

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GAMTOS TYRIMŲ CENTRO BOTANIKOS INSTITUTAS

Reda Grigutytė

*NITELLOPSIS OBTUSA* (DESV.) J. GROVES LAŠTELIŲ ATSAKAS Į  
ALOCHTONINIUS STRESORIUS – *FAGUS SYLVATICA* L. IR *QUERCUS ROBUR* L.  
LAPŲ PAKLOTĖS EKSTRAKTUS

Daktaro disertacijos santrauka  
Biomedicinos mokslai, botanika (04 B)

Vilnius, 2010

Disertacija buvo rengiama 2005–2009 metais Gamtos tyrimų centro Botanikos institute ir Leibnico gėlių vandenių ir gėlavandenių žuvų ekologijos institute.

Mokslinis vadovas – Dr. Levonas Manusadžianas (Gamtos tyrimų centro Botanikos institutas, biomedicinos mokslai, biofizika – 02 B).

Mokslinis konsultantas – PD. Dr. Stephan Pflugmacher (Leibnico gėlių vandenių ir gėlavandenių žuvų ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B).

**Disertacija ginama jungtinėje Vilniaus universiteto ir Gamtos tyrimų centro Botanikos instituto Botanikos mokslo krypties taryboje:**

Pirmininkas – habil. dr. Jūratė Darginavičienė (Gamtos tyrimų centro Botanikos institutas, biomedicinos mokslai, botanika – 04 B)

Nariai:

prof. habil. dr. Jonas Remigijus Naujalis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, botanika – 04 B)

dr. Zofija Sinkevičienė (Gamtos tyrimų centro Botanikos institutas, biomedicinos mokslai, botanika – 04 B)

prof. habil. dr. Vida Mildažienė (Vytauto Didžiojo universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

prof. habil. dr. Romualdas Juknys (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)

Oponentai:

dr. Vida Rančelienė (Gamtos tyrimų centro Botanikos institutas, biomedicinos mokslai, botanika – 04 B)

doc. dr. Kazys Sadauskas (Vilniaus pedagoginis universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)

Disertacija bus ginama viešame Botanikos mokslo krypties tarybos posėdyje 2010 m. gegužės 26 d. 14 val. Gamtos tyrimų centro Botanikos instituto Baltojoje salėje.

Atsiliepiamus prašome siųsti adresu: Žaliųjų ežerų g. 49, LT-08406 Vilnius, Lietuva, faksas (+370-5) 2729950.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2010 m. balandžio 26 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto ir Botanikos instituto bibliotekose.

VILNIUS UNIVERSITY  
INSTITUTE OF BOTANY OF NATURE RESEARCH CENTRE

Reda Grigutyte

*NITELLOPSIS OBTUSA* (DESV.) J. GROVES CELL RESPONSE  
TO ALLOCHTHONOUS STRESSORS OF *FAGUS SYLVATICA* L. AND  
*QUERCUS ROBUR* L. LEAF LITTER EXTRACTS

Doctoral Dissertation  
Biomedical sciences, botany (04 B)

Vilnius, 2010

Dissertation was performed in 2005–2009 at the Institute of Botany of Nature Research Centre (Lithuania) and Leibniz–Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries (Germany).

Scientific supervisor – Dr. Levonas Manusadžianas (Institute of Botany of Nature Research Centre, biomedical sciences, biophysics – 02 B).

Scientific advisor – PD. Dr. Stephan Pflugmacher (Leibniz–Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, biomedical sciences, biology – 01 B).

**The defence of the doctoral dissertation is held at Vilnius University and Institute of Botany of Nature Research Centre, Botany Science Council:**

Chairperson – Habil. Dr. Jūratė Darginavičienė (Institute of Botany of Nature Research Centre, biomedical sciences, botany – 04 B)

Members:

Prof. Habil. Dr. Jonas Remigijus Naujalis (Vilnius University, biomedical sciences, botany – 04 B)

Dr. Zofija Sinkevičienė (Institute of Botany of Nature Research Centre, biomedical sciences, botany – 04 B)

Prof. Habil. Dr. Vida Mildažienė (Vytautas Magnus University, physical sciences, biochemistry – 04 P)

Prof. Habil. Dr. Romualdas Juknys (Vytautas Magnus University, biomedical sciences, ecology and environmental sciences – 03 B)

Opponents:

Dr. Vida Rančelienė (Institute of Botany of Nature Research Centre, biomedical sciences, botany – 04 B)

Assoc. Prof. Dr. Kazys Sadauskas (Vilnius Pedagogical University, biomedical sciences, ecology and environmental sciences – 03 B)

Dissertation will be defended at public session held by the Council of Botany at 14 a.m. on May 26, 2010, in the White Hall at the Institute of Botany.

Please send your comments to the Secretary of Studies, Institute of Botany, Žaliųjų ežerų str. 49, LT–08406 Vilnius, Lithuania, fax (+370–5)2729950.

The summary of dissertation has been sent on April 26, 2010.

Dissertation is available at the libraries of the Institute of Botany and Vilnius University.

## ĮVADAS

Pagrindinis visų ekosistemų bruožas – jų atvirumas. Ežerų ekosistemos taip pat patiria įvairią įtaką iš aplinkinių ekosistemų. Vandens chemizmas iš dalies priklauso nuo paklotės lapų irimo ir medžių nuolaužų, sudarančių papildomą ištirpusios organinės anglies (IOA) šaltinį (SCHLESINGER, 1997; GRIMM et al., 2003). Įkrite į vandenį lapai, veikiami tiek makroorganizmų, tiek mikroorganizmų, suyra per kelis etapus (BESS, 2005). Jiems yrant susidaro cheminės medžiagos, kurios sąveikauja su biotiniais ekosistemos veiksniais – bakterijomis, grybais, bestuburiais (CUMMINS et al., 1989), taip pat jas veikia ir abiotiniai veiksniai – temperatūra, vandens srautai, dugno nuosėdos bei vandenyje esančios cheminės medžiagos (ALLARD, MOREAU, 1986; WEBSTER, BENFIELD, 1986). Medžių lapai, kuriems būdingas mažesnis C:N santykis, linę spartinti paklotės irimą, tuo tarpu mišrių medžių paklotės lapai, turintys fenolių ir taninų, linę lėtinti jų irimą (SWAN, PALMER, 2004). Lapų paklotės irimas ypač veikia biocheminių maisto medžiagų ciklą, o irimo produktams sąveikaujant su makrofitais, pastaruosiuose gali atsirasti įvairių reaktyviojo deguonies dalelių (ROS) (PFLUGMACHER et al., 1999; STEINBERG et al., 2003). Dalis paklotės lapų irimo junginių yra chinoidinės struktūros, kurios skatindamos ROS susidarymą gali turėti įtakos, pavyzdžiui, vandens augalų fotosintzei (BULYCHEV, 2001). Dėl oksidacinio streso padidėjus ROS gamybai ( $O_2^{\cdot -}$ ,  $O_2^{\cdot +}$ ,  $H_2O_2$  ir  $HO^{\cdot}$ ) ląstelėje suardomas trapus reaktyviojo deguonies formų balansas. ROS pažeidimų tikimybę mažina ląstelėse veikianči apsaugos sistema. Ją sudaro procesai, kuriuose dalyvauja antioksidaciniai fermentai, kaip antai, superoksido dismutazė (SOD), katalazė (KAT), glutationo S-transferazė (GST), glutationo peroksidazė (GPx), glutationo reduktazė (GR) ir kt. SOD padeda dviems superoksido anijono radikalams skilti į deguonį ir vandenilio peroksidą, o KAT – vandenilio peroksidui iki vandens. GR, glutationas ir askorbatas yra oksido redukcijos ciklo dalis (APEL, HIRT, 2004; NOCTOR et al., 2002). NADPH priklausomoje reakcijoje GR katalizuoja glutationo disulfido (GSSG) redukciją į glutationą (GSH) ir atlieka lemiamą vaidmenį apsisaugant nuo oksidacinio poveikio bei reguliuojant medžiagų apykaitos procesus (FOYER, NOCTOR, 2005). Be egzogeninių ksenobiotikų biotransformacijos, glutationo S-transferazė dalyvauja detoksikuojant endogeninius toksinus bei lipidų peroksidacijos produktus (AWASTHI et al., 2004).

Lapų paklotės irimo medžiagų sukkelto oksidacinio streso vandens augalams tyrimai pradėti dar visai neseniai. KAMARA ir PFLUGMACHER (2006) nustatė, kad paprastojo ažuolo (*Quercus robur* L.) lapų ekstraktas turėjo įtakos paprastosios nerties (*Ceratophyllum demersum* L.) antioksidacinei sistemai bei fotosintezei. Vėliau, tiriant Javos samanas (*Vesicularia dubyana* (C. Muell.) C. Muell.), aptiktas *Q. robur* ir paprastojo buko (*Fagus sylvatica* L.) lapų paklotės savaiminio irimo ekstraktų (LPIE), o taip pat jų lapų mišinio slopinamasis poveikis fotosintetiniam aktyvumui ir oksidacinio streso fermentų atsako skatinimas (NIMPTSCH, PFLUGMACHER, 2008). Šie duomenys rodo, kad lapų paklotė yra svarbus aplinkos veiksnys, lemiantis vandens augalų fiziologiją.

Aiškinantis paklotės lapų įtakos mechanizmus hidrobiontams, pageidautina iširti reakcijas įvairiuose biologinio organizuotumo lygmenyse (organizmo, ląstelės, jos membranos, fermentų ir kt.), nes platesnė ir išsamesnė informacija gali padėti suprasti vykstančius efektus, kompleksiskai interpretuoti rezultatus. Dar geriau, jei įmanoma stebėti kelias reakcijas tame pačiame organizme ar ląstelėje. Šiuo požiūriu patrauklus tyrinėjimo objektas yra žvaigždėtasis maurašakis (*Nitellopsis obtusa* (Desv.) J. Groves). *N. obtusa* yra daugialąstis makroskopinis žaliadumblis, priklausantis *Charophyceae* klasei, *Nitellopsidaceae* šeimai. Tai klasikinis augalų fiziologų, ypač elektrofiziologų (žr. MIMURA, 1995), tyrimo objektas, nes turi eksperimentatoriui parankias gigantiškas ląsteles. Be to, paplitimas natūraliuose oligo- ar mezotrofiniuose vandens telkiniuose leidžia manyti, kad jo pakantumas natūralioms organinėms medžiagoms vandenyje nėra didelis, todėl galime tikėtis jautresnės šio objekto reakcijos į tiriamą poveikį. Ekotoksikologiniais tyrimais parodyta, kad šių dumblių ląstelių greita ramybės potencialo (RP) depoliarizacija yra tinkamas rodiklis vertinti cheminių medžiagų ir nuotekų, kuriose santykinai didelė biogenų koncentracija, toksiškumą; taip pat nustatytas tamprus ryšis tarp elektrofiziologinės reakcijos (90 min. 50% RP depoliarizacijos) ir ląstelių mirtingumo (96 val. LC50), veikiant cheminiams stresoriams (MANUSADŽIANAS ET AL., 1995; 2007).

Tiriant (cheminio) stresoriaus veikimą, svarbu identifikuoti pokyčius, susijusius su esmingais ląstelės homeostazę palaikančiais elementais: ląstelės membranos potencialais, citoplazmos pH, atskirų fermentinių kompleksų aktyvumu, genetiniai efektai ir kt. Biocheminiame ar fiziologiniame lygmenyse stebimos cheminių medžiagų sukeltos reakcijos nebūtinai pasireiškia visos ląstelės, organizmo reakcijomis, todėl

norint patvirtinti tam tikros medžiagos veiklumą pageidautina aptikti sąsajas tarp atskirų jos įtakų įvairiuose biologinio organizuotumo lygiuose.

Paklotės lapų irimas, veikiant įvairiems ekologiniams faktoriams, sausumos ekosistemose buvo tirtas (GESSNER, 2000; TIEGS et al., 2008), tačiau galima lapų paklotės irimo produktų įtaka hidrobiontams dar tik pradėta tyrinėti.

**Pagrindinis tyrimo tikslas.** Grindžiant sąsajas tarp ežero ir paežerės ekosistemų ir remiantis tuo, kad medžių lapų paklotės irimo produktai yra alochtoninės ištirpusios organinės anglies papildomas šaltinis, įvertinti *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktų poveikį *N. obtusa* ląstelėms.

#### **Tyrimo uždaviniai:**

1. Atskleisti *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktais paveiktų *N. obtusa* ląstelių oksidacinio streso faktą, vertinant fermentų GST, KAT, GR, GPx ir SOD aktyvumą, bendrą ląstelių antioksidacinę būklę, lipidų peroksidaciją ir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentracijos pokyčius.
2. Nustatyti lapų ekstraktų poveikį dumblių ląstelių elektrofiziologinei reakcijai ir mirtingumui.
3. Ištirti lapų ekstraktų, gaunamų per 30 dienų savaime irstant paklotės lapams, įtaką oksidacinio streso fermentų GST, KAT ir GR aktyvumui bei viduląstelinei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentracijai.

#### **Ginamieji teiginiai:**

1. *Q. robur* ir *F. sylvatica* lapų ekstraktai sukėlė *N. obtusa* oksidaciniam stresui būdingą fermentų atsaką, kuris priklausė tiek nuo ekstraktų koncentracijos, tiek nuo poveikio trukmės. Detoksikacijos reakcijos pasireiškė reaktyviausias deguonies formas skaidančių fermentų aktyvumo pokyčiais. Analogiškai fermentų aktyvumo pokyčiai įvyko ir bandymuose, imituojančiuose gamtines sąlygas, t. y. veikiant dumblių ląsteles savaime yrančių paklotės lapų ekstraktu.
2. Tiek *Q. robur* (245–1838 mg L<sup>-1</sup> IOA), tiek *F. sylvatica* (330–1100 mg L<sup>-1</sup>) lapų ekstraktai jau po 15 min. ekspozicijos sukėlė ląstelių membranos depoliarizaciją, kuri tęsėsi per visą 24 val. trukmės poveikį. Mažesnių, tokių kaip gamtiniuose gėlavandeniuose telkiniuose, koncentracijų ekstraktai sukėlė taip pat žymias, bet adaptyvaus pobūdžio elektrofiziologines reakcijas.

3. *N. obtusa* reakcijos į *Q. robur* ir *F. sylvatica* lapų ekstraktus aptiktos skirtinguose biologinio organizuotumo lygmenyse. Santykinai jautresnės reakcijos vyko fermentiniame lygmenyje, negrįžtamiems ląstelės membranos ramybės potencialo pokyčiams ir mirtingumui aptikti reikia didesnių nei aptinkamų gamtiniuose vandens telkiniuose IOA koncentracijų arba ilgesnės poveikio trukmės.

