

VYUŽITÍ METODY ORAC PRO STANOVENÍ RELATIVNÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY ROSTLINNÝCH EXTRAKTŮ

Ferretti Ursula¹

¹Katedra fyziky, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, Chittussiho 10, Slezská Ostrava, 710 00, +420 605 001 561, ursula.ferretti@gmail.com

Abstrakt

Abiotické faktory prostředí mohou způsobovat v rostlinách nadměrnou produkci aktivních forem kyslíku a dusíku (AFK/D). Rostliny se proti AFK/D brání antioxidačními ochrannými systémy a pokud tyto selžou, dochází ke vzniku oxidativního stresu. Tato práce se zabývá fluorimetrickým stanovením a porovnáním antioxidační aktivity extraktů z listů ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L. cv. Bonus), vypěstovaného při nízké (LI – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a vysoké (HI – 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) ozáření. Byla zavedena a zkalibrována metoda ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity), s jejíž pomocí je možné stanovit relativní antioxidační aktivitu rostlin *in-vitro*. Kalibrace byla provedena pomocí standardu Trolox. Z výsledků je patrné, že antioxidační aktivita LI a HI rostlin se liší. Byla stanovena průměrná koncentrace Troloxu, která by měla ekvivalentní antioxidační aktivitu jako měřený vzorek a při které by došlo ke stejnému poklesu intenzity fluorescence listových extraktů u LI ($c = 39,298 \mu\text{M}$) i u HI ($c = 44,123 \mu\text{M}$) rostlin.

Klíčová slova: Aktivní formy kyslíku a dusíku (AFK/D), antioxidační ochranné systémy, oxidativní stres, ORAC, Trolox

Úvod

Hlavními původci stresu u rostlin jsou faktory prostředí, které často způsobují narušení normálních životních funkcí rostlin a mohou zapříčinit i jejich smrt. [1, 2, 3] Jedním z těchto faktorů je např. vysoká ozáření (HI), která může zapříčinit nadměrnou produkci oxidantů, tzv. aktivních forem kyslíku a dusíku (AFK/D). AFK/D jsou i za normálních podmínek v rostlinách vytvářeny neustále. Mohou mít významný vliv při destrukčních procesech, ale jsou také podstatnou součástí signálních drah rostlinného organismu. [2, 4]

Aby rostlina mohla udržet hladinu AFK/D v normě, využívá enzymatických či nízkomolekulárních antioxidačních ochranných systémů. Pokud se poruší rovnováha mezi množstvím AFK/D a účinností antioxidačních systémů, dojde ke vzniku oxidativního stresu. [1, 2, 4] Tento vede k poškození buněčných struktur a může vést i k jejich nevratnému poškození. [2]

V této práci se zabýváme experimentem, který umožňuje zavedení a kalibraci metody ORAC. Jejím principem je sledování úbytku signálu fluorescenční sondy (fluorescein), jež je zhasena působením radikálů, generovaných za pomoci azo-iniciátoru (AAPH). V přítomnosti antioxidantů dochází ke zhasení fluorescence sondy (fluoresceinu) – dochází tedy ke kompetici antioxidantů s molekulami fluorescenční sondy o molekuly AFK/D. K vyhodnocení výsledků se využívá AUC (Area Under Curve/Plocha pod křivkou). [2, 5]

Materiál a metody

Jako rostlinného materiálu bylo použito ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L. cv. Bonus). Ten byl vypěstován za kontrolovaných podmínek v růstových komorách. Zde byl ponechán po dobu 8 dní, kdy byly rostliny vystaveny světlu 16 h denně. LI rostliny byly v průběhu růstu

