

Биофенолы (*Olea europaea* L.): нутрицевтическое средство против окислительного стресса в клетках SH-SY5Y

Сайед Харис Омар , 1, 2, * Филип Г. Керр , 1, 2 Кристофер Дж. Скотт , 1, 2 Адам С. Хэмлин , 3 и Хасан К. Повиновались 1, 2

Аннотация

Было показано, что растительные биофенолы эффективны в модуляции патологии болезни Альцгеймера (БА), вызванной окислительным стрессом, вызванным свободными радикалами, и дисбалансом окислительно-восстановительной химии ионов переходных металлов (например, железа и меди). На основании ранее описанных фармакологических действий можно было ожидать, что биофенолы оливкового масла обладают антиальцгеймеровой активностью. В настоящем исследовании антиоксидантная активность отдельных биофенолов оливок (а именно кофейной кислоты, гидрокситирозола, олеуропеина, вербаскозида, кверцетина, рутина и лютеолина) оценивалась с использованием активности по улавливанию супероксидных радикалов (SOR), пероксида водорода (H_2O_2) активность поглощения и анализ способности плазмы к восстановлению железа (FRAP). Идентификационная и антиоксидантная активность четырех коммерческих экстрактов оливок - экстракта оливковых листьев TM (OLE), экстракта оливковых фруктов TM (OFE), Hydroxytyrosol Extreme TM (HTE) и Olivenol plus TM (OLP) - оценивалась с помощью онлайн-ВЭЖХ. -ABTS • + анализ и анализ ВЭЖХ-ДАД-МС. Олеуропеин и гидрокситирозол были преобладающими биофенолами во всех экстрактах. Среди отдельных исследованных соединений кверцетин (EC 50 : 93,97 мкМ) и вербаскозид (EC 50 : 0,66 мМ) были наиболее эффективными SOR и H_2O_2 мусорщики соответственно. Однако OLE и HTE были самыми высокими поглотителями SOR (EC 50 : 1,89 мкг / мл) и H_2O_2 (EC 50 : 115,8 мкг / мл) среди экстрактов биофенола. Нейрозащиту биофенолов оценивали против индуцированного H_2O_2 окислительного стресса и токсичности, вызванной медью (Cu), в клетках нейробластомы (SH-SY5Y). Самые высокие показатели нейрозащиты (98% и 92%) против токсичности, индуцированной H_2O_2 и Cu, продемонстрировал коммерческий экстракт HTE TM. За ними следовали отдельные биофенолы, кофейная кислота (77% и 64%) и вербаскозид (71% и 72%). Наши результаты предполагают, что оливковые биофенолы потенциально служат средством профилактики нейродегенеративных заболеваний, таких как БА, и других нейродегенеративных заболеваний, вызванных окислительным стрессом.

Ключевые слова: оливковые биофенолы, окислительный стресс, нейтрализация свободных радикалов, клетки SH-SY5Y, болезнь Альцгеймера.

1. Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) является одной из наиболее частых форм нейродегенеративного расстройства, связанного с деменцией у пожилых людей, и, как полагают, вызывается аномальным отложением пептида амилоид- β ($A\beta$) [1]. При нормальном клеточном метаболизме образуются активные формы кислорода (АФК), включая супероксид-анион (O_2^-), гидроксил ($HO\cdot$), оба из которых являются свободнорадикальными, и перекись водорода (H_2O_2), которая является нерадикальной АФК. Избыточное производство АФК, по-видимому, способствует окислительно-восстановительному дисбалансу, что приводит к окислительному стрессу, который участвует в нейротоксичности, индуцированной $A\beta$ при БА [2]. Данные свидетельствуют о том, что производство АФК поддерживает «гипотезу окислительного стресса» БА [3]. Кроме того, ионы металлов побуждают сам $A\beta$ производить АФК, в свою очередь вызывая нейротоксичность, вызванную окислительным стрессом [4]. Было обнаружено, что ионы металлов, таких как железо и медь, которые способствуют образованию свободных радикалов посредством реакции Фентона, увеличивают нейротоксичность при БА [5]. Важно отметить, что эти повышенные маркеры окислительного стресса предшествуют отложению $A\beta$ и нейрофибрилярным сплетениям, предполагая, что окислительный стресс является «ранним событием» в патогенезе БА. Система эндогенной антиоксидантной защиты основана как на ферментативных (супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза), так и на неферментативных реакциях с участием таких соединений, как витамины С и Е, β -каротин, мочевая кислота и глутатион. Они находятся в цитоплазме и различных клеточных органеллах, чтобы противостоять свободным радикалам [6]. Помимо вышеупомянутых эндогенных антиоксидантов, вторичные метаболиты растений, известные как биофенолы, в последние два десятилетия привлекают большое внимание как экзогенные антиоксиданты [7]. Было высказано предположение, что потребление фруктовых и овощных соков, содержащих высокие концентрации биофенолов, по крайней мере три раза в неделю, может отсрочить наступление AD [8]. В ряде исследований сообщается о ежедневном потреблении биофенола в ряде европейских стран, включая Финляндию (863 ± 415 мг / день) [9], Францию (1193 ± 510 мг / день) [10], Испанию (820 ± 323 мг / день) / сут [11] и Польшу ($1756,5 \pm 695,8$ мг / сут) [12]. В японском исследовании сообщается о потреблении биофенола в дозе 961 ± 452 мг / день у пожилых людей [13]. Во всех этих исследованиях использовалась база данных Phenol-Explorer [14] или аналогичные источники, содержащие количественные значения, измеренные

методами ВЭЖХ [15]. Действительно, все больше данных свидетельствует о том, что невитаминные антиоксиданты, такие как биофенолы, которые проявляют плеiotропную активность, включая улавливание АФК и хелатирование переходных металлов, особенно железа и меди, в настоящее время вызывают значительный интерес в качестве потенциальных терапевтических агентов для противодействия заболеваниям, включая БА, связанные с окислительным стрессом [16]. Биофенолы оливок (*Olea europaea* L.) являются важным компонентом средиземноморской диеты и привлекают большое внимание из-за их антиоксидантного действия [17]. Ряд исследований показал, что употребление традиционной средиземноморской диеты связано со снижением частоты сердечно-сосудистых заболеваний, некоторых видов рака и улучшением когнитивных функций [18,19,20]. Основными фенольными соединениями, обнаруженными в плодах оливок, являются гидрокситирозол (3) и тирозол (2) соответственно [21], в то время как олеуропеин (4) представляет собой основной биофенол в листьях оливок [22].], за которым следуют другие составляющие вербаскозид (6), лютеолин-7- О- глюкозид, апигенин-7- О- глюкозид и тирозол (2) [23]. Антиоксидантную активность различных препаратов оливок, как *in vitro*, так и *in vivo*, приписывают биофенолам, главным образом олеуропеину (OL), гидрокситирозолу (HT), олеуропеин агликону (OA) и вербаскозиду (VB) [17]. Более того, было обнаружено, что активность OL и HT выше, чем у хорошо известных антиоксидантов, витаминов E и C. Возможно, удивительно, что тирозол не проявляет ни антиоксидантной, ни прооксидантной активности [24]. Экстракт оливковых листьев также показал более высокую антиоксидантную активность, чем витамин C или витамин E [25]. В ограниченном количестве исследований клеточных линий сообщается об антиоксидантной активности биофенолов оливок [26,27,28]. Насколько нам известно, исследований по изучению нейропротекторной активности оливковых биофенолов в клетках нейробластомы (SH-SY5Y) не проводилось. В рамках наших постоянных усилий по разработке диетической стратегии на основе биофенолов, направленной на борьбу с клеточной токсичностью, вызванной окислительным стрессом, мы представляем настоящее исследование для дальнейшего выяснения антиоксидантной способности оливковых биофенолов (индивидуально и в виде экстрактов) как в бесклеточных, так и в бесклеточных формах. модель БА *in vitro* в клетках SH-SY5Y. Соответственно, мы определили общее содержание фенолов (TPC) и общее содержание флавоноидов (TFC) в четырех коммерческих оливковых препаратах.