#### **Tyrimo naujumas ir reikšmė:**

1. Pirmą sykį atliktas dumblio *N. obtusa* antioksidacinio statuso tyrimas, naudojant paklotės *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktus ir per 30 dienų susidarančius šių medžių lapų savaiminio irimo paklotės ekstraktus.
2. Pirmą kartą tirtos *N. obtusa* reakcijos į paklotės *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktus skirtingais biologinio organizuotumo lygmenimis – ląstelės, ląstelės membranos (plazmolemos) ir oksidacinio streso fermentų.

## **MEDŽIAGOS IR METODAI**

### ***N. obtusa* dumblių paruošimas ir laikymas**

Ekperimentui naudoti *N. obtusa* iš Švenčiaus ežero (Aukštadvario ežerynas). Iš ežero dumbliai buvo traukiami metaliniu kabliu iš maždaug 5 m gylio ir konteineriuose su ežero vandenių transportuojami į laboratoriją. Iš šviežių dumblių gniužulo atskirtos ir išrūšiuotos tarpubamblinės ląstelės: technologiškai parankaus 3–10 cm ilgio skirtos elektrofiziologiniams ir letalumo testams, likusios – fermentinio aktyvumo tyrimo eksperimentams. Iki eksperimentų pradžios atrinktos ląstelės buvo laikomos periodiškai keičiamoje terpėje, t. y. lygiomis dalimis ežero ir nechloruotame vandentiekio vandenyje.

### ***F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktų paruošimas**

*F. sylvatica* ir *Q. robur* nukritę lapai buvo surinkti Müggelsee ežero (Vokietija) pakrantėje 2004–2007 metais. Lapai buvo džiovinami dvi paras, po to sumalami. Į stiklinius indus įdėta po 400 g sumaltų lapų, užpilta 1,5 L dirbtinės terpės (DT), paruoštos pagal NIMPTSCH ir PFLUGMACHER (2005) metodiką, ir maišyta 24 val. kambario temperatūroje. Nuosėdos pašalintos mišinį centrifuguojant (20 000 × g, 10 min, 4°C), o supernatantą filtruojant per 0,8 μm membraninį filtrą. Iš koncentruotų lapų ekstraktų paruošti skirtingos IOA koncentracijos tirpalai.



### **Lapų paklotės savaiminio irimo ekstraktų (LPIE) paruošimas**

Šiam eksperimentui pasirinkti trys mėginiai: *F. sylvatica*, *Q. robur* ir kontrolinis (tik DT), nukritę sausi lapai buvo padalinti į porcijas, sudėti į 10 L talpos stiklinius indus, užpildytus DT. Kiekvieną savaitę išgaravęs tirpalo tūris buvo papildomas terpe iki buvusiojo. Lapų paklotės irimo ekstraktai buvo ruošiami penkiais pakartojimais, nustatoma IOA koncentracija.

### **Cheminė lapų ekstraktų ir ežero vandens analizė**

Abiejų rūšių lapų ekstraktuose ištirpusi organinė anglis nustatyta juos deginant (TOC-5000A, Shimadzu, Australia), rūgštinimu pašalinus iš mėginio neorganinius karbonatus (DIN EN 1484, 1998). Ežero vandenyje ištirpusios organinės anglies koncentracija nustatyta skysčių chromatografijos ir organinės anglies detekcijos (LC-OCD) metodais (LST ISO 8245, 2003; HUBER, FRIMMEL, 1996).

### **Dumblių ląstelių ekspozicija lapų ekstraktais**

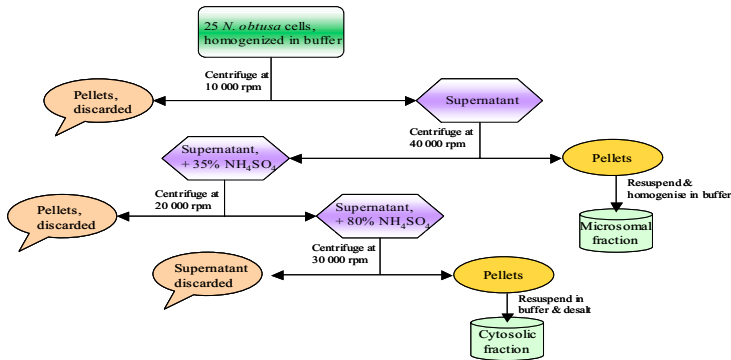
Siekiant nustatyti koncentracijos bei atsako priklausomybę, *N. obtusa* ląstelės 24 val. buvo veikiamos *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų įvairios IOA koncentracijos ekstraktais: 0,11, 1,1, 5,5, 11, 55 ir 0,245, 2,45, 12,25, 24,5, 122,5 mg L<sup>-1</sup>, atitinkamai. Tiriant fermentų aktyvumo pokyčių priklausomybę nuo poveikio trukmės, ląstelės buvo veikiamos *F. sylvatica* (1,1 mg L<sup>-1</sup>) ir *Q. robur* (2,45 mg L<sup>-1</sup>) IOA lapų ekstraktais 15 min., 0,5, 1, 1,5, 2, 4 ir 24 val. Visų rūšių, įskaitant kontrolę, ekspozicijos atliktos penkiais kartojimais po 25 dumblių ląsteles, palaikant 20±1°C temperatūrą ir fotoperiodą 14:10 (tamsa:šviesa). Po ekspozicijos *N. obtusa* ląstelės užšaldytos skystame azote.

### **Dumblių ląstelių ekspozicija lapų irimo ekstraktais**

Dumblių ląstelės eksponuotos 2 val. *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų įvairių IOA koncentracijų degradacijos ekstraktais. Visų rūšių, įskaitant kontrolę, ekspozicijos atliktos penkiais pakartojimais po 25 dumblių ląsteles, palaikant 20±1°C temperatūrą ir fotoperiodą 14:10 (tamsa:šviesa). Ekspozicijai pasibaigus *N. obtusa* ląstelės užšaldytos skystame azote ir laikytos šaldytuve (-80°C) iki fermentų išskyrimo procedūros.

### **Fermentų ekstrakcija iš *N. obtusa* ląstelių**

Fermentai išskirti pagal 1997 m. PFLUGMACHER ir STEINBERG parengtą metodiką (1 pav.).



1 pav. Fermentų mikrosominės ir citozolinės frakcijų išskyrimo schema

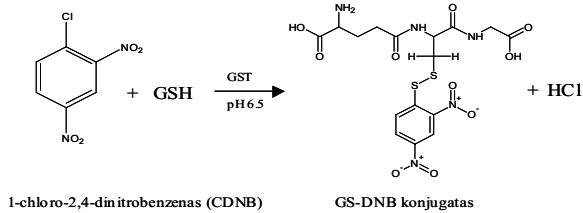
Buferiai. Ekstrahuojantis buferis: natrio fosfatas (0,1 M, pH 6,5), 20 proc. glicerolis, 1,4 mM DTE, 1mM EDTA; mikrosominis buferis: natrio fosfatas (20 M, pH 7,0), 20 proc. glicerolis; citozolio buferis: natrio fosfatas (20 mM, pH 7,0).

Procedūros. Vienos Petri lėkštelės *N. obtusa* ląstelės homogenizuotos rankiniu homogenizatoriumi, įpylus 10 mL ekstrahuojančiojo buferio. Išcentrifugavus homogenizatą nuosėdos atskiriamos, o supernatantas vėl centrifuguojamas (1 pav.). Supernatante lieka citozolinė frakcija, kurios baltymai nusodinami amonio sulfatu ( $209 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Amonio sulfatas buvo dedamas 30 min. lėtai maišant, po to dar maišoma 30 min. Likusi nuosėdose mikrosominė frakcija homogenizuojama 0,5 mL mikrosominiame buferyje, po to supilama į Ependorfo mėgintuvėlius. Toliau citozolinė frakcija centrifuguojama 20 min. 20000 aps/min. greičiu (1 pav.). Nuosėdos pašalinamos, supernatanto baltymai nusodinami amonio sulfatu ( $319 \text{ mg mL}^{-1}$ ), jį lėtai dedant ir maišant 30 min., po to maišoma dar 60 min. Vėliau centrifuguojame 30 min. 30000 aps/min. (1 pav.). Atskyrus supernatantą, nuosėdos tirpinamos 500  $\mu\text{L}$  citozolio buferyje. Druskoms atskirti naudotos NAP 5 (Sefadeksas G–25) kolonėlės. Gauta mikrosominė ir citozolinė frakcija užšaldyta skystame azote ir laikyta šaldytuve ( $-80^{\circ}\text{C}$ ).

### **Mikrosominės ir citozolinės frakcijos glutatono S-transferazės aktyvumo matavimas**

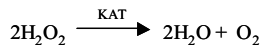
0,030 g 1–chloro–2,4–dinitrobenzeno (CDNB) ištirpinta 5 mL etanolio ir 0,090 g GSH–5 mL distiliuoto vandens (HABIG, 1974). Spektroskopinei analizei naudojamas

natrio fosfato (NaP) buferis (0,1 M. PH 6,5). Matuojama spektrofotometru (340 nm, 5 min.). Reakcija:



### Citozolinės frakcijos aktyvumo matavimas

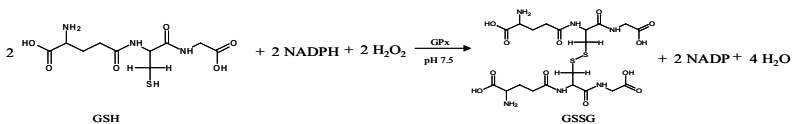
Katalazės. Matuojama spektrofotometru (240 nm, 3 min.) naudojant NaP buferį (50mM, pH 7) ir 150 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μl 30 proc. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atskiesta 6,4 mL NaP buferiu) (BAUDHUIN, 1964). Reakcija:



Glutationo reduktazės. Tiriama spektrofotometriškai (340 nm, 3 min.), matuojant NADPH (β-nikotinamido adenino dinukleotido fosfato) sunaudojimą (CARLBERG, MANNERVIK, 1985). Oksiduodama NADPH iki NADP<sup>+</sup>, GR redukuoja glutationo disulfidą (GSSG) iki glutationo (GSH). Reakcija:

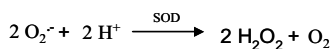


Glutationo peroksidazės. Glutationo peroksidazės aktyvumas buvo matuojamas spektrofotometriškai (340 nm, 3 min.) pagal DROTHAR (1985) metodiką. GPx redukuoja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sunaudodama GSH, ir kaip pasekmė – aktyvuojama glutationo reduktazė, kuri, savo ruožtu, redukuoja GSSG į GSH. Vėliau, oksiduojant NADPH, susidaro NADP<sup>+</sup>. Reakcija:



Superoksido dismutazės. SOD aktyvumas nustatytas fotometriškai (525 nm) naudojant Calbiochem<sup>®</sup> SOD rinkinį pagal NEBOT ir kt. (1993). Analizė grindžiama

netiesioginiu SOD santykinu didėjimu dėl savaiminės oksidacijos vandeniniame šarmo tirpale. Reakcija:



### Fermentų aktyvumo skaičiavimas

Fermentų katalizinis aktyvumas ( $z$ ) išreiškiamas per fermento kiekį, reikalingą katalizuoti 1 M substrato per 1 s, esant 25°C (1 katalas, *kat*). Matuojant spektrofotometriškai katalizinis aktyvumas apskaičiuojamas:

$$z = \frac{(\Delta E * V)}{(\epsilon * d * \Delta t * v)}$$

čia:  $\Delta E$  – ekstinkcijos pokytis per minutę,  $V$  – bendras kiuvetės tūris ( $\mu\text{L}$ ),  $\epsilon$  – molinis ekstinkcijos koeficientas ( $\text{L} \cdot \text{mM} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),  $d$  – kiuvetės plotis (cm),  $\Delta t$  – matavimo intervalas (s),  $v$  – ekstrahuoto fermento tūris ( $\mu\text{L}$ ).

Norint palyginti skirtingų fermentų aktyvumą yra apskaičiuojamas sunormuotas pagal baltymų kiekį (baltymo koncentracija buvo matuojama Bredford metodu, 595 nm) kiekvieno fermento katalizinis aktyvumas ( $z$ ):

$$z = \frac{(\Delta E * V)}{(\epsilon * d * \Delta t * v * c)}$$

čia:  $c$  – fermentų ekstrakto baltymo kiekis ( $\mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$ ). Darbe fermentų aktyvumas išreikštas *nkat*  $\text{mg}^{-1}$  baltymo.

### N. obtusa ląstelės membranos potencialo matavimas

Ląstelės ramybės potencialas (RP) buvo matuojamas taikant  $\text{K}^+$ -anestezijos metodą, kai nedidelį ląstelės fragmentą paveikus 100 mM KCl tirpalu pasiekiamas elektrinis kontaktas su citoplazma (SHIMMEN, TAZAWA 1986). Šis, abipus plazmolemos, t. y. tarp citoplazmos ir kontrolinės terpės ląstelės išorėje susidarantis elektrinių potencialų skirtumas buvo matuojamas išoriniais (ekstraląsteliniais) Ag/AgCl elektrodais. Toksiškumas siejamas su ženkliu ląstelių ramybės potencialo depoliarizacija, t. y. jo absoliutinio dydžio mažėjimu veikiant tiriamuoju tirpalu (MANUSADŽIANAS et al., 1995; 1999). Ląstelių ( $n \approx 120/\text{koncentr.}$ ) ramybės potencialo kinetika buvo matuojama 24 val., veikiant *Q. robur* (7,5–1838  $\text{mg L}^{-1}$  IOA) ir *F. sylvatica* (33–1100  $\text{mg L}^{-1}$  IOA) lapų ekstraktais, ir 1,5 val. – kontroliniu tirpalu.

Tyrimo metu 32 ląstelės talpinamos į organinio stiklo testavimo kamerą iš keturių vienodų segmentų, sudarytų iš 8 testavimo geldelių ir papildomos referentinės geldelės, turinčios elektrinį ryšį su koncentruoto KCl tirpalo pripildytu centriniu grioviu per agarinį tiltelį. Registravimo elektrodai tvirtinami virš kiekvienos geldelės ir panardinami šalia ląstelės. Ląstelių membraniniai potencialai matuojami referentinio elektrodo, bendro visoms 8 geldelėms atžvilgiu. Į referentinę geldelę įpilamas toks pats, kaip ir į kitas testavimo geldeles su ląstelėmis, tirpalas. Be to, joje yra antrasis įžeminimo elektrodas. Testuoti tiriamąjį tirpalą pradedama nusistovėjus ląstelių RP vidutinei reikšmei, joms išbuvus kontrolinėje terpėje apie 1,5–3 val., esant 17–22°C temperatūrai.