vystaveny ozáření 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ FAR, zatímco HI rostliny byly vystaveny ozáření 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ FAR. Teplota vzduchu v komorách byla 20 °C a relativní vlhkost vzduchu byla přibližně 65%. Osmý den byly tyto rostliny odebrány z růstových komor a následně ze středních segmentů listů bylo naváženo 6 vzorků po 100 mg. Z těchto vzorků byly postupně připravovány extrakty ve vybraném rozpouštědle tj. 40% metanolu. Do třecí misky byl nastříhán vzorek ječmene, k němu byla přidána špetka mořského písku a malé množství rozpouštědla. Lístky byly následně tloučkem rovnoměrně třeňy, dokud nebyl získán tekutý extrakt. Tento byl pak přelit do centrifugační zkumavky – třecí miska i s tloučkem byla pomocí pipety promyta rozpouštědlem. Zkumavka se vzorkem byla ultrasonifikována za pomoci ultrazvuku (Ultrasonic Compactcleaner UC 006 DM1, Tesla, ČR) po dobu 5 minut a následně byla provedena 3 minutová centrifugace při 6000 otáčkách/min na centrifuze (EBA 20, Hettich Zentrifugen, Německo). Vzniklý supernatant byl opatrně přelit do odměrné zkumavky a doplněn na objem 3 ml. Z koncentrovaného extraktu byl odebrán 1 ml do další odměrné zkumavky a tento byl doplněn na objem 4 ml.

Pro přípravu fosfátového pufru (PBS) o pH = 7,4 a koncentraci 75 mM bylo použito hydrogenufosforečnanu draselného (K_2HPO_4 , $M_r = 174,18$ g/mol, Sigma-Aldrich, Španělsko) a dihydrogenufosforečnanu sodného (NaH_2PO_4 , $M_r = 119,98$ g/mol, Riedel-de Haën AG, Německo), obě složky byly připraveny v koncentraci 75 mM. K vytvoření zásobního roztoku fluoresceinu bylo naváženo 0,044 g fluoresceinu ($\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_5$, $M_r = 332,31$ g/mol, Sigma-Aldrich, Japonsko). Tento byl rozpuštěn ve 100 ml PBS a uložen v chladu. Ze zásobního roztoku fluoresceinu byl denně připravován pracovní roztok o koncentraci 0,78 nM. Roztok vybraného iniciátoru peroxylových radikálů AAPH (2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dehydrochloride), ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{H}_8\cdot 2\text{HCl}$, $M_r = 271,19$ g/mol, Sigma-Aldrich, USA), byl připraven rozpuštěním 0,6 g (AAPH) v 10 ml PBS. Jeho konečná koncentrace tedy byla 221 mM. Dále bylo v plastové kyvetě smícháno 1,5 ml vzniklého 0,78 nM pracovního roztoku fluoresceinu s 1,5 ml buď PBS (blank), vzorku (extrakt) nebo standardu - Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman 2-dikarboxylové kyseliny), ($\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$, $M_r = 250,29$ g/mol, Sigma-Aldrich, Německo). Koncentrace zásobního roztoku Troloxu byla 1mM. Ředěním tohoto zásobního roztoku Troloxu byly připraveny koncentrační řady pro křivku TEAC.

Pomocí termostatu s čerpadlem (ILABO spol. s.r.o., ČR) napojeného na spektrofluorimetr LS – 50B (Perkin – Elmer, Anglie) byl roztok zahříván na stálou teplotu 37 °C. Po ověření teploty měřeného vzorku v kyvetě (37 °C) pomocí přenosného teploměru, bylo napipetováno do kyvety 750 μl roztoku AAPH. Zaznamenání hodnoty fluorescence probíhalo každou 1 s a jako reakční čas byla vybrána hodnota $t = 1800$ s tedy 30 min. Pro kinetické měření fluorescence byla zvolena hodnota excitační vlnové délky 485 nm a emisní vlnová délka byla nastavena na 600 nm. Šířka štěrbin excitačního a emisního monochromátoru byla nastavena na 10 nm.