2. Материалы и методы

2.1. Химические вещества и растительные экстракты

Олеуропеин (4), гидрокситирозол (3), вербаскозид (6) и лютеолин (LU) (8) были приобретены в Extrasynthese (Genay, Франция). Кофейная кислота (CA) (1), кверцетин (QU) (9) и рутин (RU) (10) были приобретены у Sigma-Aldrich (Castle Hill, Australia). Были закуплены четыре коммерческих препарата, а именно экстракт оливковых листьев TM (OLE), эквивалентный 1 г / мл свежего листа или 4,4 мг / мл олеуропеина от Comvita TM (Брисбен, Австралия); Экстракт оливковых фруктов TM (OFE), каждый миллилитр которого содержит 5 мг олеуропеина, производства Nature Goodness TM (Смитон Грейндж, Австралия); Гидрокситирозола Экстремальный TM (HTE), каждый из 100 мг экстракта оливковых листьев капсулы указано , чтобы обеспечить 25 мг гидрокситирозола, из ProHealth ® (Карпинтерия, CA, США); и 200 мг Olivenol Плюс TM капсулы (OLP), изготовленная с 12 мг (6%) из HIDROX ® , запатентованная формула HTA , полученные из оливкового сока из CREAGRI TMA (Hayward, CA, USA). Нитротетразолий синий хлорид (NBT), одноосновный фосфат калия, феноловый красный (реагент ACS), восстановленная двунариевая соль β-никотинамидадениндинуклеотида (NADH), феназинметосульфат, пероксидаза хрена (HRP) (тип VI) и 3- (4,5-диметилтиазол-2-ил) -2,5-дифенилтетразолий бромид (MTT), пероксид водорода (H₂O₂), тригидрат ацетата натрия, соляная кислота и гексагидрат хлорида железа (III), 2,4,6-трипиридил- s- триазин (TPTZ), Trolox TM , линия клеток нейробластомы (SH-SY5Y), среда Игла, модифицированная Дульбекко (DMEM) , плодная телячья сыворотка (FCS), раствор незаменимых аминокислот (NEAA), минимальная необходимая среда (MEM), раствор l- глутамина, раствор пенициллина-стрептомицина, раствор трипсина-EDTA, трипановый синий, диметилсульфоксид (DMSO), трис -HCl-буфер был приобретен у Sigma Aldrich (Австралия).

2.2. Базовые приготовления

Все стандартные нефлавоноидные биофенолы (CA, HT, OL и VB), флавоноидные биофенолы (LU, QU и RU) (фигура 1) и коммерческие оливковые экстракты (OLE, OFE, OLP и HTE) были приготовлены в 50% метаноле в качестве исходных растворов с последующей обработкой ультразвуком и фильтрацией (нейлоновый шприц-фильтр 0,25 мкм) перед каждым анализом и потреблялись в течение 4 часов после приготовления, чтобы минимизировать окисление на воздухе.

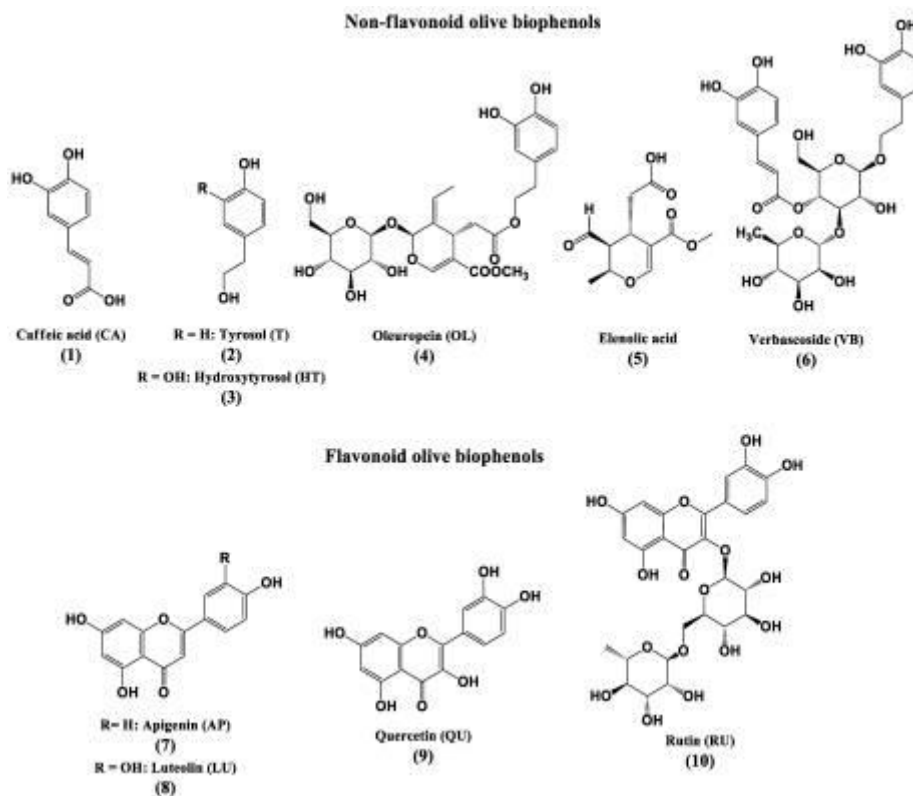


Рис.1.

Структуры основных нефлавоноидных и флавоноидных биофенолов оливок.

2.3. Определение общего содержания фенола (TPC) в экстрактах

TPC в экстрактах оливок (OLE, OFE, НТЕ и OLP) определяли, как описано ранее [29]. Аликвоты (100 мкл) различных концентраций экстракта оливок или опыта (метанол: вода, 1: 1, об. / Об.) Добавляли в мерные колбы объемом 10 мл, каждая из которых содержала 7–8 мл воды. Добавляли реагент Фолин-Чокальтеу (500 мкл), а затем через одну минуту раствор Na₂CO₃ (1,5 мл, 20% мас. / Об.). Сразу после легкого встряхивания колбы доводили до объема водой и инкубировали в течение одного часа при 25 ° С с последующей регистрацией оптической плотности при 760 нм. Все образцы анализировали в трех экземплярах. Общее количество фенольных соединений в экстракте в эквивалентах галловой кислоты (GAE) рассчитывали по следующей формуле:

$$T = C \times V \div M$$

Где T - общее содержание фенолов, мг / г экстракта, в GAE; C - концентрация галловой кислоты, определенная по калибровочной кривой, мг / мл; V - объем экстракта, мл; M - масса экстракта (мг).