Per elektroninę daugiakanalinę sąsają „Akstis“ bioelektriniai signalai perduodami į personalinį kompiuterį, kurio monitoriuje speciali programinė įranga leidžia stebėti kiekvienos ląstelės reakcijos kinetiką ir valdyti eksperimentą.

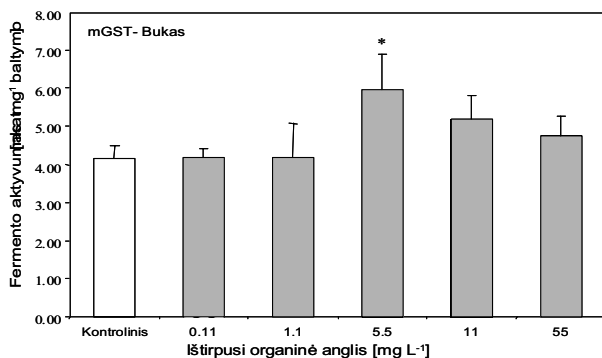
### **Letalumo tyrimas**

Tyrimo metu ląstelės sudedamos į Petri lėkšteles po 10 vienetų. Kiekvienai koncentracijai imama 40 ląstelių. *F. sylvatica* (5,5–1100 mg L<sup>-1</sup> IOA) ir *Q. robur* (24,5–1225 mg L<sup>-1</sup> IOA) lapų ekstraktais paveiktos ląstelės laikytos tamsoje 42 dienas. Kiekvieną dieną patikrinama, kiek ląstelių žuvo. Apie ląstelės žuvimą sprendžiama pagal turgoro praradimą – pakėlus mentele žuvusią ląstelę, ji subliūkšta. Letalioji koncentracija (LC<sub>x</sub>) – toksikanto koncentracija, sukianti x proc. testuojamų ląstelių žūtį.

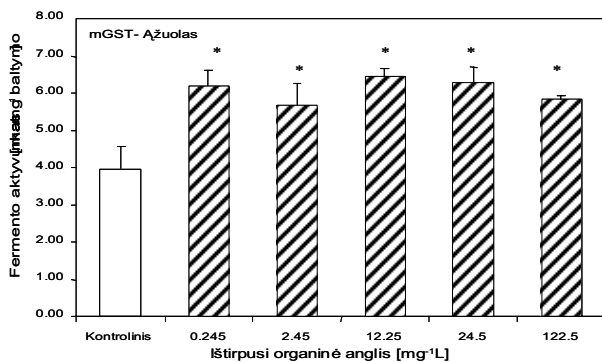
## **REZULTATAI**

### ***N. obtusa* ląstelių oksidacinio streso fermentų aktyvumo pokyčių priklausomybė nuo *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktų koncentracijos**

Mikrosominė glutationo S-transferazė. *N. obtusa* ląsteles 24 val. paveikus *F. sylvatica* ir *Q. robur* ekstraktais, palyginti su kontroliniu (2 ir 3 pav.), didėjo fermento mGST aktyvumas. Veikiant *F. sylvatica* ekstraktu (2 pav.) aktyvumas žymiai didėjo tik esant 5,5 mg L<sup>-1</sup> IOA koncentracijai, tuo tarpu veikiant *Q. robur* ekstraktu mGST aktyvumo didėjimas statistiškai patikimai skyrėsi visų tirtų IOA koncentracijų (0,245 – 122,5 mg L<sup>-1</sup>) atvejais (3 pav.).

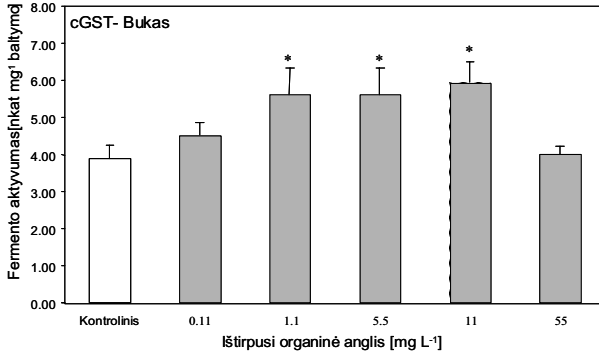


2 pav. Mikrosominės glutatono S-transferazės aktyvumas (CDNB substratas) *N. obtusa* ląstelėse po 24 val., veikiant skirtingų IOA koncentracijų *F. sylvatica* lapų ekstraktais. \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$



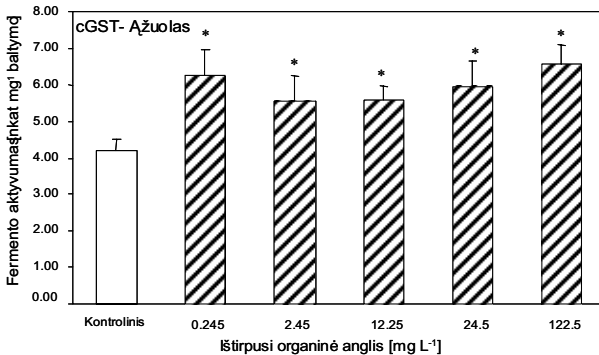
3 pav. Mikrosominės glutatono S-transferazės aktyvumas *N. obtusa* ląstelėse po 24 val., veikiant skirtingų IOA koncentracijų *Q. robur* lapų ekstraktais. \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

Citozolinė glutatono S-transferazė. Palyginti su mGST, citozolinės GST aktyvumo didėjimas, sukeltas *F. sylvatica* ekstraktų, buvo akivaizdus tiriant platesniu IOA koncentracijų diapazonu, t. y. nuo 1,1 iki 5,5 mg L<sup>-1</sup> (4 pav.). Nuo aukščiausios tirtos IOA koncentracijos (5,5 mg L<sup>-1</sup>) poveikio, cGST aktyvumas krito iki kontrolinio lygmens.



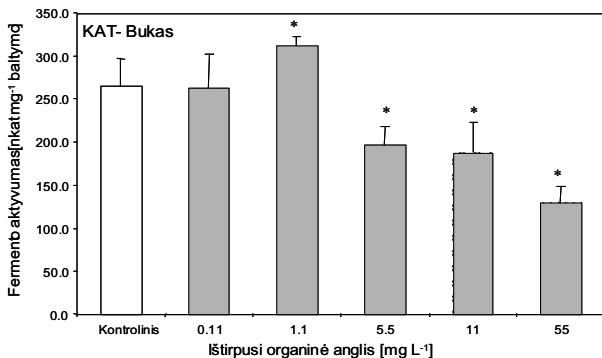
4 pav. Citozolinės glutatono S-transferazės aktyvumas *N. obtusa* ląstelėse po 24 val., veikiant skirtingų IOA koncentracijų *F. sylvatica* lapų ekstraktais. \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

Kaip ir mGST atveju, žymiai didėjo cGST aktyvumas *N. obtusa* ląstelėse, veikiant *Q. robur* ekstraktu. Aktyvumo didėjimas nustatytas visų tirtų IOA koncentracijų (0,245 – 122,5 mg L<sup>-1</sup>) atvejais (5 pav.).



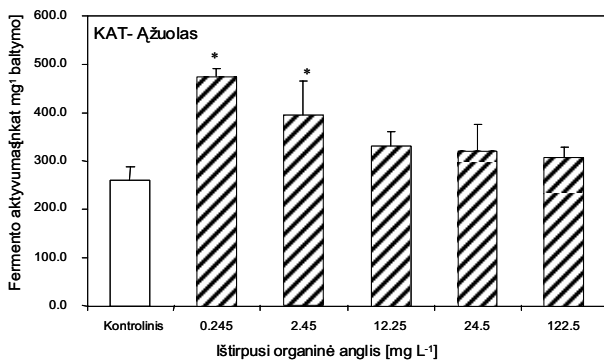
5 pav. Citozolinės glutatono S-transferazės aktyvumas *N. obtusa* ląstelėse po 24 val., veikiant skirtingų IOA koncentracijų *Q. robur* lapų ekstraktais. \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

Katalazė. Katalazės aktyvumas statistiškai patikimai didėjo kontrolės atžvilgiu veikiant *N. obtusa* 1,1 mg L<sup>-1</sup> IOA *F. sylvatica* ekstraktu, vėliau, padidinus koncentraciją nuo 5,5 iki 55 mg L<sup>-1</sup>, krito žemiau kontrolinio lygio (6 pav.).



6 pav. Katalazės aktyvumas *N. obtusa* ląstelėse po 24 val., veikiant skirtingų IOA koncentracijų *F. sylvatica* lapų ekstraktais. \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

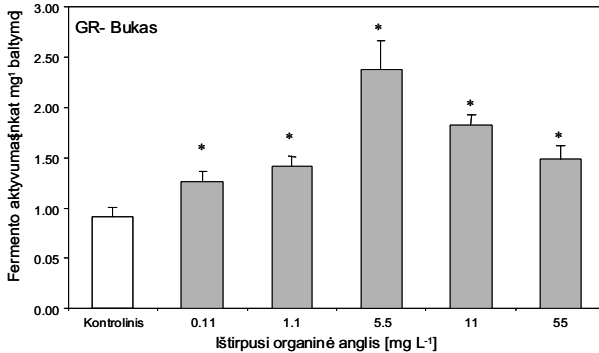
*Q. robur* ekstraktas (0,245 ir 2,45 mg L<sup>-1</sup> IOA) sukėlė žymų katalazės aktyvumą esant žemiausioms IOA koncentracijoms (7 pav.). Didelių skirtumų, kai IOA koncentracijos didėjo nuo 12,25 iki 122,5 mg L<sup>-1</sup>, nepastebėta.



7 pav. Katalazės aktyvumas *N. obtusa* ląstelėse po 24 val., veikiant skirtingų IOA koncentracijų *Q. robur* lapų ekstraktais. \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

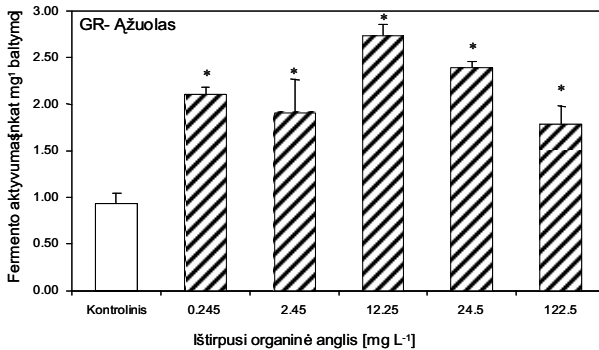
Glutatioo reduktazė. *N. obtusa* ląstelės veikiant *F. sylvatica* ekstraktu, glutatioo reduktazės aktyvumas didėjo nuo 1,4 iki 2,6 kartų, palyginti su kontroliniu per visą tirtų IOA koncentracijų intervalą (8 pav.). Didžiausias, 2,6 karto, GR aktyvumas užfiksuotas, kai IOA koncentracija buvo 5,5 mg L<sup>-1</sup>, žemiausias, 1,4 karto, kai IOA koncentracija 0,11 mg L<sup>-1</sup>.





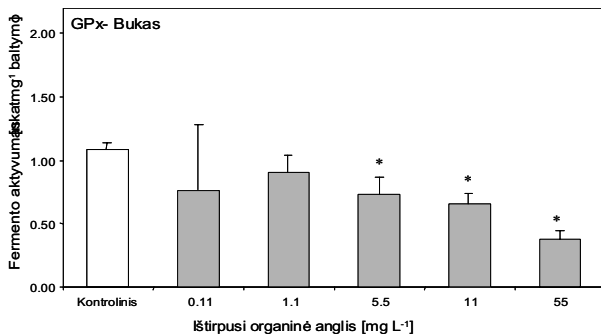
8 pav. Glutatioo reduktazės aktyvumas *N. obtusa* ląstelėse po 24 val., veikiant skirtingų IOA koncentracijų *F. sylvatica* lapų ekstraktais. \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

Dumblių ląstelės veikiant *Q. robur* ekstraktu, GR aktyvumas didėjo eksponuojant visose IOA koncentracijose (0,245 ir 122,5 mg L<sup>-1</sup>) (9 pav.).



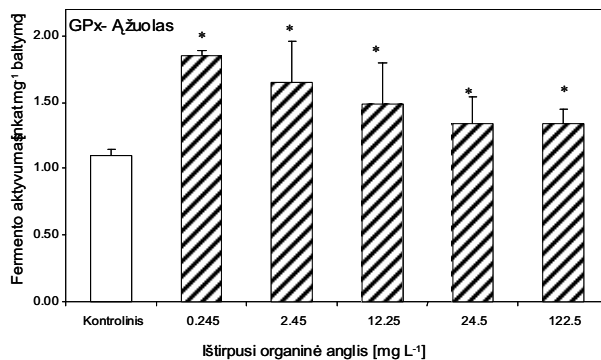
9 pav. Glutatioo reduktazės aktyvumas *N. obtusa* ląstelėse po 24 val., veikiant skirtingų IOA koncentracijų *Q. robur* lapų ekstraktais. \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

Glutatioo peroksidazė. Glutatioo peroksidazės aktyvumas *N. obtusa* ląstelėse, veikiamose *F. sylvatica* lapų ekstraktu ir kintant IOA koncentracijai nuo 5,5 iki 55 mg L<sup>-1</sup>, palyginti su kontroliniu (10 pav.), statistiškai patikimai mažėjo.



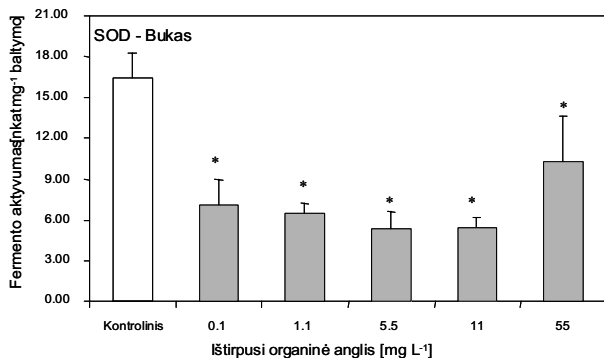
10 pav. Glutatio peroksidazės aktyvumas *N. obtusa* ląstelėse po 24 val., veikiant skirtingų IOA koncentracijų *F. sylvatica* lapų ekstraktais. \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

*N. obtusa* ląstelėse, veikiamose *Q. robur* ekstraktu, GPx aktyvumas statistiškai patikimai didėjo visų tirtų IOA koncentracijų tirpaluose (11 pav.), tačiau nuo maksimalaus aktyvumo,  $0,245 \text{ mg L}^{-1}$ , GPx aktyvumas palaipsniui mažėjo didėjant IOA koncentracijai iki  $24,5 \text{ mg L}^{-1}$ .



