darbe nustatyta, kad evoliuciškai paprastesniame *Nitellopsis* NMDA taip pat moduliuoja elektrinius signalus. Apibendrinant, nors kol kas nėra nustatyta GLR homologų menturdumbliuose, *Nitellopsis* pasižymi jautrumu NMDA, pasireiškiančiu elektrinių signalų parametru moduliacija, priešingai nei tirtos aukštesniųjų augalų rūšys. Taigi, galimas ir specifinių receptorių egzistavimas šiuose dumbliuose, tiek ir neįprastas GLR tipas.

NMDA poveikio inhibicija iGluR antagonistais

Šiame darbe nustatyta, kad AP-5 ir DNQX neveikia tirtų menturdumblių ląstelių elektrofiziologinių parametru, todėl galima diskutuoti, kad šie antagonistai neveikia membranos pernašos sistemų, atsakingų už ramybės potencialo palaikymą ir VP generavimą. Tiriant baltažiedžio vairo šaknų augimą veikiant Glu bei šio poveikio inhibiciją nustatyta, kad AP-5 ir DNQX neveikia šaknų morfogenezės (Walch-Liu *et al.* 2006). *Medicago truncatula* (liucerna) embiogenezė taip pat neveikiama 1 mM AP-5 bei DNQX (Philippe *et al.* 2019).

Glutamato poveikio inhibicija AP-5 yra plačiai aprašyta baltažiedžiame vairyje (Sivaguru *et al.* 2003, Walch-Liu *et al.* 2006, Vatsa *et al.* 2011), bei pademonstruota kerpsamanėse, kur šiuo antagonistu buvo inhibuojamas ir NMDA poveikis (Krol *et al.* 2007). NMDA inhibicija aukštesniuose augaluose nėra žinoma, nes šis junginys yra neveiklus (apžvelgta Weiland *et al.* 2015) arba nenaudojamas tiriant GLR antagonistų poveikį. Šiame tyrime parodyta, kad menturdumbliuose, priešingai nei baltažiedžiame vairyje ir kerpsamanėse, NMDA poveikis yra inhibuojamas ir DNQX – ne NMDA tipo iGluR antagonistu. Glu inhibicija DNQX plačiai aprašyta aukštesniuose augaluose tiriant Glu poveikį tiek elektrofiziologiniams, tiek fiziologiniams atsakams, pvz.: DNQX inhibuoja Glu sukeltą VP generavimą kerpsamanėse (Krol *et al.*

2007), taip pat, Glu (ir Gly) sukeliama Ca^{2+} įtekėjimą baltažiedžio vairo audiniuose (Dubos *et al.* 2003).

Galima GLR agonistų sukeltų moduliacijų reikšmė

AR ir NMDA poveikio grįžtamumas remia idėją, kad šios medžiagos veikia receptorius. Kadangi galimų GLR agonistų efektas stebimas visą poveikio laiką, mažai tikėtina, kad galimi GLR receptoriai desensitizuojasi, kaip aprašyta tiriant kai kurių baltažiedžio vairo GLR veikimą: parodyta, kad vairo hipokotilio ląstelės veikiant Glu bent 2 min. yra desensitizuojamos pakartotiniam Glu veikimui (Stephens *et al.* 2008). Šiame darbe aprašytame tyrime poveikis buvo stebimas ląsteles nuolat veikiant galimais GLR agonistais, o poveikio grįžtamumas nurodo tiesioginį ryšį tarp medžiagos aplinkoje ir stebimų elektrinių signalų moduliacijų be ilgalaikio poveikio signalų parametrams.