2.4. Определение общего содержания флавоноидов (ОСФ) в коммерческих экстрактах

Содержание ТФК в оливковых экстрактах определяли согласно колориметрическому анализу AlCl₃ [30] с небольшими изменениями. В 3 мл 80% -ного метанола в мерную колбу на 10 мл добавляли по 500 мкл каждого экстракта оливок или кверцетина, а затем 300 мкл NaNO₂ (5% мас. / Об.). Через 5 мин, 300 мкл AlCl₃ · 6H₂O (10% об / об), а затем NaOH (1 M; 2 мл). Реакционную смесь встряхивали до гомогенного состояния, после чего объем доводили до 10 мл водой. После осторожного перемешивания измеряли оптическую плотность против холостого раствора при 510 нм. Общее содержание флавоноидов выражали в миллиграммах кверцетинового эквивалента на грамм сухого веса высушенного на воздухе материала (мг · QE / г). Каждый экстракт анализировали в трех экземплярах.

2.5. HPLC-DAD-Online ABTS Анализ улавливания радикалов

ВЭЖХ-анализ выполнялся согласно ранее описанному методу [31] с небольшими модификациями с использованием системы доставки растворителя Varian Prostar 240, оснащенной диодно-матричным

детектором (DAD) Varian Prostar 335, автосэмплером Varian Prostar 410 и рабочей станцией Star Chromatography. Контроллер версии 6.41 (Varian, Австралия). Использовали скорость потока 0,7 мл / мин и объем впрыска 10 мкл. Выход из DAD был подключен к реакционной катушке через Т-образное пересечение. ABTS • + (разбавленный из исходного раствора 3 мМ для получения оптической плотности = 0,70 при 734 нм) закачивали в реакционную катушку через Т-образное пересечение с помощью насоса ВЭЖХ Perkin-Elmer серии 10. Змеевик для реакции из ПЭЭК, 3,4 м × 0,178 мм внутренний диаметр, выдерживали при 37 ± 1 °С в регуляторе температуры колонки Varian HPLC. Детекцию поглощения ABTS • + контролировали при 414 нм с помощью детектора Varian 9050 UV-Vis (Санта-Клара, Калифорния, США). Данные, собранные с помощью этой схемы, генерировали положительные пики за счет изменения полярности аналогового сигнала. Анализ образца выполняли градиентным элюированием из колонки Gemini C-18 (Phenomenex, Сидней, Австралия) с внутренним диаметром 250 мм × 4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex, Сидней, Австралия) с защитным картриджем Security Guard (Phenomenex). Подвижные фазы были свежеприготовлены, дегазированы с помощью вакуумной фильтрации с использованием нейлоновых мембран Phenomenex 0,45 мкм и помещены в ультразвуковую ванну Sanophon (Ultrasonic Industries Pty. Ltd., Сидней, Австралия) с номинальной выходной мощностью 375 Вт за 15 мин до Анализ ВЭЖХ. Растворитель А представлял собой смесь вода / муравьиная кислота (1000: 3, об. / Об.), Тогда как растворитель В представлял собой ацетонитрил / вода / муравьиная кислота (600: 400: 3, об. / Об. / Об.). Скорость потока 0,7 мл / мин, объем впрыскивания 5 мкл и градиентное элюирование для общего времени пробега 30 мин были использованы следующим образом: начальные условия 90% растворитель А; растворитель В увеличивался до 25% за 2 мин; затем растворитель В увеличивали до 45% в течение 3 минут с последующим изократическим элюированием в течение 2 минут. Растворитель В был увеличен до 80% за 13 минут и до 100% за 5 минут и вернулся к исходному составу через 5 минут. Системе давали возможность уравновеситься в течение 20 мин между прогонами.

2.6. Жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (ЖХ-МС)

Образцы анализировали на жидкостном хроматографе Agilent серии 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Германия) путем градиентного элюирования на колонке Phenomenex C-18 (Lane Cove, Австралия) с внутренним диаметром 150 мм × 4,6 мм, 3 мкм. Условия разделения, как для HPLC-DAD, были сохранены. Однако DAD был настроен на запись хроматограмм при 280 и 325 нм.

Отвод от DAD был подключен к трехквadrупольному масс-анализатору Agilent 6410 (Agilent Technologies, Санта-Клара), оборудованному интерфейсом ионизации электрораспылением. МС-анализ выполняли в режиме отрицательных ионов (m/z 100–1500) с использованием газообразного азота при следующих условиях: температура газа 300 °С; расход газа 12 л / мин; давление распылителя 45 фунтов на квадратный дюйм; капиллярное напряжение 4 кВ; напряжение конуса, 100 В.

Данные анализировали с использованием рабочей станции Mass Hunter Workstation версии B.04.00 (Agilent Technologies).

2.7. Анализ удаления супероксидных радикалов (SOR)

Метод определения активности поглощения SOR был адаптирован с изменениями из предыдущего отчета [27]. Последовательно добавляли пятьдесят мкл различных концентраций оливковых биофенолов, 50 мкл NBT (200 мкм), 50 мкл NADH (624 мкм) и 50 мкл феназинметосульфата (80 мкм). Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут, и оптическую плотность при 560 нм считывали с помощью настраиваемого автоматического считывающего устройства для микропланшетов VersaMax TM (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния, США).

Фосфатный буфер использовали в качестве отрицательного контроля. Из-за его нестабильности для каждой серии экспериментов готовили свежий раствор феназинметосульфата [27].

2.8. Анализ поглощения H₂O₂ in vitro

Используемый анализ поглощения H₂O₂ был описан ранее [27]. Пятьдесят мкл свежеприготовленного раствора 2 мМ H₂O₂, согласно Beers and Sizer (1952), смешивали с 50 мкл различных концентраций биофенолов оливок. Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре (20 ± 2 °С) в течение 20 мин. Смесь (100 мкл), приготовленную из свежеприготовленной HRP (0,3 мг / мл) и фенолового красного (4,5 мМ) в 0,1 М фосфатном буфере, добавляли к реакционной смеси, содержащей биофенолы и H₂O₂. После 10 мин инкубации при комнатной температуре оптическую плотность измеряли при 610 нм с помощью считывающего устройства для микропланшетов Versamax TM.

Все образцы биофенола были приготовлены в 50% метаноле, а реагенты - в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4).

2.9. Анализ ферроредуцирующей / антиоксидантной силы (FRAP)

Процедуру анализа FRAP проводили согласно ранее описанным методикам [31,32] с небольшими изменениями. Рабочий реагент FRAP был приготовлен путем смешивания трех исходных растворов реагентов, включая 300 мМ ацетатный буфер (pH 3,6, 25 мл), 5 мМ TPTZ в 40 мМ HCl (2,5 мл) и 5 мМ FeCl₃ · 6H₂O (2,5 мл). Смесь нагревали до 37 ° C перед использованием. Для каждого образца добавляли 200 мкл реагента FRAP, 10 мкл оливковых биофенолов и 40 мкл деионизированной воды. После инкубации при 37 ° C (водяная баня) оптическую плотность при 593 нм измеряли с использованием планшет-ридера Fluostar omega (BMG-Labtech, Ортенберг, Германия). Конечный результат выражали как концентрацию антиоксиданта, обладающего способностью восстанавливать железо, на 1 г образца (мМ / г). Более высокое поглощение реакционной смеси указывает на большую восстанавливающую способность. Trolox TM использовался в качестве стандарта, и общая восстанавливающая способность была выражена в эквиваленте Trolox TM. Образцы анализировали в трех экземплярах.