Ze získaných dat byla v programu Microsoft Excel vypočtena hodnota AUC (Area Under Curve), podle rovnice (1).

$$AUC = \left(1 + \frac{f_1}{f_0} + \frac{f_2}{f_0} + \frac{f_3}{f_0} \dots \frac{f_n}{f_0}\right), \quad (1)$$

kde f_0 je počáteční hodnota fluorescence a f_n je fluorescence v čase n . Z hodnot AUC byly vypočítány ΔAUC dle rovnice (2):

$$\Delta AUC = AUC_{Vz} - AUC_{Bl} \quad (2)$$

AUC_{Vz} – plocha pod křivkou daného vzorku

AUC_{Bl} – plocha pod křivkou blanku

Poté byl vytvořen graf závislosti ΔAUC na množství Troloxu, viz. Obr.1.A.

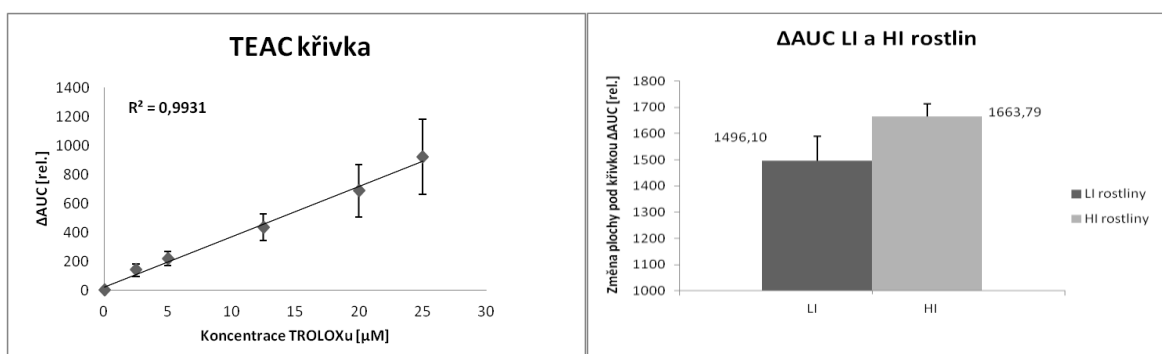
Výsledky a diskuse

Podle výše uvedeného postupu byla zavedena spektrofluorimetrická metoda ORAC. Využitím standardu Trolox (1mM) byla vytvořena kalibrační křivka TEAC, kde koncentrace Troloxu v měřeném roztoku byla 0 μM , 2,5 μM , 5 μM , 12,5 μM , 20 μM a 25 μM , viz. Obr.1.A. Metodou ORAC jsme tedy schopni určit, pomocí TEAC křivky, ekvivalentní množství Troloxu, které by mělo stejnou antioxidační aktivitu jako měřený vzorek a vyvolalo by tak stejný pokles intenzity fluorescence. Trolox ekvivalenty neboli Relativní Antioxidační Aktivity (RAA) byly vypočítány zpětně pro LI i HI rostliny z regresní rovnice uvedené v Obr.1.A. Hodnoty Trolox ekvivalentů pro LI a HI rostliny, viz. Tab.1.

Tabulka 1. Relativní antioxidační aktivita (Trolox ekvivalent) extraktů ze 3 vzorků LI a ze 3 vzorků HI rostlin, společně s průměrnou hodnotou těchto vzorků a SD.

Vzorky	LI	HI
vz1	39,27	44,85
vz2	41,55	44,82
vz3	37,08	42,71
průměr	39,3	44,13
SD	2,24	1,23

Dále byly vzájemně srovnány antioxidační účinky listových extraktů z ječmene jarního, vypěstovaného při nízké a vysoké ozáření. Na Obr.1.B je patrná vyšší relativní změna plochy pod křivkou (ΔAUC) u extraktů z rostlin pěstovaných při vysoké ozáření. Vyšší ΔAUC je dáno tím, že HI rostliny zřejmě obsahují větší množství antioxidačních látek než LI rostliny, jelikož vlivem vysokého ozáření dochází ke vzniku většího množství radikálů a rostlina se vyšší produkcí antioxidantů brání poškození.