NMDA yra sintetinė medžiaga, nesutinkama natūralioje aplinkoje, tačiau AR tiek dirvoje (Young ir Ajami 2000), tiek vandens telkiniuose (Yao *et al.* 2012, Feng *et al.* 2019) yra natūralus aplinkos junginys, sukeliantis fiziologines adaptacijas ir, kaip parodyta šiame darbe, elektrinių signalų moduliacijas. Elektrinių signalų parametrų pokyčiai reaguojant tiek į išorinius, tiek į vidinius veiksnius galėtų būti informacijos perdavimo būdas specifiškai nediferencijuotose augalų ląstelėse. Informacija veikimo potencialais galėtų būti koduojama jų charakteristikų pasikeitimais, nulemtais atskirų pernašos sistemų aktyvumo ar VP generavimo dažnio pokyčių (Fromm ir Lautner 2007). Padidėjusi citoplazminio kalcio koncentracija savaime yra signalas augaluose, o pasikeitusi šio signalo trukmė ar intensyvumas, lydimas elektrinio ląstelių sužadinimo galėtų lemti savitas fiziologines adaptacijas. Saulėgražose pademonstruota, kad spontaninių VP generavimo dažnis šio augalo stiebe priklauso nuo poveikio (druskingumo) intensyvumo ir yra tiesiogiai susijęs su nastinių judesių intensyvumu (Stolarz ir Dziubinska 2017). Kalcio osciliacijos augaluose yra itin variabilios tiek savo amplitude, tiek intensyvumu –

manoma, kad laikinės ir erdvinės šių osciliacijų charakteristikos lemia specifinio fiziologinio atsako pobūdį ir mastą augaluose (McAinsh ir Pittman 2009, Medvedev 2018), taip pat, VP pasižymintys savita trukme ir forma (priklausančia nuo poveikio intensyvumo), galėtų koduoti informaciją laikinėmis signalo charakteristikomis.

AR signalinė funkcija augaluose atsiskleidžia apžvelgus fiziologinius atsakus į AR įvairiuose augaluose ir jų audiniuose. AA reguliuoja šaknų augimą, žiotelių varstymąsi, veikia atsakus į šviesos pasikeitimus ir kt. (Sivaguru *et al.* 2003, Vincill *et al.* 2013, Forde ir Roberts 2014, Weiland *et al.* 2016, Yoshida *et al.* 2016). Kaip šie sisteminiai atsakai yra susiję su atskiros ląstelės sužadinamumu ir jos elektrinių signalų parametrais, nėra aišku, tačiau remiantis pristatytais duomenimis akivaizdu, kad atskiros ląstelės elektriniai signalai yra moduluojami AR (ir NMDA). Taigi šios transdukcijos grandys vis dar lieka neišaiškintos. Platesni, evoliuciškai artimų aukštesniesiems augalams, Menturdumblių elektrinių signalų moduliacijos tyrimai galėtų paaiškinti sudėtingus informacijos kodavimo mechanizmus augaluose.

Metodiniai tyrimo apribojimai ir ateities perspektyvos

Darbe aprašyti rezultatai atspindi tik ląstelių, esančių hiperpolarizuotoje būsenoje atsakus. Pilnam menturdumblių atsako į AR ir NMDA pobūdžiui aprašyti reikėtų apibūdinti ir atsakus, kitų elektrofiziologinių būsenų ląstelėse.

Naudota darbo metodika neleidžia tiesiogiai nustatyti VP parametrų pokyčių, pvz.: VP sužadinimo slenksčio hiperpolarizacijos ar chloro jonų srauto amplitudės išaugimo, priežasties. Viduląstelinio kalcio vaizdinimas menturdumblių ląstelėse sužadinimo metu leistų įvertinti kalcio vaidmenį aprašytose elektrinių signalų moduliacijoje.

Pristatytuose rezultatuose atsispindi tiek plazminės membranos, tiek tonoplasto elektrinis sužadinimas. Atskiras šių membranų sužadinimo tyrimas būtų tikslingas siekiant įvertinti galimą tonoplasto sužadinimo moduliaciją ir jo svarbą. Tokius tyrimus leistų realizuoti

vienalaikis elektrodų įvedimas tiek į citoplazmą, tiek į vakuolę. Menturdumbliuose panašūs metodai jau yra taikyti (Kikuyama 1986, Kisnieriene et al. 2019)