2.10. Культура клеток

Клетки нейробластомы (SH-SY5Y) выращивали в прозрачной стерильной колбе T-75 со средой (протокол производителя) 50% Minimum Essential Media (MEM) и 50% Ham's F-12 с добавлением 15% инактивированной фетальной сыворотки теленка, 1 % 100 единиц / мл пенициллина / стрептомицина, 1% l- глутамин и 1% NEAA с последующей инкубацией при 37 ° C в атмосфере 5% CO₂ /95% увлажненного воздуха в инкубаторе. После достижения 80–90% конfluence клетки пассировали обычно каждые три дня с использованием раствора трипсин-ЭДТА, клетки отделяли из колбы T-75 и затем культивировали в свежей среде. Количество жизнеспособных и мертвых клеток определяли с помощью гемоцитометра после добавления 10% трипанового синего.

2.11. Индуцированная H₂O₂ токсичность для клеток SH-SY5Y и нейропротекторный потенциал оливковых биофенолов

Чтобы определить значение LD 50 H₂O₂ против клеток SH-SY5Y, одиннадцать разведений исходной H₂O₂ (30%) были свежеприготовлены и инкубированы с клетками SH-SY5Y при начальной плотности 5 × 10³ клетки на лунку в прозрачных стерильных 96-луночных планшетах с последующей инкубацией при 37 ° C в атмосфере 5% CO₂ /95% увлажненного воздуха в инкубаторе.

Оливковые биофенолы готовили в различных концентрациях и инкубировали с клетками при плотности 5 × 10³ клеток / лунку в стерильных прозрачных 96-луночных планшетах и поддерживали при 37 ° C в атмосфере 5% CO₂ /95% увлажненного воздуха в инкубаторе в течение 24 часа [33]. Чтобы определить защитный эффект оливковых биофенолов, свежеприготовленную H₂O₂ (при концентрации LD 50) добавляли в каждую лунку, содержащую клетки, предварительно обработанные оливковыми биофенолами, и инкубировали еще 24 часа при 37 ° C и менее 5%. CO₂ /95% увлажненный воздух в инкубаторе.

2.12. Медь (Cu) -индуцированная токсичность клеток SH-SY5Y и лечение оливковыми биофенолами

Анализ токсичности клеток SH-SY5Y, индуцированной медью, проводили в соответствии с ранее описанным методом [34] с небольшими изменениями. Клетки SH-SY5Y высевали в прозрачные стерильные 96-луночные планшеты при плотности 5 × 10³ клеток на лунку и инкубировали при 37 ° C в атмосфере 5% CO₂ /95% увлажненного воздуха в течение 24 часов. Чтобы определить LD 50 меди в клетках SH-SY5Y, клетки SH-SY5Y обрабатывали различными концентрациями (10–500 мкМ) Cu и инкубировали в течение 24 ч в тех же условиях.

Оливковые биофенолы готовили в различных концентрациях и инкубировали с клетками при плотности 5 × 10³ клеток / лунку в стерильных прозрачных 96-луночных планшетах и поддерживали при 37 ° C в атмосфере 5% CO₂ /95% увлажненного воздуха в инкубаторе в течение 24 ч. Защитный эффект оливковых биофенолов определяли путем добавления Cu (значение EC 50) к предварительно обработанным клеткам SH-SY5Y с различными концентрациями оливковых биофенолов или без них с последующей инкубацией в течение 24 часов.

2.13. Анализ жизнеспособности клеток

Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-анализа. Клетки обрабатывали 10 мкл МТТ (5 мг / мл) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) в каждую лунку с последующей инкубацией в течение 4 ч при 37 ° C [35]. Кристаллы формазана были получены жизнеспособной митохондриальной сукцинатдегидрогеназой

из МТТ. Затем супернатант отсасывали и кристаллы формазана растворяли в 50 мкл ДМСО. Поглощение измеряли при 570 нм через 15 мин с помощью считывающего устройства для микропланшетов Omega Star [36]. Жизнеспособность клеток выражали в процентах выживаемости по отношению к контрольному образцу.

2.14. Статистический анализ

Статистические анализы были выполнены с помощью однофакторного теста ANOVA с последующим апостериорным анализом (тест множественного сравнения Тьюки), и значения ЕС 50 (концентрации, необходимые для подавления 50% активности фермента в экспериментальных условиях) были рассчитаны с использованием GraphPad. Программное обеспечение Prism версии 5.0 для Windows (GraphPad Software, Inc., Сан-Диего, Калифорния, США). Все значения были представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (среднее \pm SEM) для каждой группы. Значение «р» $< 0,05$ считалось значимым.

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Общее содержание фенола и общее содержание флавоноидов

TPC (выраженный в мг GAE / г) каждого из экстрактов оливок был определен с помощью реактива Фолина-Чокальтеу и оказался следующим: НТЕ ($574,47 \pm 35,39$) > ОLP ($30,12 \pm 0,83$) > ОЛЕ ($7,87 \pm 0,05$) > ОФЕ ($4,64 \pm 0,09$). Исследование *in vitro* показало, что максимальный выход оптимизации общего содержания биофенолов, определенный с помощью анализа Folin-Ciocalteu, составлял 250,2 мг GAE на 100 мг сухого веса экстракта листьев оливы [37]. Наши результаты показывают, что общее количество фенолов в НТЕ превышает более чем вдвое, а в других экстрактах оно значительно ниже.

Концентрации флавоноидов в различных оливковых экстрактах находятся в диапазоне от 24,17 до 823,12 мг кверцетинового эквивалента (QE) на грамм. Содержимое было НТЕ ($823,12 \pm 12$), за которым следовали ОLP ($174,70 \pm 1,72$), ОЛЕ ($32,03 \pm 0,73$) и меньше всего ОФЕ ($24,17 \pm 0,33$). И снова коммерческий продукт НТЕ является лидером с самым высоким содержанием флавоноидов, независимо от параметров отбора проб (сорт оливок, возраст листьев или дата отбора проб).

3.2. Идентификация и антиоксидантный профиль оливковых экстрактов

Фенольный состав вместе с антиоксидантным профилем всех коммерческих оливковых экстрактов оценивали с помощью HPLC-DAD, хроматограмм активности по улавливанию онлайн-ABTS и подтверждали с помощью LC-MS. Из-за характерного поглощения секоиридоидов при 240 нм, которые широко распространены в семействе Oleaceae [38], длина волны 280 нм была выбрана для обнаружения широкого диапазона фенольных соединений. Активность поглощения каждого экстракта онлайн-ABTS, измеренная при 414 нм, показана в фигуре 2. Двадцать один пик появился на хроматограммах ВЭЖХ экстрактов оливок и дал семнадцать идентифицируемых соединений, при этом четыре соединения (пики 1, 2, 16 и 21) остались неидентифицированными (Таблица 1; фигура 2).

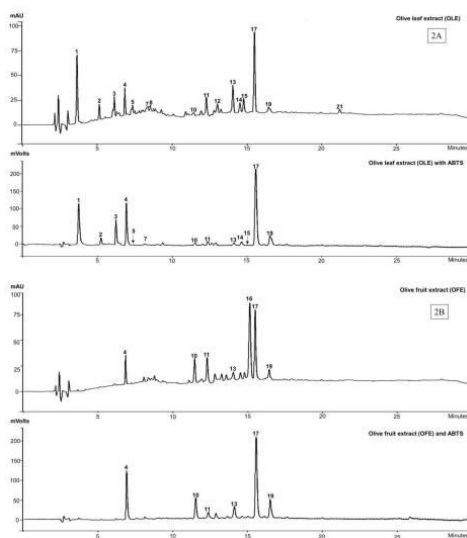


Рис.2.