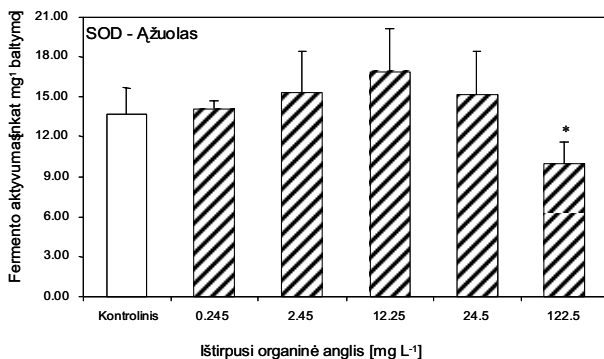
11 pav. Glutatio peroksidazės aktyvumas *N. obtusa* ląstelėse po 24 val., veikiant skirtingų IOA koncentracijų *Q. robur* lapų ekstraktais. \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

Superoksido dismutazė. *N. obtusa* ląstelėse, veikiamose 24 val. visų tirtų IOA koncentracijų *F. sylvatica* lapų ekstraktu, nustatyta, kad statistiškai patikimas SOD aktyvumas mažėjo, palyginti su kontroliniu (12 pav.).



12 pav. Superoksido dismutazės aktyvumas *N. obtusa* ląstelėse po 24 val., veikiant skirtingų IOA koncentracijų *F. sylvatica* lapų ekstraktais. \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

*N. obtusa* ląsteles 24 val. veikiant *Q. robur* ekstraktu, SOD aktyvumas nekito per visą IOA koncentracijų intervalą – nuo 0,245 iki 24,5 mg L<sup>-1</sup> (13 pav.). Palyginti su kontroliniu, statistiškai patikimas SOD slopinimas (iki 1,4 karto) nustatytas tik didžiausios IOA koncentracijos atveju – 122,5 mg L<sup>-1</sup>.

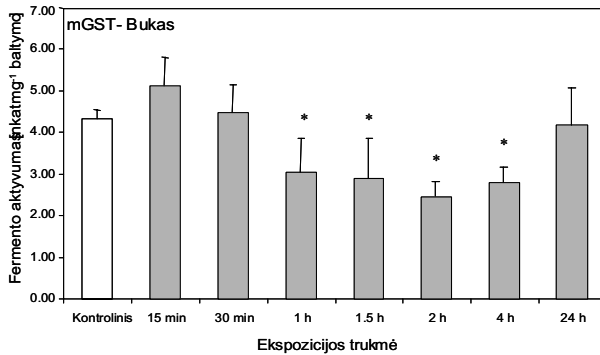


13 pav. Superoksido dismutazės aktyvumas *N. obtusa* ląstelėse po 24 val., veikiant skirtingų IOA koncentracijų *Q. robur* lapų ekstraktais. \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

***N. obtusa* ląstelių oksidacinio streso fermentų aktyvumo pokyčių priklausomybė nuo ekspozicijos trukmės *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktuose**

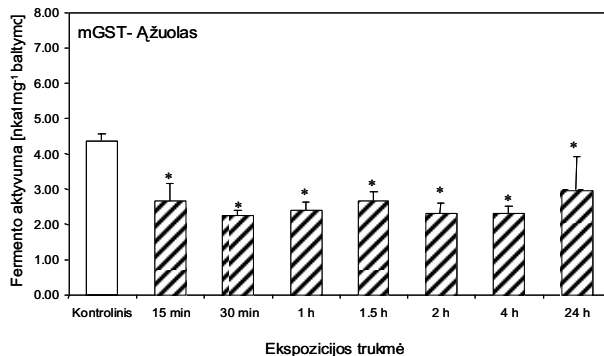
Mikrosominė glutationo S-transferazė. Laiko priklausomybės (nuo 15 min. iki 24 val.) *F. sylvatica* lapų ekstrakto poveikio *N. obtusa* ląstelių ekspozicijoje mGST aktyvumas iki 1 val. nesiskyrė nuo kontrolinių matavimų, bet statistiškai patikimai

mažėjo nuo 1,4 iki 1,7 karto, palyginti su kontroliniu, trukmei pailgėjus nuo 1 iki 4 val. (14 pav.). 24 val. eksponuotame mėginyje mGST aktyvumas dumblio ląstelėse vėl pakilo iki kontrolinio lygmens (14 pav.).



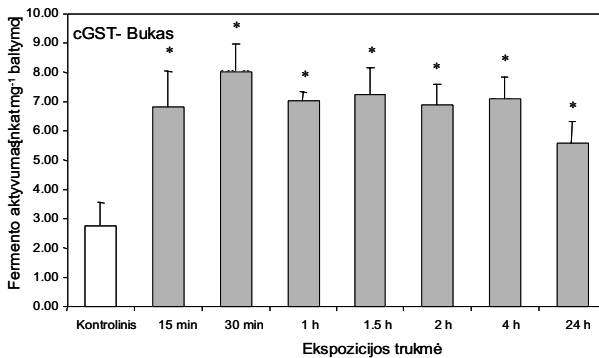
14 pav. Mikrosominės glutationo S-transferazės aktyvumo, matuoto naudojant CDNB, pokyčiai *N. obtusa* ląstelėse, paveikus *F. sylvatica* (1,1 mg L<sup>-1</sup> IOA). \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio, p < 0,05, n=5

*Q. robur* lapų ekstraktas statistiškai patikimai sumažino mGST aktyvumą dumblių ląstelėse eksponuojant visą ekspozicijos laikotarpį (15 pav.).



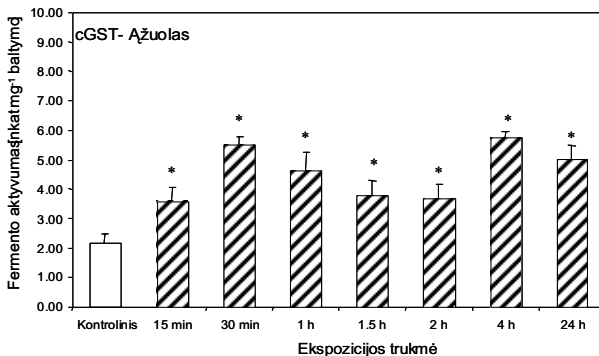
15 pav. Mikrosominės glutationo S-transferazės aktyvumo, matuoto naudojant CDNB, pokyčiai *N. obtusa* ląstelėse, paveikus *Q. robur* (2,45 mg L<sup>-1</sup> IOA). \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio, p < 0,05, n=5

Citozolinė glutationo S-transferazė. GST aktyvumas *N. obtusa* ląstelėse, paveiktose *F. sylvatica* lapų ekstraktu (1,1 mg L<sup>-1</sup> IOA koncentracija), buvo statistiškai patikimai padidėjęs. Eksponuojant nuo 15 min. iki 4 val., aktyvumas padidėjo apytiksliai iki 2,5 karto. Net po 24 val., kurias veikė *F. sylvatica* lapų ekstraktas, cGST aktyvumas išliko padidėjęs iki 2 kartų, palyginti su kontroliniu (16 pav.).



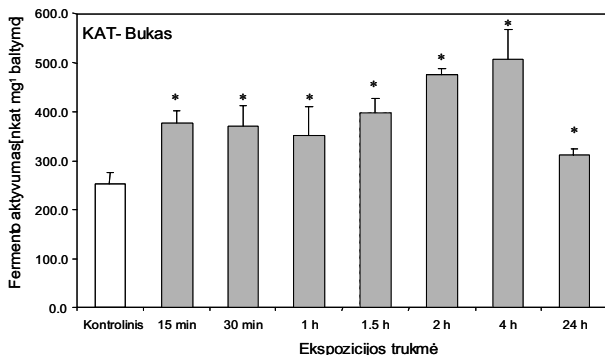
16 pav. Citozolinės glutationo S-transferazės aktyvumo, matuoto naudojant CDNB substratą, pokyčiai *N. obtusa* ląstelėse, veikiant *F. sylvatica* lapų ekstraktu (1,1 mg L<sup>-1</sup> IOA). \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

Citozolinės glutationo S-transferazės atsakas į 2,45 mg L<sup>-1</sup> IOA (*Q. robur* ekstrakto) koncentraciją pasireiškė įvairių reikšmių didėjimu visą tirtą laiko intervalą (17 pav.).



17 pav. Citozolinės glutationo S-transferazės aktyvumo, matuoto naudojant CDNB substratą, pokyčiai *N. obtusa* ląstelėse, veikiant *Q. robur* ekstraktu (2,45 mg L<sup>-1</sup> IOA). \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

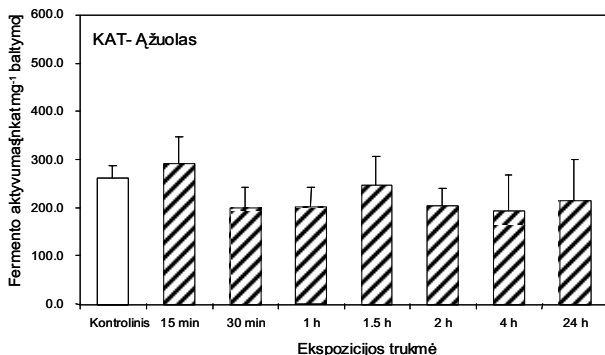
Katalazė. *F. sylvatica* lapų ekstraktas statistiškai patikimai didino KAT aktyvumą *N. obtusa* ląstelių mėginiuose viso veikimo metu (18 pav.). KAT aktyvumas palyginti su kontroliniu, didėjo 1,4–2,0 karto. Labiausiai padidėjo po 4 val., veikiant *F. sylvatica* lapų ekstraktui. Po 24 val. KAT aktyvumas buvo linkęs mažėti (18 pav.).



18 pav. Katalazės aktyvumo pokyčiai *N. obtusa* ląstelėse, veikiant *F. sylvatica* ekstraktu (1,1 mg L<sup>-1</sup> IOA).

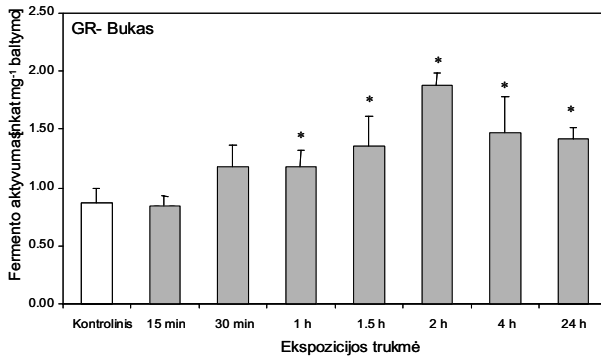
\* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

Laiko priklausomybės eksperimentas atliktas naudojant *Q. robur* lapų ekstraktą (2,45 mg L<sup>-1</sup> IOA). Rezultatai pateikti 19 pav. Statistiškai patikimų KAT aktyvumo skirtumų, palyginti su kontroliniu, nenustatyta.



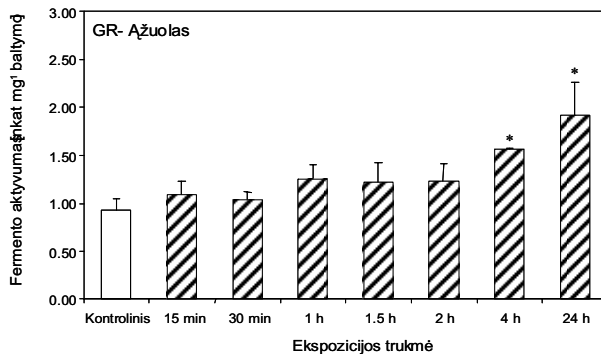
19 pav. Katalazės aktyvumo pokyčiai *N. obtusa* ląstelėse, veikiant *Q. robur* ekstraktu (2,45 mg L<sup>-1</sup> IOA). \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

Glutatioo reduktazė. Veikiant 1 val. 1,1 mg L<sup>-1</sup> IOA *F. sylvatica* lapų ekstraktu, žymiai padidėjo GR aktyvumas ir ši tendencija išliko iki ekspozicijos pabaigos (20 pav.). GR aktyvumas labiausiai padidėjo (iki 2 kartų) po 2 val. Po 4 ir 24 val., veikiant *F. sylvatica* lapų ekstraktui, GR aktyvumas linkęs mažėti, bet vis tiek išlieka statistiškai patikimai pakitęs, palyginti su kontroliniu (20 pav.).



20 pav. Glutatioo reduktazės aktyvumo pokyčiai *N. obtusa* ląstelėse, veikiant *F. sylvatica* ekstraktu (1,1 mg L<sup>-1</sup> IOA). \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

*N. obtusa* dumblius veikiant 2,45 mg L<sup>-1</sup> IOA koncentracijos *Q. robur* lapų ekstraktu, GR aktyvumo padidėjimas nustatytas po 4 val., o didžiausias skirtumas, palyginti su kontroliniu, gautas po 24 val. veikiant *Q. robur* ekstraktu (21 pav.).



21 pav. Glutatioo reduktazės aktyvumo pokyčiai *N. obtusa* ląstelėse, veikiant *Q. robur* ekstraktu (2,45 mg L<sup>-1</sup> IOA). \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

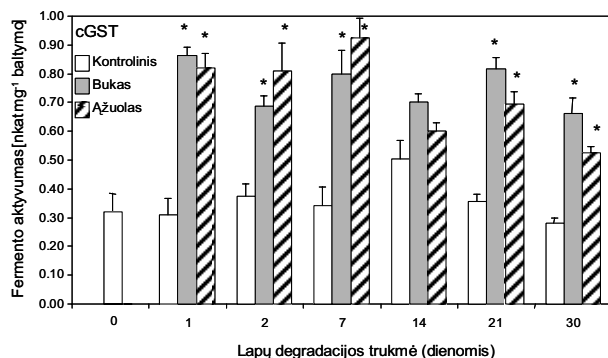
**Per 30 dienų irstančių *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų paklotės ekstraktų sukelta *N. obtusa* ląstelių oksidacinio streso fermentų aktyvumo moduliacija**

Prieš atliekant ekspoziciją tiek įvairaus laikotarpio lapų paklotės irimo ekstraktai, tiek kontrolinis tirpalas buvo charakterizuoti pagal ištirpusios organinės anglies kiekį (1 lentelė).