Aprašytame darbe buvo įvertintos tik trumpalaikio AR ir NMDA poveikio sukėtos elektrinių signalų moduliacijos. Atskira ir svarbi tema yra ilgalaikio poveikio įtaka ląstelių elektriniam sužadinumui bei galima šių moduliacijų adaptacija. Kita aktuali galima tyrimų kryptis – VP sklidimas tarp menturdumblių ląstelių bei šio sklidimo reguliacija išoriniais veiksniais, pvz., AR. VP sužadavimo slenksčio hiperpolarizacija galėtų didinti VP perdavimo tarp ląstelių efektyvumą. Pristatyti rezultatai pabrėžia multiparametrinės elektrinių signalų analizės svarbą nors struktūros, veikiamos AR ir NMDA menturdumbliuose kol kas nėra žinomos. Darbe nustatyta poveikio priklausomybė nuo medžiagos koncentracijos ir poveikio inhibavimas iGluR antagonistais remia GLR tipo kanalų funkcionavimą menturdumbliuose, bei patvirtina VP parametrų moduliacijas kaip atsaką į aplinkos sąlygas.

IŠVADOS

- 1) Glutamatas, asparaginas ir NMDA išoriškai veikiant menturdumblių *Nitellopsis obtusa* tarpubamblines ląsteles sukelia tapačius elektrinių signalų pokyčius: elektriškai sukelti veikimo potencialai pasižymi hiperpoliarizuotu sužadinimo slenksčiu, didesne amplitude, ilgesne repoliarizacine faze bei didesnės amplitudės maksimalu ištekančiu chloro jonų srautu sužadinimo metu. Chloro jonų srautas taip pat pasižymi ilgesnėmis aktyvavimo bei inaktyvavimo trukmėmis.
- 2) Glutamato, asparagino ir NMDA poveikis priklauso nuo medžiagos koncentracijos. NMDA veikia efektyviau nei tos pačios koncentracijos amino rūgštys. Tiek amino rūgščių, tiek NMDA sukelti pokyčiai yra grįžtami.
- 3) Jonotropinių glutamato receptorių antagonistai AP-5 ir DNQX neveikia *Nitellopsis obtusa* veikimo potencialų parametru, o NMDA būdingas efektas nestebimas ląsteles veikiant NMDA kartu su AP-5 arba DNQX.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Beilby MJ (2007) Action potential in charophytes. *Int Rev Cytol* 257, 43–82.
2. Beilby MJ, Al Khazaaly S (2016) Re-modeling *Chara* action potential: I. from Thiel model of Ca^{2+} transient to action potential form. *AIMS Biophys* 3, 431–449.
3. Beilby MJ, Casanova MT (2014) *The Physiology of Characean Cells*.
4. Beilby MJ, Shepherd VA (2001) Modeling the current–voltage characteristics of charophyte membranes: II. the effect of salinity on membranes of *Lamprothamnium papulosum*. *J Membr Biol* 181,77–89.
5. Beilby MJ, Walker NA (1981) Chloride transport in *Chara*. I Kinetics and current–voltage curves for a probable proton symport. *J Exp Bot* 32, 43–54.
6. Berestovsky GN, Kataev AA (2005) Voltage-gated calcium and Ca^{2+} -activated chloride channels and Ca^{2+} transients: voltage-clamp studies of perfused and intact cells of *Chara*. *Eur Biophys J* 34, 973–986.
7. Biskup B, Gradmann D, Thiel G (1999) Calcium release from InsP_3 -sensitive internal stores initiates action potential in *Chara*. *FEBS Letters* 453, 72–76.
8. Boot KJM, Libbenga KR, Hille SC, Offringa R, Van Duijn B (2012) Polar auxin transport: an early invention. *J Exp Bot* 63, 695–709.
9. Choi W, Miller G, Wallace I, Harper J, Mittler R, Gilroy S, Mina T, Gonda T, Diagnostic M, Hall B (2017) Orchestrating rapid long-distance signaling in plants with Ca^{2+} , ROS and electrical signals. *Plant J* 90, 698–707.
10. Cuin TA, Dreyer I, Michard E (2018) The role of potassium channels in *Arabidopsis thaliana* long distance electrical signalling: AKT2 modulates tissue excitability while GORK shapes action potentials. *Int J Mol Sci* 19, 1–17.