Хроматограммы HPLC-DAD-ABTS четырех коммерческих экстрактов оливок при 280 нм и поглощение ABTS при 414 нм. (2A) экстракты оливковых листьев (OLE); (2B) экстракты плодов оливы (OFE); (2C) Hydroxytyrosol Extreme TM (HTE) и (2D) Olivenol Plus TM (OLP).

Таблица 1

Идентификация и онлайн-активность по удалению основных пиков оливковых экстрактов.

Вершина горы	T _R	λ _{макс} (нм)	Идентификация	ABTS	[M - H] ⁻	Извлекать
1	3,6	231, 278	Неизвестно	да	191	OLE
2	5.1	231, 279	Неизвестно	да	487	OLE
3	6.1	283	Гидрокситирозол глюкозид	да	315	OLE, HTE
4	6,8	231, 275	Гидрокситирозол (3)	да	153	OLE, OFE, HTE, OLP
5	7,4	232, 333	Глюкозид кофейной кислоты	да	339	OLE
6	8,2	277	Тирозол (2)	Нет	ND	OLP
7	8,3	229, 278	Олеуропеин агликон-1	да	377	OLE, HTE, OLP
8	8,5	233	Эленоловая кислота (5)	Нет	241	OLE

Вершина горы	T _R	λ _{макс} (нм)	Идентификация	ABTS	[M - H]·	Извлечь
9	9.1	237	Глюкозид эленоловой кислоты	Нет	403	HTE
10	11,3	282, 333	Вербаскозид (6)	да	623	OLE, OFE OLP, HTE
11	12,3	254, 267с, 340	Лютеолин-7- O- глюкозид	да	447	OLE, OFE, HTE
12	13,0	278	Неизвестный «секоиридоид»	Нет	581	OLE
13	14.0	278	Неизвестный «секоиридоид»	да	577	OLE, OFE
14	14,5	265, 325, 359	Флавоноидный гликозид	да	447	OLE
15	14,8	266, 341	Флавоноидный гликозид	да	461	OLE
16	15.1	260	Неизвестно	Нет	ND	OFE
17	15.4	237, 280	Олеуропеин (4)	да	539	OFE, OLE

Вершина горы	T _R	λ _{макс} (нм)	Идентификация	ABTS	[M - H] -	Извлечь
18	16.0	232	Нефенольный секоиридоид	Нет	285	OLP
19	16,42	234	Олеуриозид	да	539	OFE, OLE
20	19,1	287, 290	Олеуриозин агликон-2	да	377	НТЕ
21 год	21,2	234, 280	Неизвестно	Нет	415	OLE

T_R: время удерживания в минутах; λ_{макс}: длина (с) волны максимального поглощения в УФ-видимом спектре; HD: в МС не обнаружено; s: плечо; OLE: экстракт листьев оливы; OFE: экстракт плодов оливы; НТЕ: Hydroxytyrosol Extreme; OLP: Olivenol Plus.

Основными биофенолами, идентифицированными в OLE, были: гидрокситирозол (3) (пик 4), олеуриозин агликон-1 (пик 7), эленоловая кислота (5) (пик 8), вербаскозид (6) (пик 10), лютеолин-7- O- глюкозид (пик 11), флавоноидные глюкозиды (пики 14 и 15) и олеуриозин (4) (пик 17) в качестве основных компонентов. Другие исследования [39,40] показывают биофенольные профили OLE, которые аналогичны тем, о которых мы сообщаем здесь, также с олеуриозином (4) в качестве доминирующего соединения.

Для OFE биофенолы были такими же, как и экстракты листьев оливы, за исключением предварительно идентифицированного олеуриозина агликон-1 (пик 7) и флавоноидных гликозидов (пики 14 и 15). Два соединения, обнаруженные на пиках 12 и 13 в OLE (фигура 2А) были частично охарактеризованы как секоиридоиды (λ_{макс}, 240–280), но не были присвоены конкретные идентичности, в то время как пик 13 также был очевиден в OFE (фигура 2Б).

В НТЕ идентифицированными компонентами были глюкозид гидрокситирозола (пик 3) с гидрокситирозолом (3) (пик 4), являющимся основным компонентом, в то время как олеуриозин агликон-1 (пик 7), глюкозид эленоловой кислоты (пик 9), вербаскозид (6) (пик 10), лютеолин-7- O- глюкозид (пик 11) и производное олеуриозина агликон-2 (пик 20) появляются как второстепенные компоненты экстракта.

Профиль биофенола для OLP был аналогичен профилю экстракта НТЕ, за исключением гидрокситирозола глюкозида (пик 3). Тирозол (2) (пик 6) был обнаружен только в экстракте OLP, но не проявляется в анализе МС из-за его кислотного характера и рабочих параметров (растворитель и условия МС), которые не подходят для его ионизации [41]. Было соединение, предварительно идентифицированное как нефенольное производное секоиридоида (пик 18), появляющееся в OLP (фигура 2D), но с λ_{макс} при 320 нм.

Результаты ВЭЖХ / ABTS по поглощающей активности предполагают, что антиоксидантная активность OLE проявляется преимущественно в 14 соединениях, соответствующих пикам с 1 по 21 (за исключением пиков 6, 8, 9, 12, 16, 18 и 21) хроматограммы. Соединения, идентифицированные в OFE, которые проявляют активность по улавливанию ABTS, соответствуют гидрокситирозолу (2), вербаскозиду (5), лютеолин-7- O- глюкозиду, неизвестному «секоиридоиду», олеуриозину (4) и олеуриозиду (пики 4, 10, 11, 13, 17 и 19

соответственно). Большой пик (16) при времени удерживания (T R) 15 мин - это неизвестное соединение, которое не появляется ни в одном из других экстрактов (фигура 2Б). Также он не проявляет какой-либо активности по уборке мусора ABTS.

Все основные соединения, идентифицированные в НТЕ, а именно, гидрокситирозол глюкозид, гидрокситирозол (3) олеуропеин агилкон-1, вербаскозид (6), лютеолин-7- О- глюкозид и олеуропеин агликон-2, за исключением глюкозида эленоловой кислоты. В OLP гидрокситирозол (3), олеуропеин агилкон и вербаскозид (6) на пиках 4, 7 и 10 соответственно проявляли активность по улавливанию ABTS, за исключением тирозола (1) (пик 6) и нефенольного «секоиридоида» (пик 18).

Мы обнаружили, что биофенолы, гидрокситирозол (3) (пик 4) и вербаскозид (6) (пик 10) присутствовали во всех четырех коммерческих экстрактах (OLE, OFE, НТЕ и OLP) и демонстрировали сильную активность поглощения онлайн-ABTS (относительная до высот пиков на хроматограммах ВЭЖХ). Олеуропеин агликон-1 (пик 7) был обнаружен в трех экстрактах (OLE, НТЕ и OLP). Лютеолин-7- О- глюкозид (пик 11) также был обнаружен в трех (OLE, OFE, НТЕ) из 4 экстрактов, хотя и в очень различных количествах, в то время как олеуропеин (4) (пик 17) доминировал в OLE и OFE. (Таблица 1).