	Kontrolinis	Bukas	Ažuolas
	IOA, mg L <sup>-1</sup>		
0	0.5	-	-
1	0.7	94.8	86.0
2	0.4	128.7	137.3
7	1.0	166.5	177.7
14	3.5	151.2	156.1
21	0.7	136.3	156.2
30	0.9	127.2	144.1

1 lentelė. Ištirpusios organinės anglies kiekis kontroliniame tirpale, *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų paklotės irimo ekstraktuose

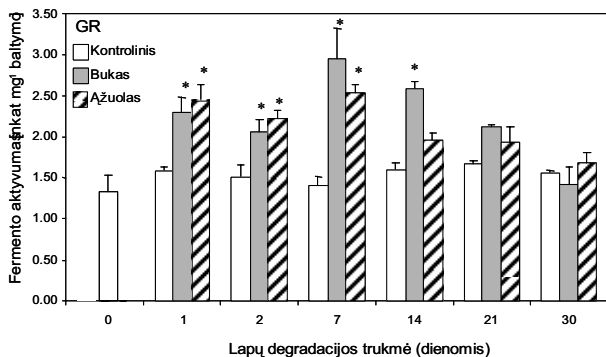
Citozolinė glutationo S-transferazė. *N. obtusa* ląstelių cGST aktyvumas, 2 val. jas veikiant *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų paklotės irimo ekstraktais (LPIE), labai padidėjo, palyginti su kontroliniu (22 pav.). Statistiškai patikimai cGST suaktyvėjo ląstelėse, veikiamose *F. sylvatica* (1,4–2,7 karto, palyginti su kontroliniu) ir *Q. robur* (1,2–2,7 karto) lapų irimo ekstraktais. Jau vienos dienos *F. sylvatica* ir *Q. robur* LPIE labai padidino cGST aktyvumą (atitinkamai, IOA koncentracijos 94,8 ir 86,0 mg L<sup>-1</sup>) (1 lentelė; 22 pav.).



22 pav. Citozolinė glutationo S-transferazės aktyvumo pokyčiai, matavimui naudojant CDNB substrata, *N. obtusa* ląstelėse, veikiamose *F. sylvatica* ir *Q. robur* skirtingos trukmės lapų paklotės irimo ekstraktais. \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$



**Glutatioo reduktazė.** GR aktyvumas *N. obtusa* ląstelėse statistiškai patikimai padidėjo, palyginti su kontroliniu, jas veikiant iki 7 dienų *F. sylvatica* ir *Q. robur* ekstraktais, tuo tarpu žymaus GR aktyvumo pokyčio ląstelėse, veikiamose 21 ir 30 dienų *F. sylvatica* ir *Q. robur* LPIE, nenustatyta (23 pav.). Glutatioo reduktazės aktyvumas dumblio ląstelių mėginiuose pakilo 1,4–2,1 ir 1,3–1,8 karto veikiant *F. sylvatica* ir *Q. robur* ekstraktais 30 dienų (23 pav.). Didžiausias fermento aktyvumas (2,1 karto) nustatytas *N. obtusa* ląstelių veikiant 7 dienų 166,5 mg L<sup>-1</sup> IOA *F. sylvatica* LPIE (1 lentelė), o mažiausias (1,4 karto) – *N. obtusa* ląstelių veikiant 2 dienų 94,8 mg L<sup>-1</sup> IOA *F. sylvatica* LPIE. Didžiausias GR aktyvumas (1,8 karto) buvo po 2 val., veikiant ląstelių 7 dienų *Q. robur* LPIE, o mažiausias (1,5 karto) – veikiant šias ląstelių 2 dienų *Q. robur* LPIE (23 pav.; 1 lentelė).

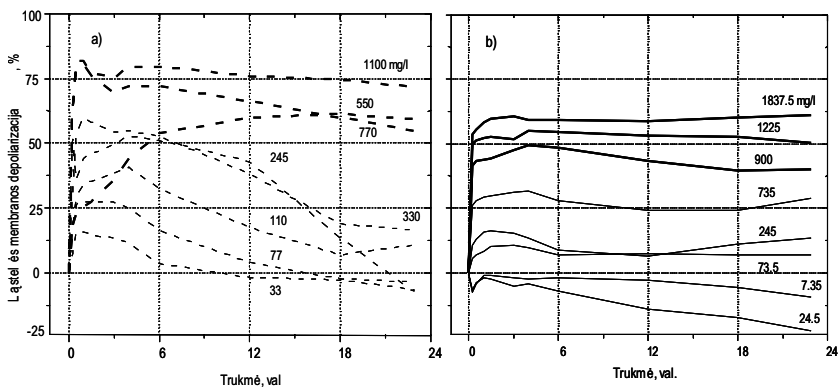


23 pav. Glutatioo reduktazės aktyvumo pokyčiai, matuoti *N. obtusa* ląstelėse, veikiamose ■ *F. sylvatica* ir ▨ *Q. robur* skirtingos trukmės lapų paklotės irimo ekstraktais. \* Statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolinio,  $p < 0,05$ ,  $n=5$

### ***N. obtusa* ląstelių, veikiamų *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktais, elektrofiziologinis atsakas**

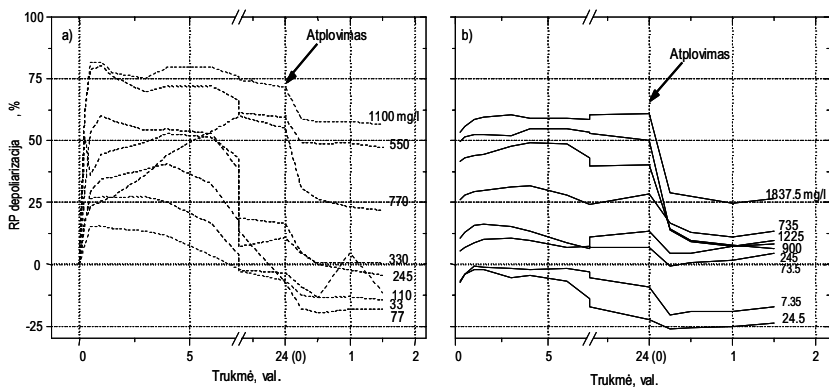
*F. sylvatica* lapų 33–1100 mg L<sup>-1</sup> IOA koncentracijų ekstraktai per pirmąsias 15 min. sukėlė greitą ląstelių depoliarizaciją (20–80 proc.), tačiau ląstelės, kurios buvo veikiamos mažesnių (33–245 mg L<sup>-1</sup>) IOA koncentracijų ekstraktais, buvo linkusios atkurti pradinę ramybės potencialo reikšmes per 3–24 val. (24a pav.). Panaši greita, nors silpnesnė, 25–60 proc. ląstelių RP depoliarizacija per pirmąsias 15 min. vyko ir veikiant *Q. robur* lapų 735–1837,5 mg L<sup>-1</sup> IOA koncentracijų ekstraktais (24b pav.).

Tokia būklė, santykinai nepakitusi, išliko iki eksperimento pabaigos. Nedidelė depoliarizacija, iki maždaug 10 proc., nustatyta veikiant *Q. robur* lapų 73,5 ir 245 mg L<sup>-1</sup> IOA koncentracijų tirpalais, tuo tarpu ląstelių elektrogeninio aktyvumo stimuliacija pasireiškė 10–20 proc. hiperpoliarizacija, esant 7,35 ir 24,5 mg L<sup>-1</sup> IOA, t. y. žemiausių tirtų *Q. robur* lapų ekstrakto koncentracijų (24b pav.).



24 pav. Ląstelių ramybės potencialo kinetika, veikiant *F. sylvatica* (a) ir *Q. robur* (b) lapų ekstraktais. Kiekviena kreivė nubrėžta pagal 100–120 ląstelių RP reikšmių vidurkius.

25 pav. pateikta 24 val. *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktų poveikio sukeltos RP pokyčių atsistatymo kinetika per 90 min trukusį atplovimą kontrolinėje terpėje. Atplovimo nuo *F. sylvatica* ekstrakto metu buvo pastebėtos dvi skirtingos RP kinetikos (25a pav.): visiško (100 proc.) RP atsistatymo iki kontrolinių verčių, užregistruotų prieš pradedant veikti *F. sylvatica* lapų ekstraktais (33–330 mg L<sup>-1</sup> IOA), ir iki 25–60 proc. liekamosios RP depoliarizacija, prieš tai veikus 550–1100 mg L<sup>-1</sup> IOA *F. sylvatica* lapų ekstraktais. Įdomu, kad atplauinant ląsteles nuo *Q. robur* ekstrakto kontroliniu tirpalu, RP reikšmė nuo pradinės skyrėsi vos 12 proc. visame IOA koncentracijų diapazone, išskyrus didžiausią IOA koncentraciją (1837,5 mg L<sup>-1</sup>) (25b pav.).

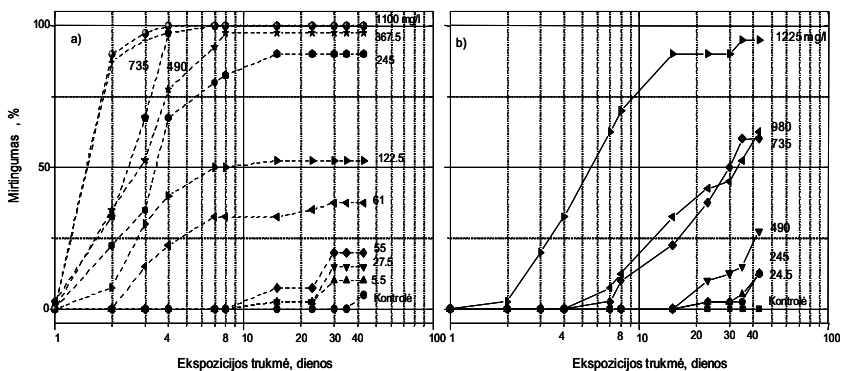


25 pav. Skirtingos koncentracijos *F. sylvatica* (a) ir *Q. robur* (b) lapų ekstraktais paveiktų ląstelių ramybės potencialo kinetika atplauant jas kontroliniu tirpalu (pradžia pažymėta rodykle). Kiekviena kreivė nubrėžta pagal 100–120 ląstelių RP reikšmių vidurkius

#### ***N. obtusa* ląstelių, veiktų *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktais, mirtingumas**

Visos *N. obtusa* ląstelės išgyveno visas tirtas *F. sylvatica* (5,5–1100 mg L<sup>-1</sup> IOA) ir *Q. robur* (24,5–1225 mg L<sup>-1</sup> IOA) koncentracijas, atitinkamai vieną ir dvi dienas (26a ir b pav.). Apskritai, *F. sylvatica* ekstraktas buvo toksiškesnis nei *Q. robur*. Po 4 dienų ekspozicijos 61–1100 mg L<sup>-1</sup> IOA koncentracijų *F. sylvatica* lapų ekstraktais veikiamų ląstelių mirtingumas viršijo 20 proc. (26a pav.); panašus *Q. robur* lapų ekstrakto sukeltas atsakas buvo tik veikiant jo didžiausia koncentracija, t. y. 1225 mg L<sup>-1</sup> IOA (26b pav.). Priešingai nei *Q. robur* lapų ekstraktu, 8 dienas veikiant ląsteles *F. sylvatica* lapų ekstraktu, ląstelių mirtingumo kreivės jau buvo santykinai stabilios (61–1100 mg L<sup>-1</sup> IOA), jos žymiai nedidėjo ir vėliau, iki eksperimento pabaigos – 42 dieną.

Pabrėžtina, kad ląstelių mirtingumas nežymiai didėjo ekspozicijos pabaigoje, esant mažiausioms *F. sylvatica* lapų koncentracijoms (5,5–55 mg L<sup>-1</sup>) – 30–42-ą dieną (26a pav.). *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktų toksiškumo skirtumas buvo akivaizdus viso eksperimento metu, pavyzdžiui, 30 dieną LC<sub>20</sub> = 55 ir 490 mg L<sup>-1</sup>, atitinkamai. Per 42 dienų ląstelių mirtingumo eksperimentą kontroliniai mėginiai nepakito iki 38-os dienos (26b pav.), po to pastebėtas 10 proc. mirtingumas *F. sylvatica* eksperimento kontroliniame mėginyje (26a pav.).



26 pav. *N. obtusa* ląstelių, veikiamų *F. sylvatica* (a) ir *Q. robur* (b) lapų ekstraktais, mirtingumas. n=40 kiekvienai koncentracijai

## DISKUSIJA

Lapų paklotė yra vienas alochtoninės ištirpusios organinės anglies šaltinių gėlavandenėse ekosistemose. Yrant lapams į vandenį išsiskiria daug cheminių junginių, kurie gali skatinti oksidacinį stresą generuodami reaktyviosios deguonies formas ir (arba) trikdydami vidinį ląstelės oksidacinį balansą vandens organizmuose (BLOKHINA et al., 2003). Tyrėme *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktais, apibūdinamais ištirpusios organinės anglies koncentracija (0,11–55,0 mg L<sup>-1</sup> ir 245–122,5 mg L<sup>-1</sup>, atitinkamai), per 24 val. sukeltus *N. obtusa* ląstelių oksidacinio streso fermentų aktyvumo pokyčius. Pažymėtina, kad ištirpusios organinės anglies kiekis tebuvo naudojamas kaip tirpalo charakterizavimo rodiklis, bet nebūtinai apibrėžė poveikumą ląstelėms.

Įprastomis sąlygomis ROS atsiradimo sparta yra dinaminėje pusiausvyroje su ROS skaidymo sparta (FOYER et al., 1994), t. y. gausėjant ROS, aktyvėja ir fermentai, kurių reikia ROS skaidymui. Nustatyta, kad, esant stresinei būklei, ROS lygis augaluose pakyla virš pusiausvyrinio (PFLUGMACHER, 2004), todėl jų antioksidacinė apsauga gali būti nepakankama. Organelės, tokios kaip peroksisomos ir chloroplastai, kuriose ROS gaminasi ir „normaliomis“ sąlygomis, streso metu yra ypatingame pavojuje (ALSCHER, 2002). Dėl sausros sukkelto streso ROS perprodukcija buvo nustatyta augalų

chloroplastuose (PRICE et al., 1989). Galima manyti, kad panašūs reiškiniai augalo ląstelėse atsiranda ir veikiant lapų ekstraktais.