11. De Bortoli S, Teardo E, Szabò I, Morosinotto T, Alboresi A (2016) Evolutionary insight into the ionotropic glutamate receptor superfamily of photosynthetic organisms. *Bioph Chem* 218, 14–26.
12. Demidchik V, Essah PA, Tester M (2004) Glutamate activates cation currents in the plasma membrane of *Arabidopsis* root cells. *Planta* 219, 167–75.
13. Demidchik V, Shabala S, Isayenkov S, Cuin TA, Pottosin I (2018) Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions. *New Phytol* 220, 49–69.
14. Dennison KL, Spalding EP (2000) Glutamate-Gated Calcium Fluxes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 124, 1511–1514.
15. Dubos C, Huggins D, Grant GH, Knight MR, Campbell MM (2003) A role for glycine in the gating of plant NMDA-like receptors. *Plant J* 35, 800–810.
16. Felle HH (1994) The H⁺/Cl⁻ symporter in root-hair cells of *Sinapis alba*. An electrophysiological study using ion-selective microelectrodes. *Plant Physiol* 106, 1131–1136.
17. Felle HH, Zimmermann MR (2007) Systemic signalling in barley through action potentials. *Planta* 226, 203–14.
18. Feng W, Liu S, Li C, Li X, Song F, Wang B, Chen H, Wu F (2019) Algal uptake of hydrophilic and hydrophobic dissolved organic nitrogen in the eutrophic lakes. *Chemosphere* 214, 295–302.
19. Findlay GP (1970) Membrane electrical behaviour in *Nitellopsis obtusa*. *Aust J Biol Sci* 23, 1033–1046.
20. Forde BG, Roberts MR (2014) Glutamate receptor-like channels in plants: a role as amino acid sensors in plant defence? *F1000prime reports* 6, 37–43.
21. Fromm J, Lautner S (2007) Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant Cell Environ* 30, 249–57.

22. Hedrich R (1994) Voltage-Dependent Chloride Channels in Plant Cells: Identification, Characterization, and Regulation of a Guard Cell Anion Channel. *Curr Top Membr* 42, 1–33.
23. Homann U, Thiel G (1994) Cl^- and K^+ channel currents during the action potential in *Chara*. Simultaneous recording of membrane voltage and patch currents. *J Membr Biol* 309, 297–309.
24. Yao X, Zhu G, Cai L, Zhu M, Zhao L, Gao G, Qin B (2012) Geochemical Characteristics of Amino Acids in Sediments of Lake Taihu, A Large, Shallow, Eutrophic Freshwater Lake of China. *Aquat Geochem* 18, 263–280.
25. Yoshida R, Mori I, Kamizono N, Shichiri Y, Shimatani T, Miyata F, Honda K, Iwai S (2016) Glutamate functions in stomatal closure in *Arabidopsis* and fava bean. *J Plant Res* 129, 39–49.
26. Young VR, Ajami AM (2000) Glutamate: An Amino Acid of Particular Distinction. *J Nutr* 130, 892S–900S.
27. Kang J, Mehta S, Turano FJ (2004) The putative glutamate receptor 1.1 (*AtGLR1.1*) in *Arabidopsis thaliana* regulates abscisic acid biosynthesis and signaling to control development and water loss. *Plant Cell Physiol*, 45, 1380-1389.
28. Kang J, Turano FJ (2003) The putative glutamate receptor 1.1 (*AtGLR1.1*) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 10011, 6872-6877.
29. Katsuhara M, Tazawa M (1986) Salt tolerance in *Nitellopsis obtusa*. *Protoplasma* 135, 155–161.
30. Katsuhara M, Tazawa M (1992) Calcium-Regulated Channels and their Bearing on Physiological Activities in Characean Cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 338, 19–29.
31. Kikuyama M (1986) Tonoplast Action Potential of Characeae. *Plant Cell Physiol* 27, 1461–1468.