Наши результаты анализа оливковых экстрактов методом ВЭЖХ соответствовали ранее опубликованным исследованиям [25,48,49]. По словам производителей, два коммерческих экстракта, OLE и НТЕ, были приготовлены из оливкового листа, а OFE и OLP были приготовлены из мякоти плодов оливы. Более того, олеуропеин (4) был основным компонентом OLE (4,4 мг / мл) и OFE (5 мг / мл), в то время как гидрокситирозол (3) является основным компонентом НТЕ (25 мг / 100 мг экстракта) и OLP (12 мг / капсула) экстрактов, как указано производителями. Наши результаты подтверждают заявления производителей.

3.3. Действия по удалению супероксидных радикалов (SOR)

Неферментативная система феназинметосульфат-NADH генерирует SOR, которые восстанавливают NBT до пурпурного красителя формазана. Образующиеся SOR восстанавливают желтые водорастворимые катионы NBT 2+ до синего нерастворимого в воде диформаза. В водном растворе при физиологическом pH фенолы (например, в виде флавоноидов) и / или их феноксильные радикалы могут восстанавливать SOR в двухстадийном процессе с образованием H₂O₂ [50]. Таким образом, уменьшение поглощения при 560 нм (свидетельствует о меньшем восстановлении NBT) с оливковыми биофенолами указывает на расходование супероксид-аниона в реакционной смеси. Чем ниже поглощение при 560 нм, тем более активным поглотителем SOR является образец (Таблица 2).

Таблица 2

Удаление SOR, удаление H₂O₂ и значение FRAP оливковых биофенолов.

	Биофенолы	SOR EC₅₀ (мкМ)	H₂O₂ EC₅₀ (мМ)	FRAP мМ TE / г
Нефлавоноиды	Калифорния (1)	436,3	1.01	0,830 ± 0,19
	НТ (3)	291,4	1.02	0,775 ± 0,16
	ПП (4)	258	1.02	0,713 ± 0,18
	VB (6)	119,4	0,66	1,173 ± 0,27
				FRAP мМ TE / г
Флавоноиды	QU (9)	93,97	NS	1,272 ± 0,29
	RU (10)	143,2	NS	0,957 ± 0,22
	ЛУ (8)	234	NS	1,011 ± 0,23
		SOR EC₅₀ (мкг / мл)	H₂O₂ EC₅₀ (мкг / мл)	FRAP мг TE / г

	Биофенолы	SOR EC₅₀ (мкМ)	H₂O₂ EC₅₀ (мМ)	FRAP мМ ТЕ / г
Экстракты	OLE	1,89	120,6	2,261 ± 0,51
	OFE	6,71	217	1,708 ± 0,39
	HTE	1,98	115,8	2,824 ± 0,64
	OLP	2,46	280,3	1,421 ± 0,32

ТЕ: Trolox[®] эквивалент, NS: не имеет значение, СА: кофейная кислота, ПР: олеуропеин, НТ: hydroxytyrosol, VB: verbascoside, QU: кверцетин, RU: рутины, LU: лютеолин, OLE: экстракт оливковых листьев, OFE: оливковый фрукты экстракт, HTE: гидрокситирозол экстремальный, OLP: оливенол плюс.

Что касается активности поглощения SOR нефлавоноидных фенолов, VB (6) был выше, чем OL (4), HT (3) и СА (1), и соответствующие концентрации, которые поглощают 50% значений SOR (EC₅₀). Составляли 119,4, 258, 291,4 и 436,3 мкМ соответственно. Самая высокая активность VB (6) согласуется с ранее опубликованными результатами нашей лаборатории [27] и предполагает, что присутствие двух катехоловых функций в его структуре обеспечивает большую антиоксидантную активность [51].

В случае флавоноидных биофенолов оливок QU (9) показал максимальную активность по улавливанию SOR, за ним следовали RU (10) и LU (8). Соответствующие значения EC₅₀ составили 83,71, 143,2 и 234 мкМ соответственно (Таблица 2). Превосходство QU (9) над другими флавоноидами (RU (10) и LU (8)) в отношении активности поглощения SOR также было указано в более ранних исследованиях [52,53].

Каждый из этих флавоноидов обладает катехоловой функцией, связанной с В-кольцом, которое конъюгировано с α, β-ненасыщенной карбонильной системой С-кольца. Эта структурная конфигурация, вероятно, придает стабильность их радикалам и, в свою очередь, приводит к большей способности улавливать SOR по сравнению с нефлавоноидами. Присутствие дополнительной гидроксильной группы в 3-положении (С-кольцо) в молекуле QU (9) может объяснить, почему она проявляет немного более высокую активность, чем RU (10) и LU (8). В итоге мы обнаружили, что активности отдельных соединений были в следующем порядке: QU > VB > RU > LU > OL > HT > СА.

Для коммерческих оливковых экстрактов OLE продемонстрировал максимальную эффективность удаления (Таблица 2). Напротив, при более высоких концентрациях (> 50 мкг / мл) OLE проявляет горькое поведение (характеризующееся стимуляцией низкой дозой и ингибирующим или токсическим действием высокой дозы) в отношении активности поглощения SOR [54]. Оливковые экстракты можно классифицировать по активности SOR следующим образом: OLE > HTE > OLP > OFE. Результаты показывают, что экстракт, имеющий самое низкое общее содержание фенола и общее содержание флавоноидов, имеет самую низкую активность по улавливанию SOR, как видно в OFE. Хотя HTE имел самое высокое содержание общего фенола и общего флавоноидов, он был менее эффективным, чем OLE, в качестве поглотителя SOR.

3.4. Активность по улавливанию радикалов H₂O₂ оливковыми биофенолами

Оливковые биофенолы ведут себя как хорошие доноры электронов и водорода из-за присутствия фенольных гидроксильных групп и, таким образом, могут ускорять превращение H₂O₂ в H₂O. Непрореагировавший H₂O₂ расходуется HRP на окисление фенолового красного и поглощение продукта окисления измеряется при 610 нм. Наивысшую активность по улавливанию H₂O₂ продемонстрировал VB с EC₅₀: 0,66 мМ, что согласуется с ранее опубликованными результатами нашей лаборатории [27], в то время как остальные нефлавоноидные биофенолы оливок демонстрируют аналогичную, но более низкую эффективность (~ 1,0 мМ) очистка (Таблица 2). Напротив, ни один из флавоноидных биофенолов оливок не проявил активности поглощения H₂O₂ (Таблица 2). Активность экстракта HTE по улавливанию H₂O₂ была выше, чем у OLE, OFE и OLP, с соответствующими значениями EC₅₀ 115,8, 120,6, 217, 280,3 мкг / мл соответственно.

3.5. Анализ снижения антиоксидантной силы железа (Fe³⁺) (FRAP)

Анализ FRAP зависит от восстановления бесцветного комплекса железа (Fe³⁺ трипиридилтриазин) до окрашенного в синий цвет комплекса железа (Fe²⁺ трипиридилтриазин) под действием электронодонорных антиоксидантов при низком pH [32]. Стандартную кривую получают с использованием различных концентраций Trolox[®] в диапазоне от 0 до 1200 мкМ, давая R² = 0,9999 (данные не показаны). Оливковые биофенолы показали значительную снижающую способность в анализе FRAP (Таблица 2).