Kovai su ROS pertekliumi augalai išvystė antioksidacinę apsaugos sistemą, kurią sudaro superoksido dismutazės, glutationo S-transferazės, glutationo reduktazės, katalazės, glutationo peroksidazės ir kitų fermentų komplekso aktyvumų kaita. Ląstelėje superoksido dismutazė veikia kaip pirmoji apsaugos nuo ROS linija (ALSCHER et al., 2002). Pagal apibendrintą redokso ciklo schemą (DI GIULIO et al., 1989), SOD katalizuoja superoksido  $2 O^{\cdot -}$  skilimą į molekulinį deguonį ir  $H_2O_2$ . SOD pašalina superoksidą ir tokiu būdu mažina hidroksilo radikalų formavimąsi iš superoksido. Mūsų tyrime SOD aktyvumas *N. obtusa* ląstelėse, veikiamose *F. sylvatica* ekstraktu, buvo slopinamas visomis testuotomis IOA koncentracijomis, o *Q. robur* lapų ekstrakto inhibuojantis poveikis pasireiškė tik didžiausios  $122,5 \text{ mg L}^{-1}$  IOA koncentracijos atveju. Slopinamojo SOD poveikio nebuvimas, esant mažesnei *Q. robur* lapų ekstrakto koncentracijai, patvirtina ankstesnius duomenis apie scenedesmą (*Scenedesmus armatus* (Chod.) Chod.) (AKSMANN, TUKAJ, 2004). Tame darbe buvo atskleista, kad nei antracenas, nei fenantrenas, nors šios organinės struktūros yra panašios į elago rūgštį, aptinkamą *Q. robur* lapų ekstraktuose (BIANCO, SAVOLAINEN, 1997), nesukelia žymių dumblių ląstelių superoksido dismutazės aktyvumo pokyčių. Visgi tirtosios minėtų medžiagų  $0,7\text{--}5,6 \text{ }\mu\text{M}$  koncentracijos žymiai slopino *S. armatus* augimą.

Toksinėms ar ksenobiotinėms medžiagoms patekus į augalo ląstelę, įsijungia biotransformacijoje dalyvaujantis fermentas glutationo S-transferazė, kuris padidina šių medžiagų tirpumą vandenyje, joms susijungiant su glutationo sulfhidrilio ( $-SH$ ) grupe ir išsiskiriant iš ląstelių per membranas, įsijungiant į ląstelės sienelę ar sekvestionuojant vakuolėse bei vezikulėse. Mūsų tyrimo metu aptiktas statistiškai reikšmingas cGST ir mGST aktyvumo didėjimas *N. obtusa* ląstelėse, esant  $1,1\text{--}11,0 \text{ mg L}^{-1}$  *F. sylvatica* ir  $5,5 \text{ mg L}^{-1}$  *Q. robur* lapų ekstraktų IOA koncentracijoms. Ankstesni tyrimai parodė, kad humusinės medžiagos ir natūrali organinė medžiaga turi įtakos augalo fiziologijai, būtent fotosintezei, biotransformacijai ir antioksidaciniam fermentams (PFLUGMACHER et al., 2001, PFLUGMACHER et al., 2003). MENONE ir PFLUGMACHER (2005) atskleidė, kad citozolinės GST aktyvumas *C. demersum* ląstelėse ypač didėjo jas veikiant tam tikrų koncentracijų (iki  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) organinio PCB junginiu 3-chlorobifenilu. PCB struktūros yra panašios į tas, kurios aptinkamos lapuose (BIANCO, SAVOLAINEN, 1997). Staigų ir ilgalaikį

GST aktyvumo didėjimą didžiojoje krapažolėje (*Euphorbia esula* L.) sukėlė herbicidas metildikloforas (ANDERSON, DAVIS, 2004). Panašiai GST aktyvumas žymiai didėjo *E. esula* augaluose, veikiamuose 5,0 mM parakvatu ir 2-aminoetanoliu (MASCHER et. al., 2005).

Dėl oksidacinio streso dažnai esama redukuoto glutationo (GSH) forma virsta į oksiduotą formą, glutationo disulfidą (GSSG) – tokiu būdu stimuliuojama glutationo biosintezė (MAY, LEAVER, 1993). Kai GSH oksiduojasi į GSSG, glutationo reduktazė pastarąjį perdirba į GSH. Kaip ir GST atveju, padidėjęs GR aktyvumas laikytinas oksidacinio streso rodikliu *N. obtusa* ląstelėse, veikiamose *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktais. Lygiagrečiai vykstančiame biocheminiame cikle glutationo peroksidazė vandenilio peroksido detoksikacijai taip pat naudoja GSH, paversdama jį GSSG, kuri vėlgi GR perdirba į GSH. Regeneruotas GSH gali būti naudojamas kitam vandenilio peroksido kiekiui detoksikuoti. Buvo nustatyta, kad GSH atsargų padidėjimas stiprina atsparumą oksidaciniam stresui (ZHU et al., 1999).

GR fermento, atsakingo už glutationo homeostazės palaikymą ląstelėje, tyrimai parodė, kad *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktai žymiai aktyvino šį fermentą *N. obtusa* ląstelėse (GRIGUTYTĖ et al. 2008). Panaši GR aktyvumo stimuliacija anksčiau nustatyta ir *C. demersum* augaluose, paveiktuose 3-chlorobifenilu (MENONE, PFLUGMACHER, 2005). GR aktyvumo didėjimas parodytas *E. esula* augaluose naudojant metildikloforą (ANDERSON, DAVIS, 2004). GR aktyvumo didėjimas nustatytas taip pat kukurūzų lapuose, veikiamuose parakvatu (MALAN et al. 1990). Taigi GR aktyvumo didėjimas minėtais ekstraktais veikiamose *N. obtusa* ląstelėse aiškiai rodo šio fermento apsauginę funkciją nuo oksidacinio streso. Katalazės fermento, kuris, kaip ir glutationo peroksidazė, ląstelėse detoksikuoja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aktyvumas taip pat statistiškai patikimai padidėjo veikiant dumblių mažiausiomis *F. sylvatica* (1,1 mg L<sup>-1</sup> IOA) ir *Q. robur* (2,45 mg L<sup>-1</sup> IOA) ekstraktų koncentracijomis, nors didinant *F. sylvatica* lapų paklotės ekstraktų koncentraciją nuo 5,5 iki 55 mg L<sup>-1</sup> IOA buvo stebėtas statistiškai žymus KAT aktyvumo sumažėjimas. Literatūroje esama duomenų, patvirtinančių KAT mažėjimą kituose augaluose: plaukuotasis beržas (*Betula pubescens* Ehrh.) parakvatu veikiamuose lapuose sumažėjo 1,6 (RUUHOLA, YANG, 2006), žimio lapuose – 0,5 karto (kontrolės atžvilgiu) (ITURBE-ORMAETXE et. al., 1998). Parakvatas, žinomas oksidacinio streso skatintojas (APEL, HIRT, 2004), pasižymi aromatine struktūra, panašia į tas, kurios aptinkamos ir lapų ekstraktuose. Žymiai mažėjo katalazės aktyvumas valgomajame

ararchyje (*Arachis hypogaea* L.), paveikus jį salicilo rūgštimi bei herbicidais flumioksacinu ir imakapiku (SHAIKH et. al., 2006).

ROS yra ypač aktyvios ir nestabilios cheminės struktūros, kurios ląstelėse reaguoja su baltymais, nukleorūgštimis, karbohidratais ir lipidais. Šis veiksnys dažnai lemia lipidų peroksidaciją. Vienas galutinių lipidų peroksidacijos produktų yra malondialdehididas (MDA), dažnai naudojamas kaip šio proceso biologinis žymuo (NOWAK, JANCZAK, 2006). Mūsų tyrimo rezultatai neatskleidė žymaus MDA lygio didėjimo lapų ekstraktais paveiktose *N. obtusa* ląstelėse. Galima manyti, kad taip yra dėl ankstyvo ir pakankamai efektyvaus detoksikacijos mechanizmų veikimo, įrodomo padidėjusiu GST, GR ir iš dalies KAT aktyvumu. Šie antioksidaciniai fermentai skatina ROS šalinimą ir tokiu būdu išvengiama ląstelės dalių pažeidimo bei lipidų peroksidacijos (YANG et al., 2003).

Siekdami įvertinti oksidacinio streso fermentų aktyvumo pokyčių laikines charakteristikas, *N. obtusa* ląsteles eksponavome *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktuose nuo 15 min. iki 24 val., esant 1,1 ir 2,45 mg L<sup>-1</sup> IOA, atitinkamai, nes daugeliu atvejų žymus poveikis buvo nustatytas būtent paveikus šiomis koncentracijomis.

Biotransformacijos II-os fazės fermentas citozolinė glutatono S-transferazė po 15 min. ekspozicijos *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktais jau buvo statistiškai patikimai aktyvuotas. *F. sylvatica* ekstraktas greičiau (po 1 val.) padidino GR aktyvumą, palyginti su *Q. robur* ekstraktu (po 4 val.). mGST aktyvumas veikiamose *F. sylvatica* ekstraktu *N. obtusa* ląstelėse pastebimai mažėjo per laikotarpį nuo 1 iki 4 val., nors vėliau, po 24 val., grįžo iki kontrolinės reikšmės. Kaip nustatyta ankstesniu tyrimu (KAMARA, PFLUGMACHER, 2007), mGST aktyvumas *C. demersum*, veikiamame paprastosios nendrės (*Phragmites australis* (cav.) Trin. ex Steud) ir *Q. robur* ekstraktais ilgesnį laiką (48 val. ir 168 val.), po pradinio aktyvavimo grįžo iki kontrolinės reikšmės, taigi augalai geba prisitaikyti prie lapų ekstraktų sukulto oksidacinio streso. Palyginę antioksidacinės sistemos fermentų (cGST, KAT, GR) atsako laikines charakteristikas, galime manyti, kad *N. obtusa* yra jautresnis *F. sylvatica* lapų nei *Q. robur* ekstraktui. Taigi, *F. sylvatica* ekstraktas gali sukelti ankstesnę GSH *de novo* biosintezę, kuri dalyvauja daugelyje biocheminių reakcijų, taip pat ir tiesiogiai detoksikuojant streso metu susidarantių ksenobiotikų (RENNENBERG, 1982, NOCTOR et al., 1998).

Norėdami priartinti eksperimentus prie natūralių aplinkos sąlygų, naudojome per 30 dienų yrančių *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų paklotės ekstraktus (LPIE). *N. obtusa*

laštelės eksponuodami 2 val. *F. sylvatica* ir *Q. robur* paklotės lapų ekstraktuose stebėjome daugiau negu dvigubai padidėjusį cGST aktyvumą. Panašus statistiškai patikimas cGST didėjimas aptiktas *C. demersum* ir mažosios plūdenos (*Lemna minor* L.) augaluose, 24 val. veikiamuose dirbtiniais *Q. robur* ir *P. australis* ekstraktais (0,1–100 mg L<sup>-1</sup> IOA) (KAMARA, PFLUGMACHER, 2007; KAMARA, 2008). Mūsų tyrime stebėjome žymų *N. obtusa* ląstelių, paveiktų 14-os dienų *F. sylvatica* ir *Q. robur* LPIE, GR aktyvumo pakilimą. Savo eksperimentuose nenustatėme žymių KAT aktyvumo pokyčių dumblio ląstelėse, veikiamose abiejų rūšių lapų paklotės, irusios nuo 1 iki 30 dienų, ekstraktais, palyginti su tuo pačiu metu vykdytu kontroliniu matavimu. Panašus rezultatas gautas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kiekį išmatavus ląstelėse, veikiamose LPIE, – jis silpnai priklausė nuo lapų paklotės irimo laiko. Vis dėlto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentracija per pirmąsias 7 *F. sylvatica* ir 15 *Q. robur* lapų paklotės irimo dienas statistiškai patikimai mažėjo, todėl galima manyti, kad ši nedidelė H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kiekio neigiama slinktis buvo dėl LPIE sukulto SOD aktyvumo mažėjimo. Ši prielaida remiama ankstesnio tyrimo rezultatais (GRIGUTYTĖ et al., 2009), kai SOD aktyvumas *N. obtusa* ląstelėse, eksponuotose *Q. robur* dirbtiniame lapų ekstrakto, buvo labai slopinamas IOA koncentracijoms viršijus 100 mg L<sup>-1</sup> (šiam tyrimo IOA kito nuo 95–166 ir 86–177 mg L<sup>-1</sup>, atitinkamai, *F. sylvatica* ir *Q. robur* LPIE). Be to, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gamybos nedidėjimas dėl lapų paklotės irimo ekstraktų poveikio, galėjo būti susijęs ir su antioksidantų kiekiu didėjimu ląstelėje.

Apibendrinant oksidacinio streso fermentų atsaką galima teigti, kad *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktai sukėlė oksidacinį stresą *N. obtusa* ląstelėse ir turėjo įtakos detoksikacijos fermentų SOD, KAT, GST ir GR aktyvumo pokyčiams. Nustatyta, kad nedidelių IOA koncentracijų lapų ekstraktai, kurios paprastai aptinkamos ežeruose, jau gali sukelti *N. obtusa* ląstelėse oksidacinį stresą. Lietuvos gėlavandeniuose ežeruose, kuriuose veši *N. obtusa* sąžalynai, IOA koncentracija įvairuoja nuo 7 iki 21 mg L<sup>-1</sup>. Esant didesnei koncentracijai, pavyzdžiui, Žuvinto ežere (20,4 mg L<sup>-1</sup>), *N. obtusa* per pastaruosius 30 metų beveik išnyko, nors anksčiau gausiai augdavo. Pademonstravome, kad tam tikrais atvejais, esant didesnėms IOA koncentracijoms, fermentų aktyvumas mažėjo. Tai rodo didelį, net slopinamąjį ekstraktų poveikį *N. obtusa* antioksidaciniams gebėjimams. Kadangi, fermentinis atsakas per pirmąsias 24 poveikio valandas ženkliai skiriasi nuo oksidacinio streso fermentų aktyvumo normaliomis sąlygomis, galima įtarti, kad *N. obtusa* antioksidacinė sistema yra suaktyvinama tiek, kad panaikintų ar



minimizuotų oksidacinio streso žalą. Apie tokią, pakankamai efektyvią šių dumblių antioksidacinę sistemą, liudija ir tai, kad žymaus poveikio lipidų peroksidacijai lapų ekstraktais paveiktose dumblių ląstelėse nepastebėta. Apskritai *N. obtusa* antioksidacinė sistema, malšinant *F. sylvatica* lapų ekstrakto sukeltą stresą, pradėdavo reaguoti ir sukeldavo didesnius fermentų aktyvumo pokyčius, negu *Q. robur* atveju. Antioksidacinio streso fermentų aktyvumai pasižymi tendencija mažėti iki kontrolinio lygio ekspozicijos pabaigoje – taip atsiskleidžia *N. obtusa* antioksidacinių galimybių ribos. Kaip žinoma, fenoliniai junginiai, kurie kaip tirpūs organiniai junginiai išskiriami į vandenį lapams yrant jau per pirmąsias 48 val. (POPE et al., 1999), todėl jie galėjo būti žymaus cGST ir GR aktyvumo didėjimo *N. obtusa* priežastimi. Taigi, šis tyrimas parodė, kad *N. obtusa* ląstelių antioksidacinė sistema aktyvuojama, kai šis dumblis kontaktuoja su tirtaisiais paklotės lapų ar jų irimo ekstraktais.