32. Kisnieriene V, Ditchenko TI, Kudryashov AP, Sakalauskas V, Yurin VM, Ruksenas O (2012) The effect of acetylcholine on Characeae K⁺ channels at rest and during action potential generation. *Cent Eur J Biol* 7, 1066–1075.
33. Kisnieriene V, Lapeikaite I, Pupkis V (2018) Electrical signalling in *Nitellopsis obtusa*: Potential biomarkers of biologically active compounds. *Funct Plant Biol* 45, 132–142.
34. Kisnieriene V, Lapeikaite I, Pupkis V, Beilby MJ (2019) Modeling the Action Potential in Characeae *Nitellopsis obtusa*: Effect of Saline Stress. *Front Plant Sci* 10, 1–15.
35. Kisnieriene V, Sakalauskas V, Pleskačiauskas A, Yurin V, Rukšenas O (2009) The combined effect of Cd²⁺ and ACh on action potentials of *Nitellopsis obtusa* cells. *Cent Eur J Biol* 4, 343–350.
36. Krol E, Dziubinska H, Stolarz M, Trebacz K (2006) Effects of ion channel inhibitors on cold- and electrically-induced action potentials in *Dionaea muscipula*. *Biol Plant* 50, 411–416.
37. Krol E, Dziubinska H, Trebacz K, Koselski M, Stolarz M (2007) The influence of glutamic and aminoacetic acids on the excitability of the liverwort *Conocephalum conicum*. *J Plant Physiol* 164, 773–84.
38. Kwaaitaal M, Huisman R, Maintz J, Reinstadler a, Panstruga R, Reinstädler A, Panstruga R (2011) Ionotropic glutamate receptor (iGluR)-like channels mediate MAMP-induced calcium influx in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* 440, 355–365.
39. Lapeikaite I, Dragunaite U, Pupkis V, Ruksenas O, Kisnieriene V (2019) Asparagine alters action potential parameters in single plant cell. *Protoplasma* 256, 511–519.
40. Lewis LA, McCourt RM (2004) Green algae and the origin of land plants. *Am J Bot* 91, 1535–56.
41. Lunevsky VZ, Zherelova OM, Vostrikov IY, Berestovsky GN (1983) Excitation of Characeae cell membranes as a result of

- activation of calcium and chloride channels. *J Membr Biol* 72, 43–58.
42. McAinsh MR, Pittman JK (2009) Shaping the calcium signature. *New Phytol* 1816 275-294.
 43. McCourt RM, Karol KG, Casanova MT, Feist M (1999) Monophyly of genera and species of Characeae based on rbcL sequences, with special reference to Australian and European *Lychnothamnus barbatus* (Characeae: Charophyceae). *Aust J Bot* 47, 1–10.
 44. Medvedev SS (2018) Principles of Calcium Signal Generation and Transduction in Plant Cells. *Russ J Plant Physiol* 65, 771–783.
 45. Miller AJ, Fan X, Shen Q, Smith SJ (2008) Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *J Exp Bot* 59, 111–119.
 46. Mousavi S a R, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE (2013) GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* 500, 422–6.
 47. Munnik T, Vermeer JEM (2010) Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. *Plant Cell Environ* 33, 655–669.
 48. Nishiyama T, Sakayama H, de Vries J, Buschmann H, Saint-Marcoux D, Ullrich KK, Haas FB, Vanderstraeten L, Becker D, Lang D, Vosolsobě S, Rombauts S, Wilhelmsson PKI, Janitza P, Kern R, Heyl A, Rümpler F, Villalobos LIAC, Clay JM, Skokan R, Toyoda A, Suzuki Y, Kagoshima H, Schijlen E, Tajeshwar N, Catarino B, Hetherington AJ, Saltykova A, Bonnot C, Breuninger H, Symeonidi A, Radhakrishnan G V., Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Chang C, Karol KG, Hedrich R, Ulvskov P, Glöckner G, Delwiche CF, Petrášek J, Van de Peer Y, Friml J, Beilby M, Dolan L, Kohara Y, Sugano S, Fujiyama A, Delaux PM, Quint M, Theißen G, Hagemann M, Harholt J, Dunand C, Zachgo S, Langdale J, Maumus F, Van Der Straeten D, Gould SB, Rensing SA (2018) The Chara

Genome: Secondary Complexity and Implications for Plant Terrestrialization. *Cell* 448–464.