Как и SOR и H₂O₂, VB показал самую высокую активность среди нефлавоноидных соединений. Среди флавоноидов активность QU была самой высокой, за ней следовали LU и RU. HTE показал самую высокую антиоксидантную активность из группы экстрактов оливковых биофенолов, за которой следует OLE. «Коммерческие экстракты» могут быть ранжированы в соответствии с их восстанавливающей способностью в следующем порядке: HTE > OLE > OFE > OLP.

Железо играет важную роль в патологии AD через реакцию Фентона, в которой Fe²⁺ реагирует с H₂O₂ с образованием гидроксильного радикала (OH). Исследования показывают, что железо накапливается в тех же областях мозга, где откладывается Aβ, то есть в гиппокампе, теменной коре и моторной коре [55,56]. Интересно, что накопление и связывание Fe³⁺ с тау-белком предшествует агрегации гиперфосфорилированного тау с последующим образованием нейрофибриллярных клубков [4,57]. Большая часть диетического источника (растений) негемного железа поступает в желудочно-кишечный тракт в виде Fe³⁺, который не является биодоступным. Fe²⁺ показывает лучшее поглощение, чем Fe³⁺, поскольку последний осаждается из раствора примерно при pH 7, то есть при нормальных физиологических условиях. Оливковые биофенолы могут ингибировать всасывание в кишечнике Fe²⁺ и Fe³⁺, тем самым предотвращая окислительно-восстановительный цикл железа [58], что свидетельствует о снижении окислительного стресса. Кроме того, это может вызвать снижение доступности связывания Fe³⁺ с тау-белком, что, в свою очередь, приводит к снижению дальнейшей агрегации в головном мозге пациента с БА.

3.6. Нейропротекторный эффект оливковых биофенолов против цитотоксичности, индуцированной H₂O₂ в клетках SH-SY5Y

Токсичность H₂O₂ по отношению к клеткам SH-SY5Y определяли путем воздействия на них окислителя в концентрациях от 0 до 1000 мкМ. Результаты показывают, что LD₅₀ (H₂O₂) = 654,6 мкМ (Рисунок 3А). Таким образом, концентрация H₂O₂, используемая (700 мкМ) в экспериментах по нейрозащите, должна была приближаться к LD₅₀. После предварительной обработки клеток соединениями / экстрактами оливок было обнаружено, что нефлавоноидный биофенол оливок, СА, обеспечивает максимальную защиту с жизнеспособностью клеток 77% после 24 часов воздействия H₂O₂ (Рисунок 3Б). Затем последовала 71% жизнеспособность с VB (Рисунок 3С), тогда как OL и HT показали равную жизнеспособность (69%) (Рисунок 3Б). Флавоноидные биофенолы оливок, по-видимому, обладают меньшей защитной способностью, при этом QU и RU показывают равную жизнеспособность (63%), в то время как обработка LU достигает 59% жизнеспособности клеток против токсичности H₂O₂ (Рисунок 3С).

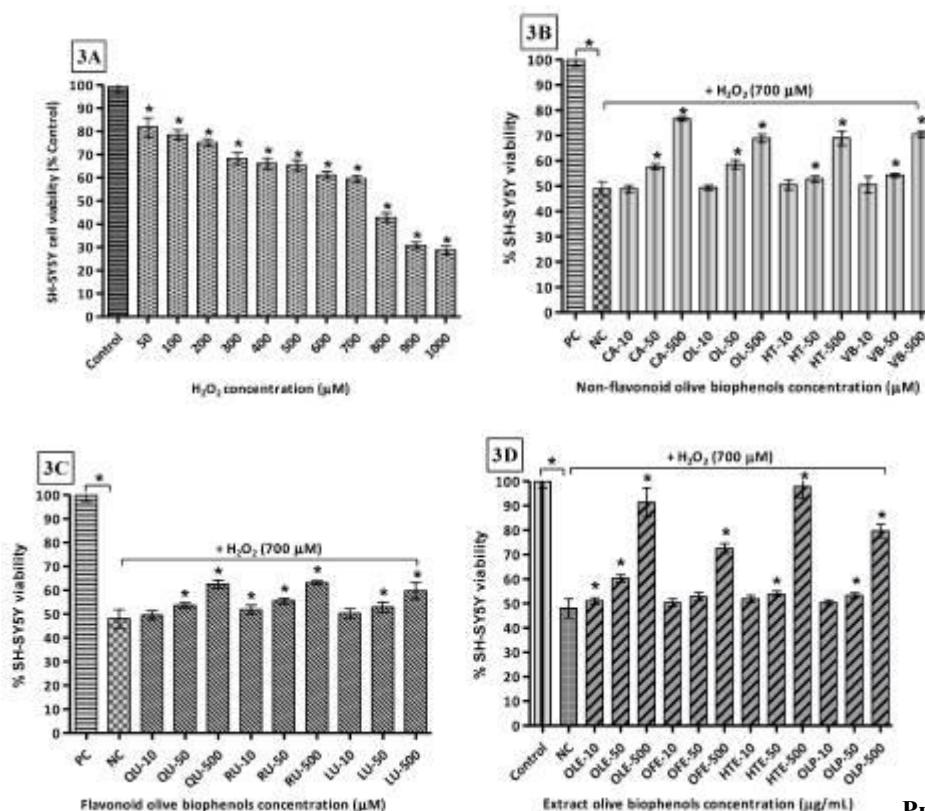


Рис. 3.

Индукцированная H_2O_2 токсичность клеток SH-SY5Y и защита оливковыми биофенолами: клетки SH-SY5Y обрабатывали различными концентрациями H_2O_2 в течение 24 часов (3A). Клетки SH-SY5Y инкубировали с различными концентрациями нефлавоноидных биофенолов оливок (3B), флавоноидных биофенолов оливок (3C) и экстракта биофенолов оливок (3D) в течение 24 часов, а затем с 700 мкМ H_2O_2 в течение 24 часов. Результаты представляют собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для каждого параллельного измерения, проанализированного с помощью однофакторного дисперсионного анализа, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем и отрицательным контролем. NS: не имеет значения. PC: положительный контроль (клетки со средой), NC: отрицательный контроль (клетки и H_2O_2 без биофенолов), CA: кофейная кислота, OL: олеуропеин, HT: гидрокситирозол, VB: вербаскозид, QU: кверцетин, RU: рутин, LU: лютеолин, OLE: экстракт листьев оливы, OFE: экстракт плодов оливы, HTE: Hydroxytyrosol extreme TM, OLP: Olivenol plus TM.

Интуитивно, возможно, ожидается, что отдельные соединения обеспечат самый высокий уровень защиты от повреждения клеток. Однако наши результаты говорят об обратном. В самых высоких исследованных концентрациях оливковый экстракт HTE обеспечивает самую высокую защиту с жизнеспособностью клеток 98%, за ним следуют OLE (92%), OLP (80%) и OFE (73%) (Рисунок 3D). Кажется очевидным, что действует синергетический эффект, потому что смеси соединений в экстрактах, скорее всего, содержат концентрации антиоксидантов на значительно более низких уровнях, чем те, которые использовались в описанных здесь экспериментах с одним соединением.

Уместно отметить, что H_2O_2 является нормальным побочным продуктом клеточного метаболизма и при низких, микромолярных, концентрациях считается сигнальной молекулой, которая может модулировать такие процессы, как рост, дифференциация и миграция клеток [59], тогда как при более высоких концентрациях он может вызвать тяжелый окислительный стресс. В качестве окислителя H_2O_2 непосредственно инактивирует тиол (-SH) содержащие ферменты путем окисления до дисульфидных связей [60]. Кроме того, из-за отсутствия неспаренных электронов в H_2O_2 , в отличие от других АФК, он может легко проникать через биологические мембраны и реагировать с ионами металлов (Fe^{2+} и Cu^{2+}), генерируя высокотоксичные АФК [61].