Obrázek 1. A) TEAC křivka – závislost průměrné změny plochy pod křivkou [rel.] měřícího roztoku ORAC na koncentraci Troloxu [μM] ($n=3$, +SD), kdy trojice koncentračních řad Troloxu byla vytvořena ředěním ze stejného zásobního roztoku. **B)** Srovnání ΔAUC extraktů připravených z LI a HI rostlin pomocí průměrných změn ploch pod křivkou [rel.] ($n=3$,+SD).

Závěr

Byla zavedena, optimalizována a zkalibrována spektrofluorimetrická metoda ORAC. Kalibrace byla provedena pomocí standardu Trolox. Byl navržen ekofyziologický experiment zaměřený na antioxidační aktivitu extraktů z ječmene jarního (*Hordeum vulgare*, L. cv. Bonus) pod vlivem nízké (LI) a vysoké (HI) ozáření. Z výsledků byla patrná větší změna plochy pod křivkou (ΔAUC) pro rostliny pěstované při vysoké ozáření, což znamená, že mají i větší antioxidační aktivitu, než-li rostliny s nízkou ozářeností. Byly také stanoveny hodnoty Trolox ekvivalentů, které určují relativní antioxidační aktivitu rostlin.

Poděkování

Tato práce byla podpořena Ostravskou univerzitou v Ostravě (SGS/PřF/2013) a z projektu "Institut environmentálních technologií" reg.č. CZ.1.05/2.1.00/03.0100. Děkuji za cenné rady Mgr. Jakubu Nezvalovi. Dále bych chtěla poděkovat paní laborantce Běle Piskořové a Mgr. Michalu Štrochovi, Ph.D. za pomoc při práci s růstovými komorami.

Literatura

- [1] PITERKOVÁ, Jana, Kateřina TOMÁNKOVÁ, Lenka LUHOVÁ, Marek PETŘIVALSKÝ a Pavel PEČ. Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy*. 2005, č. 99, s. 455-466.
- [2] FERRETTI, Ursula. *Stanovení antioxidační aktivity rostlinných extraktů in-vitro*. Ostrava, 2012. Bakalářská práce. Ostravská Univerzita v Ostravě.
- [3] INZÉ, Dirk a Marc VAN MONTAGU. Oxidative stress in plants. *Current opinion in biotechnology*. 1995, č. 6, s. 153-158. ISSN 0958-1669.
- [4] IMPA, S.M. et al Drought Stress Induced Reactive Oxygen Species and Anti-oxidants in Plants. AHMAD, Parvaiz a M PRASAD. *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*. New York: Springer, c2012, s. 131-148. ISBN 978-1-4614-0634-1.
- [5] NAGUIB, Yousry M.A. A Fluorometric Method for Measurement of Oxygen Radical-Scavenging Activity of Water-Soluble Antioxidants. *Analytical Biochemistry*. 2000, roč. 284, č. 1, s. 93-98. ISSN 00032697. DOI: 10.1006/abio.2000.4691. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269700946918>

Abstract

Abiotic factors can cause excessive production of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) in plants. Plants prevent from RONS functioning due to antioxidant protective system. Moreover, if this protective antioxidant system is failing, the oxidative stress takes place. This work deals with fluorimetric determination and comparison of the antioxidant activity of leaf extracts from barley (*Hordeum vulgare*, L. cv. Bonus), grown at low (LI - 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and high (HI - 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) irradiation. Have been established and calibrated the method ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) for the determination of the relative antioxidant activity of plants *in-vitro*. The calibration was performed using the standard TROLOX. The results indicate that the antioxidant activity of LI and HI plants differs. It was determined the average concentration of Trolox with the same antioxidant activity as the measured sample and which would cause the same growth of fluorescence intensity of leaf extracts of LI ($c = 39,298 \mu\text{M}$) and HI ($c = 44,123 \mu\text{M}$) plants.

Key words: *Reactive oxygen and nitrogen species (RONS), antioxidant protective systems, oxidative stress, ORAC, Trolox*