49. Ortiz-Lopez A, Chang H, Bush DR (2000) Amino acid transporters in plants. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1465, 275–280.
50. Philippe F, Verdu I, Morère-Le Paven MC, Limami AM, Planchet E (2019) Involvement of *Medicago truncatula* glutamate receptor-like channels in nitric oxide production under short-term water deficit stress. *J Plant Physiol* 236, 1–6.
51. Pyatygin SS, Opritov VA, Vodeneev VA (2008) Signaling role of action potential in higher plants. *Russ J Plant Physiol* 55, 285–291.
52. Qi Z, Stephens NR, Spalding EP (2006) Calcium entry mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiol* 142, 963–71.
53. Rousseaux CG (2008) A Review of Glutamate Receptors I: Current Understanding of Their Biology. *J Toxicol Pathol* 21, 25–51. doi:10.1293/tox.21.25.
54. Sevriukova O, Kanapeckaite A, Kisnieriene V, Ladygiene R, Lapeikaite I, Sakalauskas V (2014) Modifying action of tritium on the charophytes bioelectrical response to anthropogenic pollution. *Trace Elem Electroly* 31, 60–66.
55. Shepherd VA, Beilby MJ, Al Khazaaly SAS, Shimmen T (2008) Mechano-perception in Chara cells: The influence of salinity and calcium on touch-activated receptor potentials, action potentials and ion transport. *Plant Cell Environ* 31, 1575–1591.
56. Sivaguru M, Pike S, Gassmann W, Baskin TI (2003) Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. *Plant Cell Physiol* 44, 667–675.
57. Stephens NR, Qi Z, Spalding EP (2008) Glutamate receptor subtypes evidenced by differences in desensitization and

- dependence on the GLR3.3 and GLR3.4 genes. *Plant Physiol* 146, 529–38.
58. Stolarz M, Dziubinska H (2017) Osmotic and salt stresses modulate spontaneous and glutamate-induced action potentials and distinguish between growth and circumnutation in *Helianthus annuus* seedlings. *Front Plant Sci* 8, 1–13.
 59. Stolarz M, Król E, Dziubinska H (2010) Glutamatergic elements in an excitability and circumnutation mechanism. *Plant Signal Behav* 5, 1108–11.
 60. Sukhov V, Sukhova E, Vodeneev V (2019) Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants. *Prog Biophys Mol Biol* 146, 63–84.
 61. Tazawa M, Kikuyama M (2003) Is Ca²⁺ release from internal stores involved in membrane excitation in characean cells? *Plant Cell Physiol* 44, 518–526.
 62. Thiel G, Homann U, Plieth C (1997) Ion channel activity during the action potential in *Chara*: new insights with new techniques. *J Exp Bot* 48, 609–622.
 63. Trebacz K, Dziubinska H, Krol E (2006) Electrical signals in long-distance communication in plants. *Communication in Plants: Neuronal Aspects of Plant Life* 277–290.
 64. Tsutsui I, Ohkawa T, Nagai R and KU (1987) Role of Calcium Ion in the Excitability and Electrogenic Pump Activity of the *Chara corallina* Membrane: I. Effects of La³⁺, Verapamil, EGTA, W-7, and TFP on the Action Potential. *J Membrane Biol* 108, 97–108.
 65. Umrath K (1930) Untersuchungen über Plasma und Plasmastromung an Characeen. IV. Potentialmessungen an *Nitella mucronata* mit besonderer Berücksichtigung der Erregungserscheinung. *Protoplasma* 9, 576-597.
 66. Vatsa P, Chiltz A, Bourque S, Wendehenne D, Garcia-Brugger A, Pugin A (2011) Involvement of putative glutamate receptors