Tirdami lapų ekstraktų poveikį aukštesniame nei fermentinis homeostazės palaikymo lygmenyje, augalinės ląstelės membranos transporto elektrocheminio reguliavimo lygmenyje, nustatėme, kad *N. obtusa* ląstelių, elektrofiziologinė reakcija pasižymi sparčiai (15–30 min.) nuo koncentracijos priklausančia RP depoliarizacija, kuri buvo santykinai stabili 24 val. *Q. robur* ir bent 3–4 val. *F. sylvatica* ekstraktuose. Eksperimento sąlygomis matuoto ląstelių RP vidurkis kontroliniame tirpale buvo lygus  $-220 \pm 5$  mV (vidurkis  $\pm$  sn, n=244), kas atitinka vieną iš plazmolemos funkcinių būsenų, vadinamąją P-būseną, kai membranos potencialo daryboje dominuoja elektrogeniniai siurbliai (žr. MIMURA, 1995). Žinoma, kad *N. obtusa* ląstelėse tokio absoliutaus dydžio membranos potencialų skirtumas atspindi metabolinę komponentę, susijusią su H<sup>+</sup>-siurblio, kurio funkciją menturdumbliuose atlieka K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-specifinė H<sup>+</sup>-ATPazė, darbu (MIMURA, 1995). Ekotoksikologiniais tyrimais parodyta, kad veikiant cheminiais stresoriais *N. obtusa* ląstelių depoliarizacija tampriai siejasi tiek su K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPazės inhibavimu, tiek ir vėliau stebima ląstelės žūtimi (MANUSADŽIANAS et al., 2002, 2007). Tokiu būdu, membranos bioelektrinių parametrų pokyčiai yra svarbus neigiamo poveikio ląstelės homeostazei indikatorius. Mūsų rezultatai rodo, kad eksponuojant *N. obtusa* ląsteles *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktais gaunami skirtingi elektrofiziologiniai atsakai, vieni grįžtamieji, kiti ne. Grįžtamumas buvo stebimas jau poveikio metu, esant mažoms abiejų ekstraktų koncentracijoms. Ši tendencija buvo dar ryškesnė atplauinant ląsteles po 90 min. poveikio. Visgi esant didelėms, viršijančioms gamtines,

koncentracijoms (770–1100 ir 1837 mg L<sup>-1</sup> IOA), liekamosios depoliarizacijos dydis liudija, jog buvo pažeisti elektrogeniniai siurbliai.

*N. obtusa* reakcijos į *Q. robur* ir *F. sylvatica* lapų ekstraktus buvo aptiktos skirtinguose biologinio organizuotumo lygmenyse. Jau po 15 min., reakcijos stebėtos fermentiniame lygmenyje, veikiant gamtiniams vandens telkiniams būdingomis IOA koncentracijomis. Ląstelių membranų depoliarizacijos reakcija į ekstraktus taip pat pastebėta po 15 min., bet poveikis pasireiškė tik didesnių (nuo 550 mg L<sup>-1</sup> IOA) koncentracijų atvejais. Ląstelių žūtį sukėlė panašių koncentracijų kaip ir elektrofiziologiniuose bandymuose lapų ekstraktai. Būtent didesnė nei 20 proc. RP depoliarizacija stebėta, esant didesnei nei 77 mg L<sup>-1</sup> *F. sylvatica* ekstraktų IOA koncentracijai, o tai koreliuoja su didesniu nei 20 proc. mirtingumu, esant 61 mg L<sup>-1</sup>.

Cheminio stresoriaus ekologinis reikšmingumas išgryninta forma atsiskleidžia tuomet, kai aplinkos sąlygos tampa nebepakenčiamos egzistuoti konkrečiai hidrobionto rūšiai. Mūsų tyrimo objekto atveju buvo žinoma, kad *N. obtusa*, būdami oligotrofinių gėlavandenių vandens telkinių indikatoriai, neauga ežeruose esant didesnei organinės anglies koncentracijai. Tyrimu pavyko parodyti, kad stebėti *F. sylvatica* ir *Q. robur* ekstraktų sukelti oksidacinio streso fermentų aktyvumo bei ląstelės membranos potencialo pakitimai siejasi su ląstelės mirtingumu, taip aptinkant galimą priežastinį ryšį tarp jautresnių ankstyvųjų reakcijų ir vėliau pasireiškiančio letalumo. Tuo pačiu buvo atskleista, kad paklotės lapai gali būti svarbus aplinkos veiksnys, turintis įtakos vandens augalijos įvairovei gėlavandenėse ekosistemose.

## IŠVADOS

1. *Q. robur* lapų 0,245–122,5 mg L<sup>-1</sup> IOA koncentracijų vandeniniai ekstraktai po 24 val. poveikio sukėlė statistiškai žymų kontrolės atžvilgiu mikrosominės (mGST) ir citozolinės glutationo S-transferazės (cGST), glutationo reduktazės (GR) bei glutationo peroksidazės (GPx) aktyvavimą *N. obtusa* ląstelėse visu tirtu koncentracijų intervalu. Kitų fermentų atvejais stebėti aktyvumų pakitimai: katalazė (KAT) aktyvuota esant 0,245 ir 2,45 mg L<sup>-1</sup> IOA, superoksido dismutazė (SOD) slopinta – tik esant didžiausiai 122,5 mg L<sup>-1</sup> IOA koncentracijai. Tiriant fermentų aktyvumo kinetiką per 24 val., kai buvo paveikta 2,45 mg L<sup>-1</sup> IOA koncentracija, stebėtas mGST aktyvumo sumažėjimas, cGST aktyvumo

padidėjimas, KAT aktyvumas žymiai nekito, o po 4 val. išryškėjęs GR aktyvumo padidėjimas išliko žymus iki ekspozicijos pabaigos.

2. *F. sylvatica* lapų vandeniniai ekstraktai po 24 val. poveikio pastebimai didino cGST aktyvumą, kai *N. obtusa* ląstelės buvo veikiamos 1,1, 5,5 ir 11,0 mg L<sup>-1</sup> IOA, tuo tarpu mGST aktyvuota tik 5,5 mg L<sup>-1</sup> IOA atveju. KAT aktyvuota esant 1,1 mg L<sup>-1</sup> IOA, tačiau koncentracijai didėjant nuo 5,5 iki 55 mg L<sup>-1</sup> IOA vyko jos slopinimas. Viso koncentracijų intervalo ekstraktais (0,11–55 mg L<sup>-1</sup> IOA) SOD ir GPx buvo slopinama, o GR stimuliuojama. Tiriant fermentų aktyvumo kinetiką per 24 val., kai veikta 1,1 mg L<sup>-1</sup> IOA *F. sylvatica* lapų ekstraktu, statistiškai patikimai kontrolės atžvilgiu buvo stimuliuojama cGST ir KAT bei po 1 val. – GR, tuo tarpu mGST atveju stebėtas šio fermento slopinimas, kai poveikio laikas kito nuo 1 iki 4 val.
3. Abu lapų ekstraktai – *Q. robur* (245–1838 mg L<sup>-1</sup> IOA) ir *F. sylvatica* (330–1100 mg L<sup>-1</sup> IOA) – jau po 15 min. ekspozicijos sukėlė *N. obtusa* ląstelės membranos depoliarizaciją, išlikusią 24 val. poveikio metu. Mažesnių, priskirtinų gamtiniams gėlavandeniams telkiniams, koncentracijų ekstraktai sukėlė taip pat žymias, bet adaptyvaus pobūdžio elektrofiziologines reakcijas. Atplaunant 1,5 val. dirbtine terpe, liekamoji depoliarizacija greičiau mažėjo ląstelėse, paveiktose *Q. robur* nei *F. sylvatica* lapų ekstraktais, o tai siejosi su *N. obtusa* letalumu – dumblių ląstelės išgyveno visų tirtų koncentracijų *F. sylvatica* ir *Q. robur* ekstraktuose 1 ir 2 dienas, atitinkamai. Apskritai *F. sylvatica* lapų ekstraktas buvo toksiškesnis negu *Q. robur*: 245 mg L<sup>-1</sup> IOA koncentracijos *F. sylvatica* lapų ekstraktas sukėlė didesnę nei 50 proc. ląstelių žūtį po 4 dienų, o tokios pačios koncentracijos *Q. robur* lapų ekstraktas buvo netoksiškas.
4. *N. obtusa* ląstelių reakcijos į *Q. robur* ir *F. sylvatica* lapų ekstraktus aptiktos skirtinguose biologinio organizuotumo lygmenyse. *F. sylvatica* ir *Q. robur* lapų ekstraktų sukeltus oksidacinio streso fermentų aktyvumo bei ląstelės membranos potencialo pakitimus vėliau sekė ląstelių žūtis – taip preziumuojamas priežastinis ryšys tarp jautresnių ankstyvųjų reakcijų ir letalumo. Tirtų lapų paklotės 30-ies dienų savaiminio irimo ekstraktai taip pat sukėlė oksidacinio streso fermentų aktyvumo moduliaciją. Tai leidžia manyti, kad paklotės lapai gali būti svarbus

aplinkos veiksnys, turintis įtakos vandens augalijos rūšinei įvairovei gėlavandenėse ekosistemose.

### PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. Steinberg C.E.W., Manusadžianas L., **Grigutyte R.**, Karitonas R., Jurkonienė S., Pflugmacher S., 2004: Membrane depolarization and elevation of ROS–defensive mechanisms due to the impact of dissolved natural organic matter (NOM) in the charophyte *Nitellopsis obtusa*. Humic Substances and Soil and Water Environment. ISBN 85–86463–12–4. Martin–Neto, L, Milori, D.M.B., Lopes da Silva, W.T. (eds). Proc. XII Intern. Meeting of IHSS, São Pedro, São Paulo, Brazil, July 25–30, Embrapa Instrumentação Agropecuária, p.135–137.
2. Manusadžianas L., Steinberg C.E.W., **Grigutyte R.**, Jurkonienė S., Karitonas R., Pflugmacher S., 2005: Effects of humic substances on charophyte *Nitellopsis obtusa* at the stress enzyme, cell membrane and cellular endpoints – 12<sup>th</sup> International Symposium on Toxicity Assessment, Skiathos, Greece, 12–17 June 2005 – Proceedings. Ed. A.Kungolos. P.73. ISBN 960–99067–6–3.4.
3. **Grigutyte R.**, Nimptsch J., Manusadžianas L., Pflugmacher S., 2008: Effects of decomposing leaf litter from *F. sylvatica* and *Q. robur* of different degradation levels on oxidative stress response in the charophyte *Nitellopsis obtusa*. Botanica Lithuanica, **14(4)**: 233–240.
4. **Grigutyte R.**, Nimptsch J., Manusadžianas L., Pflugmacher S., 2009: Response of oxidative stress enzymes in charophyte *Nitellopsis obtusa* exposed to allochthonous leaf extracts from beech *Fagus sylvatica*. – Biologija, **55 (3–4)**: 142–149.

### KONFERENCIJŲ PRANEŠIMAI

1. **Grigutyte R.**, Manusadžianas L., Pflugmacher S.: Promotion of oxidative stress response in *Nitellopsis obtusa* during exposure to leaf extract from oak and beech. 10th Society of Environmental Toxicology and Chemistry (10 SETAC), Basel, Switzerland, 28–30 September 2005, German Language Branch.
2. Manusadžianas L., **Grigutyte R.**, R.Karitonas R., Sadauskas K., Vitkus R.: Combining of exposure and recovery parameters in charophyte cell response as an

approach to reveal remote toxic effects. III-oji Tarptautinė Metaloekologu konferencija: Metalai aplinkoje, Vilnius, 2006.

3. **Grigutytė R.**, Manusadžianas L., Pflugmacher S.: Promotion of oxidative stress response in *Nitellopsis obtusa* during exposure to leaf extract from oak and beech. SETAC Europe 16th Annual Meeting, The Hague, The Netherlands, 7–11 May 2006.
4. **Grigutytė R.**, Pflugmacher S., Manusadžianas L.: Electrophysiological and survival responses of the charophyte cell of *Nitellopsis obtusa* during prolonged exposure to leaf extract from oak *Quercus robur*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Leipzig, Germany, 12–14 September 2007, German–Language–Branch.
5. Manusadžianas L., **Grigutytė R.**, Pflugmacher S.: The impact of oak and beech leaf extracts on freshwater charophyte cell *Nitellopsis obtusa*. International Symposium on Green Chemistry for Environment and Health, Munchen, Germany, 13–16 October 2008.

## PADĖKA

Nuoširdžiausiai dėkoju darbo moksliniam vadovui *dr. Levonui Manusadžianui* už dėmesį, palaikymą ir neįkainojamus patarimus, diskusijas ir pagalbą rengiant daktaro disertaciją. Dėkoju darbo moksliniam konsultantui *PD. dr. Stephanui Pflugmacheriui* už patarimus ir vadovaviną biocheminiams tyrimams. Taip pat nuoširdžiausią ačiū tariau *dr. Jorge Nimptschui* už naudingas pamokas laboratorijoje, vertingas pastabas rengiant publikacijas bei pagalbą statistiškai analizuojant duomenis. Dėkoju *prof. Claudia'jai Wiegand* ir *dr. Jan Peter Lay'ui* už nuolatinę paramą bei skatinimą doktorantūros studijų metu.

Dėkoju visos biocheminių reguliavimų ir hidrobotanikos laboratorijos kolegoms, ypač *dr. Sheku Kamarai*, *dr. Anjai Peuthert*, *dr. Rolandui Karitonui*, *dr. Valeskai Contardo*, *Violai Viehmann*, *Julijai Stefanovič*, *Irmaiti Vitonytei*, *dr. Jūratei Karosienei*, *dr. Jūratei Kasperovičienei*, *dr. Juditai Koreivienei* už patarimus, diskusijas, pagalbą ir malonią bei jaukią aplinką laboratorijose. Taip pat dėkoju *dr. Sigutei Jurkonienei*, *dr. Kazii Sadauskui* už mokslinius patarimus ir moralinį palaikymą. Labai dėkoju savo šeimai – ypač tėvams, gyvenimo draugui *Tomui* bei jo šeimai. Draugams, ypač *Ingai* ir *Donatui Antanevičiams*, *Agnei Stonkutei*, *Lurai Steponienei* už jų kantrybę, pagalbą, supratimą, rūpestį ir paramą. Darbas buvo atliktas Gamtos tyrimų centro Botanikos

institute ir Leibnico instituto gėlųjų vandenų ir gėlavandenių žuvų institute. Darbą rėmė Vokietijos Bundesstiftung Umwelt (DBU) ir Lietuvos mokslo ir studijų fondai.

## CURRICULUM VITAE

**Vardas, pavardė** Reda Grigutytė  
**Gimimo metai, vieta** 1979 m. gruodžio 29 d., Skuodo r.  
**Adresas** Gamtos tyrimų centro Botanikos institutas, Žaliųjų ežerų g. 49, LT-08406 Vilnius, [reda\\_grigutyte@yahoo.com](mailto:reda_grigutyte@yahoo.com)

### Išsilavinimas

1998 09–2002 06 Vilniaus universiteto Chemijos fakultetas, Biochemijos bakalauro laipsnis  
2002 09–2004 06 Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakultetas, Mikrobiologijos magistro laipsnis  
2005 10–2009 09 Gamtos tyrimų centro Botanikos institutas, Vandens toksikologijos sektorius, Botanikos krypties doktorantūros studijos

### Darbo patirtis ir mokslo interesų sritys

2001 02–2003 04 VĮ „Advanced Pharma Algorithms“ duomenų analitikė.  
Darbo pobūdis Citochromų P 450 duomenų bazių formavimas, cheminių medžiagų poveikio matematinis numatymas, farmacijos mokslinių straipsnių analizė; Atliktas bakalauro darbas „Citochromo CYP1A2 specifiškumo tyrimas“.  
2002 11–2005 10 Botanikos instituto Vandens toksikologijos sektoriaus magistrantė, vyr. laborantė.  
Darbo pobūdis Humusinių medžiagų poveikio *Nitellopsis obtusa* ląstelei, ląstelės membranai ir fermentinėms sistemoms tyrimas.  
2004 03–2004 04 Stažuotė Leibnico gėlųjų vandenų ir gėlavandenių žuvų institute (Berlynas, Vokietija).  
Darbo pobūdis Humusinių medžiagų poveikio *Nitellopsis obtusa* ląstelės fermentinėms sistemoms tyrimas, pagal magistro darbo temą.  
2005 10–2009 09 Botanikos instituto Vandens toksikologijos sektoriaus doktorantė.

Darbo pobūdis	Lapų ekstraktų poveikio <i>Nitellopsis obtusa</i> ląstelėms elektrofiziologiniai tyrimai
2005 02–2008 01	Stažuotė Leibnico gėlių vandenių ir gėlavandenių žuvų instituto Biocheminio reguliavimo laboratorijoje (Berlynas, Vokietija) pagal Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU) stipendija.
Darbo pobūdis	Lapų ekstraktų poveikio <i>Nitellopsis obtusa</i> ląstelės fermentinėms sistemoms tyrimas.
2009 10–ir dabar	Gamtos tyrimų centro Botanikos instituto Hidrobotanikos laboratorijos jaunesnioji mokslo darbuotoja.
Darbo pobūdis	Nanodalelių toksinio poveikio <i>Nitellopsis obtusa</i> ląstelei tyrimas.

## SUMMARY

Lake ecosystems experience various influences from terrestrial surroundings. One of these includes the input of natural organic material (NOM) originated from leaves falling into the water body (GRIMM et al., 2003). The leaves then degrade in different steps, beginning with macro-organisms and ending with micro-organisms (BESS, 2005). Chemistry of aquatic environment partially depends on the decomposition of foliar litter and coarse woody debris as a source of dissolved organic carbon (DOC), e.g. for the foundation of aquatic food webs (SCHLESINGER, 1997).

The structural and chemical attributes of leaves can vary dramatically among species (CHAUVET, 1987; OSTROFSKY, 1997), so their breakdown may be related to the number and type of chemically unique species present in the matrix. Particulate detritus interacts with the biotic, i.e., bacteria, fungi, invertebrates (CUMMINS et al., 1989) and abiotic, i.e., temperature, water flow, soil/water chemistry (ALLARD, MOREAU, 1986; WEBSTER, BENFIELD, 1986) components of ecosystems and thus regulates the rate of breakdown. Decomposition of leaf litter has great influence on biochemical nutrient cycling, also, in all surface waters, interacts with aquatic macrophytes and is able to produce reactive oxygen species (PFLUGMACHER et al., 1999).

During leaf degradation, many water-soluble chemical compounds are released into the water, which may influence aquatic organisms. A part of these compounds are quinoid structures, capable of generating reactive oxygen species (ROS) and influence, for instance, photosynthesis of aquatic plants by capturing electrons from the

plastoquinone chain between photosystem II and photosystem I (BULYCHEV, 2001). Enhanced production of ROS (e.g.  $O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  and  $HO^{\cdot}$ ) destroys their tiny balance in the cell. To prevent cellular damage caused by these ROS, cells have developed a protective system involving antioxidative enzymes, including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR), etc. The enzymes take part in different phases of ROS elimination. The function of SOD is to dismutate two superoxide anion radicals into oxygen and hydrogen peroxide, while CAT reduces hydrogen peroxide to water. GR is a part of an oxido-reduction cycle involving glutathione and ascorbate (APEL, HIRT, 2004; NOCTOR et al., 2002). GR catalyses the reduction of glutathione disulfide (GSSG) in a NADPH-dependent reaction to glutathione (GSH) and, therefore, plays a pivotal role in protection against oxidative damage and in adjustment processes of metabolic pathways (like redox homeostasis) (FOYER, NOCTOR, 2005). Beside the biotransformation of exogenous xenobiotics, the glutathione S-transferase plays an important role in detoxifying endogenous toxic lipid peroxidation products (AWASTHI et al., 2004).

Recently, the first studies on leaf litter induced oxidative stress in aquatic plants have been introduced. NIMPTSCH and PFLUGMACHER (2008) showed that leaf litter degradation extracts from common oak (*Quercus robur* L.), European beech (*Fagus sylvatica* L.), and mixed *Q. robur* and *F. sylvatica* leaves had deleterious effects on the physiology of *Vesicularia dubyana* (C. Muell.) C. Muell., expressed as decreasing photosynthetic activity and enhancing oxidative stress response. These findings suggest that leaf litter degradation extracts may be an important environmental factor influencing specific plant species and thus community structure within freshwater ecosystems. We investigated responses of the cell of starry stonewort (*Nitellopsis obtusa* (Desv.) J. Groves). *N. obtusa* represents multicellular macrophytic green algae, which belongs to *Charophyceae* class, *Nitellopsidaceae* family. The internodal cells of charophytes are intensively used for studies in electrophysiology (see MIMURA, 1995). The rapid depolarization of resting potential (RP) proved to be a relevant endpoint to assess chemicals and wastewater toxicity, and tight correlation between electrophysiological response (90-min 50%-depolarization of RP) and cell lethality (96-h  $LC_{50}$ ) induced by above chemical stressors has been shown (MANUSADŽIANAS et al., 1995; 2007). *N. obtusa* communities have a cosmopolitan distribution and are generally found in clear



and oligo- or mesotrophic waters (PYBUS et al., 2003). They are good indicators of clear and nutrient-poor water (RUTH, PALAVAGE, 1994).

The decomposition rate of leaf litter influenced by various ecological factors has been aptly investigated in terrestrial ecosystems (GESSNER, 2000; TIEGS et al., 2008), however, the potential effects of the decomposition products for aquatic biota have not received parallel attention.

**General idea of the study.** By linking lake and lake shore ecosystems and in accordance with the fact that leaf litter decomposition products are an additional source of allochthonous dissolved organic carbon, we sought to evaluate the impact of *F. sylvatica* and *Q. robur* leaf litter extracts on algae *N. obtusa* cell.

**Objectives of the study:**

1. To prove the fact that *N. obtusa* exposed to leaf litter extracts experiences oxidative stress, by evaluating activities of the enzymes such as GST, CAT, GR, GPx and SOD, total antioxidant status of the cells, lipid peroxidation and changes of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration.
2. To explore the effects of *F. sylvatica* and *Q. robur* leaf litter extracts on *N. obtusa* cell membrane resting potential and its lethality.
3. To investigate the influence of *F. sylvatica* and *Q. robur* leaf litter degradation extracts obtained during 30-day decomposition on oxidative stress enzymes such as GST, CAT and GR, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in algae *N. obtusa*.

**Defensive statements:**

1. Leaf extracts from *F. sylvatica* and *Q. robur* induced dose- and time-dependent oxidative stress-like response of enzymes in *N. obtusa*. Detoxification reactions were expressed by changes in enzyme activities due to cleavage of reactive oxygen species. Analogous changes in enzymes activity occurred in experiments imitating natural conditions, when algae cells were affected by extracts from self-decomposing leaf litter.
2. Both leaf extracts, *Q. robur* (245 – 1838 mg L<sup>-1</sup> DOC) and *F. sylvatica* (330–1100 mg L<sup>-1</sup> DOC) induced fast depolarization of cell membrane resting potential after 15-min exposure, which was permanent till the end of 24 h exposure. At lower concentrations typical to natural freshwater bodies, they invoked adaptive electrophysiological reactions.

3. Reactions of charophytic algae *N. obtusa* to *Q. robur* and *F. sylvatica* leaf extracts were detected at different biological levels. Relatively more sensitive reactions were detected at enzymatic level, however, to identify irreversible cell resting potential changes and lethality, higher than those of natural aquatic bodies DOC concentrations or prolonged exposure were needed.

**Novelty and significance of the study:**

1. An antioxidative status of charophyte *N. obtusa* cell exposed to *F. sylvatica* and *Q. robur* leaf extracts and to obtained during 30 days extracts of decomposing *Q. robur* and *F. sylvatica* leaves was investigated for the first time.
2. The responses of charophyte *N. obtusa* to *F. sylvatica* and *Q. robur* leaf litter extracts at different biological levels – cell, cell membrane (plasmalemma) and oxidative stress enzymes was investigated for the first time.

**Presentation of the results.** The obtained research data were presented in 4 scientific papers published in peer-reviewed scientific journals. The investigation results were presented at 5 international conferences.

**Volume and the structure of the dissertation:**

The doctoral dissertation is written in English and includes List of abbreviations, Introduction, Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References (139 citations), Research articles and congress presentations. The dissertation is illustrated with 43 figures, 2 tables. Volume of dissertation is 93 pages.

## CONCLUSIONS

*Q. robur* leaf water-extracts induced statistically significant elevation of cytosolic (sGST) and microsomal glutathione S-transferase (mGST), glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPx) activities in *N. obtusa* cells at all tested DOC concentrations (from 0.245 to 122.5 mg L<sup>-1</sup> DOC, 24 h exposure). The activity of catalase (CAT) increased at 0.245 and 2.45 mg L<sup>-1</sup> DOC, and SOD was inhibited only at the highest tested DOC concentrations. Time-dependent exposure during 24 h to the extract at 2.45 mg L<sup>-1</sup> DOC revealed a decrease in mGST, increase in sGST and the lack of changes for CAT activities. A significant increase in GR activity was detected after 4 h and lasted until the end of 24 h exposure.

*F. sylvatica* leaf water-extracts induced significant increase in sGST activity in algal cells exposed for 24 h to 1.1, 5.5 and 11.0 mg L<sup>-1</sup> DOC, while mGST was activated only at 5.5 mg L<sup>-1</sup> DOC. The activity of CAT increased at 1.1 mg L<sup>-1</sup> DOC, however its inhibition was observed as the concentration increased from 5.5 to 55 mg L<sup>-1</sup> DOC. The activities of SOD and GPx were decreased and GR increased at all DOC concentrations tested (0.11-55 mg L<sup>-1</sup> DOC). Time-dependent exposure during 24 h to the extract at 1.1 mg L<sup>-1</sup> DOC showed a significant increase in sGST and CAT, as well as GR, however, 1 h later. In case of mGST, inhibition of the enzyme was evident within 1 to 4 h.

Both leaf extracts – *Q. robur* (245 – 1838 mg L<sup>-1</sup> DOC) and *F. sylvatica* (330–1100 mg L<sup>-1</sup> DOC) – induced a fast depolarization of cell membrane of *N. obtusa* already after 15 min exposure, which was evident up to the end of 24 h exposure. The extracts characterized by the DOC concentrations attributive to natural freshwater bodies induced similar fast depolarization of RP, however, electrophysiological reactions demonstrated adaptive response character. A better recovery from *Q. robur* than of *F. sylvatica* leaf extracts within a 1.5 h in control solution was observed and it was related with the mortality of *N. obtusa* cells – they were able to survive for 1 and 2 days in *F. sylvatica* and *Q. robur* leaf extracts, respectively. In general, *F. sylvatica* leaf extract was more toxic than *Q. robur*: at 245 mg L<sup>-1</sup> DOC, larger than 50 % mortality was reached after 4-day exposure in *F. sylvatica* leaf extract, while the same concentration of *Q. robur* leaf extract was non-toxic.

Responses of algae *N. obtusa* to *Q. robur* and *F. sylvatica* leaf extracts were detected at different biological levels. Changes in activities of oxidative stress enzymes and cell membrane potential invoked by leaf extracts predicted cell mortality, which allows us to presume causality between more sensitive initial reactions and lethality. Leaf litter degradation extracts obtained from *Q. robur* and *F. sylvatica* leaves during 30 days of their decomposing enhanced oxidative stress response in *N. obtusa* cell, too. These findings suggest that leaf litter might be an important environmental factor impacting aquatic vegetation species diversity in freshwater ecosystems.