- in plant defence signaling and NO production. *Biochimie* 93, 2095–2101.
67. Vincill ED, Clarin AE, Molenda JN, Spalding EP (2013) Interacting glutamate receptor-like proteins in Phloem regulate lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 1304–13.
 68. Wacke M, Thiel G, Hütt M-T (2003) Ca²⁺ dynamics during membrane excitation of green alga Chara: model simulations and experimental data. *J Membr Biol* 191, 179–92.
 69. Walch-Liu P, Liu LH, Remans T, Tester M, Forde BG (2006) Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 47, 1045–1057.
 70. Weiland M, Mancuso S, Baluska F (2016) Signalling via glutamate and GLRs in *Arabidopsis thaliana*. *Funct Plant Biol* 43, 1–25.
 71. Winter U, Kirst GO, Grabowski V, Heinemann U, Plettner I, Wiese S (1999) Salinity tolerance in *Nitellopsis obtusa*. *Aust J Bot* 47, 337–346.
 72. Wudick MM, Michard E, Oliveira Nunes C, Feijó JA (2018) Comparing plant and animal glutamate receptors: Common traits but different fates? *J. Exp. Bot.* 69, 4151–4163.
 73. Zhong, Sun L, Penny D (2015) The Origin of Land Plants: A Phylogenomic Perspective. *Evol Bioinform* 137, 137–141.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Publikacijos disertacijos tema

Kisnieriene V, Lapeikaite I, Pupkis V (2018) Electrical signalling in *Nitellopsis obtusa*: Potential biomarkers of biologically active compounds. *Funct Plant Biol.* 45(2), 132-142.

Lapeikaite I, Dragunaite U, Pupkis V, Ruksenas O, Kisnieriene V (2019) Asparagine alters action potential parameters in single plant cell. *Protoplasma* 256, 511–519.

Lapeikaite I, Pupkis V, Neniskis V, Ruksenas O, Kisnieriene V (2020) Glutamate and NMDA affect cell excitability and Action Potential dynamics of single cell of macrophyte *Nitellopsis obtusa*. *Funct. Plant Biol.* <https://doi.org/10.1071/FP20074>.

Pranešimai konferencijose

1. Lapeikaite I, Kisnieriene V, Sevriukova O. Glutamate and NMDA effect on single characean cell membrane transport systems activity. Plant transport 2014: Systems and synthetic biology. Glasgow, UK, 2014.
2. Kisnieriene V, Lapeikaite I, Sevriukova O, Daktariunas A, Ruksenas O. *Nitellopsis obtusa* as model system for environmental impact investigation: current and voltage clamp approaches. 3rd International Symposium on Plant Signaling and Behavior. Paris, 2015, p. 99.
3. Kisnieriene V, Lapeikaite I, Pupkis V. Neuroactive compounds and electrical signaling in “green axon” *Nitellopsis obtusa*. 4th International Symposium on Plant Signaling and Behavior. 2016, St. Petersburg, p. 57.

4. Lapeikaite I, Dragunaite U, Kisnieriene V. Asparagine effect on single Characean cell action potential parameters. 4th International Symposium on Plant signaling and Behavior, 2016, St. Petersburg, p. 59.
5. Kisnieriene V, Lapeikaite I. Mechanisms of aluminium toxicity: from plants to humans. 3rd international conference Evolutionary medicine: pre-existing mechanisms and patterns of current health issues, 2016, Vilnius, p. 61.
6. Pupkis V, Lapeikaite I, Kisnierienė V. Effect of blockers on ion channels in the tonoplast of *Nitellopsis obtusa* investigated using patch clamp technique. XVth International Conference of the Lithuanian Biochemical Society, 2018, Dubingiai, p. 41.
7. Lapeikaite I, Pupkis V, Kisnieriene V. Changes of *Nitellopsis obtusa* Action Potential properties in response to exogenous L-asparagine. 2nd International scientific conference “Plant cell biology and biotechnology”. Minsk, 2018, p 48.
8. Pupkis V, Lapeikaite I, Kisnieriene V. Investigation of plant electrical signaling: biophysical approaches. Baltic Biophysics Conference, 2018, Kaunas, p. 41.
9. Kisnieriene V, Pupkis V, Lapeikaite I. Exploring electrical signalling alterations of *Nitellopsis obtusa* cells in response to modulators of ion channels. Joint 12th EBSA congress and 10th ICBP – IUPAP congress, 2019, Madrid (Spain), *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 48(1 Supplement), p. S162.
10. Pupkis V, Lapeikaite I, Kisnieriene V. Electrophysiological Examination of the Effects of Classical Pharmacological Agent Verapamil in Plant-Based Model System. 64th Annual meeting of the Biophysical Society, 2020, San Diego (USA), *Biophysical Journal* 118 (3 Supplement 1), p. 591A.

Su doktorantūros tema nesusiję straipsniai:

1. Kisnieriene V, Lapeikaite I (2015) When chemistry meets biology: The case of aluminium - A review. *Chemija* 26.
2. Kisnieriene V, Lapeikaite I, Sevriukova O, Ruksenas O (2016) The effects of Ni²⁺ on electrical signaling of *Nitellopsis obtusa* cells. *J Plant Res* 129.
3. Bariseviciute R, Skipityte R, Pukiene R, Lapeikaite I, Kakaras I, Remeikis V (2017) Climatic sensitivity of δ¹³C in tree rings of *Quercus robur* L., *Populus tremula* L. and *Pinus sylvestris* L. in Vilnius region (eastern Lithuania). *Dendrobiology* 78.
4. Kisnieriene V, Lapeikaite I, Pupkis V, Beilby MJ (2019) Modeling the Action Potential in Characeae *Nitellopsis obtusa*: Effect of Saline Stress. *Front Plant Sci* 10, 1–15.

Knygos skyrius:

Kisnieriene V, Lapeikaite I, Pupkis V. (2018). Neurotransmitters in Characean Electrical Signaling in Ramakrishna A, Roshchina VV (eds.). *Neurotransmitters in Plants: Perspectives and Applications*, CRC Press; pp. 181-200.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7323-1721>

TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĄ

Darbo patirtis:

Disertantė nuo 2015 m. dirba jaunesniaja mokslo darbuotoja Neurobiologijos ir biofizikos katedroje, Biomokslų institute, Vilniaus universitete. Nuo 2018 m. dirba jungtiniame Lietuvos-Lenkijos projekte „Elektrinių signalų perdavimo ilgais atstumais sistemos adaptacija augalams persikeliant iš vandens į sausumą“ (projekto kodas: S-LL-18-1) (DAINA). Autorė Vilniaus universitete veda laboratorinius darbus. Kosultuoti baigiamieji magistro darbai:

Dragunaitė U (2016). Asparagino poveikio menturdumblių elektrinėms savybėms tyrimas. Biofizikos magistro baigiamasis darbas, Vilnius, Vilniaus universitetas.

Neniskis V (2017). NMDA receptorių ligandų poveikio augalinės ląstelės elektrofiziologinėms savybėms tyrimas. Neurobiologijos magistro baigiamasis darbas, Vilnius, Vilniaus universitetas.

Išsilavinimas:

Biofizikos mokslų daktaro 2014 – 2019

Biofizikos magistro 2012 – 2014 (*magna cum laude*)

Biofizikos bakalauro 2008 – 2012

Vilniaus universitetas, Lietuva.

Narystės:

Federation of European Neuroscience Societies (FENS) nuo 2013 m.

Lithuanian Neuroscience Association (LNA) nuo 2013 m.

The Botanical Society of Japan nuo 2015 m.

European Biophysical Societies' Association (EBSA) nuo 2019 m.

Autorė veda mokslo populiarinimo užsiėmimus ir paskaitas Vilniaus universitete bei kitose Lietuvos švietimo įstaigose nuo 2015 m.

Stažotės: School for young scientists “Plant cell biology: from theory to practice”, Minsk, 2018 m.

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p.: info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
Tiražas 20 egz.