Кроме того, исследования показывают, что H_2O_2 может активировать ферменты γ -secretase [62], а также β -secretase, которые могут играть роль в индуцированной окислительным стрессом экспрессии BACE1 при AD [63]. Наши результаты показывают, что каждый из отдельных биофенолов оливок проявляет значительный нейрозащитный эффект. В случае коммерческих экстрактов это усиливается, предположительно, из-за синергетического эффекта смесей.

3.7. Нейропротекторный эффект оливковых биофенолов против индуцированной медью цитотоксичности в клетках SH-SY5Y

Исследования показали, что перегрузка медью (Cu) полученных от человека клеток легких, печени (A-549 и HepG2) [64] и клеток нейробластомы SH-SY5Y [65] значительно увеличивает концентрацию этого металла внутри клеток в дозе зависимый образ. Кроме того, эти перегрузки Cu, которые в конечном итоге вызывают сопутствующее увеличение продукции ROS и, в частности, H_2O_2 , которые в конечном итоге являются фактором риска AD. При использовании различных концентраций Cu^{2+} , инкубированных с клетками SH-SY5Y через 24 часа, определена LD 50 169,2 мкМ, вызывающая максимальную токсичность 77% по сравнению с контролем (Рисунок 4A). В группе нефлавоноидных оливковых биофенолов VB показал самую высокую защитную активность 72% против Cu-индуцированной токсичности SH-SY5Y (Рисунок 4B). CA показала вторую по величине защитную активность 64% (Рисунок 4B), в то время как OL и HT показали (Рисунок 4B) практически одинаковые защитные способности 56% и 53% соответственно. Биофенолы флавоноидов показали более низкую защитную активность по сравнению с нефлавоноидами против Cu-индуцированных клеток SH-SY5Y. QR показал максимальную защиту 54%, за ним следует RU 51%, в то время как LU был наименее активным флавоноидом 44% (Рисунок 4C) против Cu-индуцированной токсичности SH-SY5Y. Оливковые экстракты показали значительно более высокую защитную активность, при этом HTE был наиболее защитным, показав 92% активности (Рисунок 4D). OLE было вторым по степени защиты, показав 73% защиты (Рисунок 4D), тогда как OFE показал только 59% защиты, за которой следовала наименее активная активность OLP 51% (Рисунок 4D).

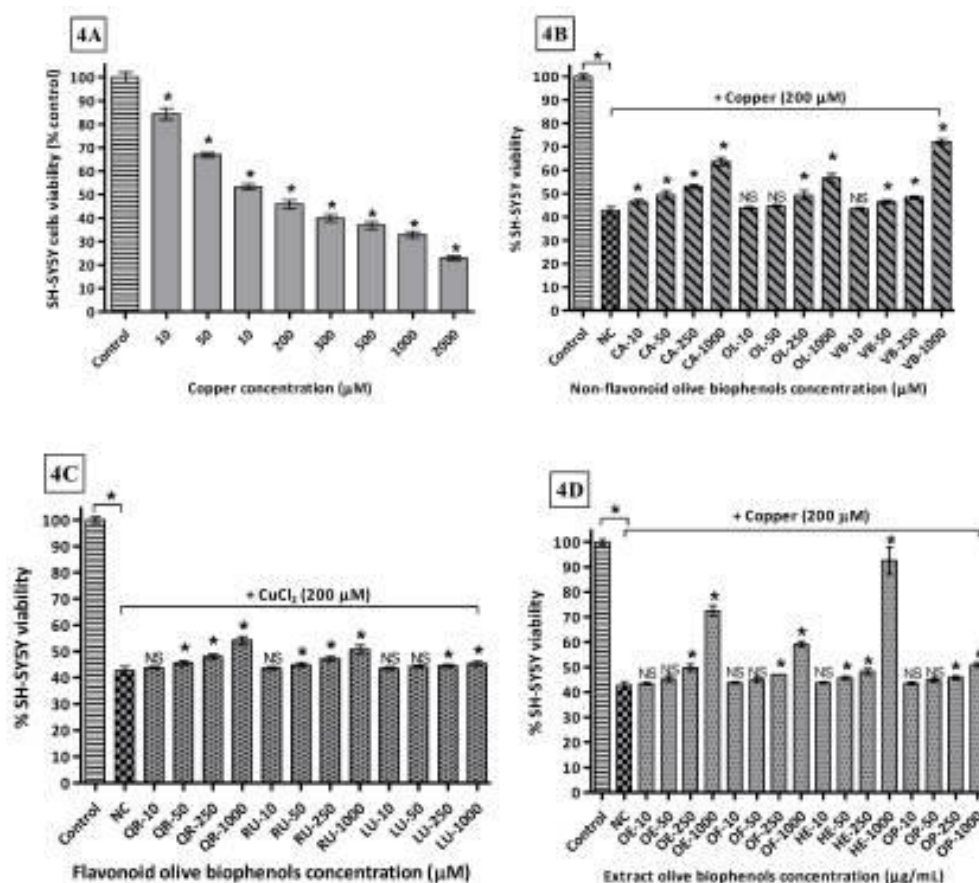


Рис.4.

Индукцированная медью токсичность клеток SH-SY5Y и защита оливковыми биофенолами: клетки SH-SY5Y обрабатывали различными концентрациями меди в течение 24 часов (4A). Клетки SH-SY5Y инкубировали с различными концентрациями нефлавоноидных оливковых биофенолов (4B), флавоноидных оливковых биофенолов (4C) и экстракта оливковых биофенолов (4D) в течение 24 часов, а затем 200 мкМ меди в течение 24 часов. Результаты представляют собой среднее значение \pm SE каждого параллельного измерения, проанализированного с помощью однофакторного дисперсионного анализа (тест Тьюки), * $p < 0,05$ по сравнению с контролем и отрицательным контролем. NS: не имеет значения. ПК: положительный контроль (клетки со средой), NC: отрицательный контроль (клетки и H₂O без биофенолов), CA: кофейная кислота, OL: олеуропеин, HT: гидрокситирозол, VB: вербаскозид, QU: кверцетин, RU: рутин, LU: лютеолин, OLE: экстракт листьев оливы, OFE: экстракт плодов оливы, HTE: Hydroxytyrosol extreme TM, OLP: Olivenol plus TM.

Сайты связывания ионов металлов на A β представляют собой очень многообещающую мишень для разработки новых терапевтических средств, в которых обработанные медью клетки SH-SY5Y могут представлять собой модель перегрузки медью в головном мозге, ведущей к нейродегенерации AD. Текущие исследования Cu-специфических хелатных агентов, шаперонов или антиоксидантов являются фокусом для предотвращения Cu-опосредованной нейротоксичности A β и продукции ROS при БА с помощью Cu-хелатирующей терапии, что является новой тенденцией в текущих исследованиях [66]. Наши результаты показывают, что экстракты оливковых биофенолов превосходят отдельные оливковые нефлавоноиды и флавоноиды для защиты клеток SH-SY5Y от токсичности, вызванной Cu, что может быть многообещающей терапией для лечения AD. Оливковые флавоноиды обладают относительно плохой защитой, и возможная причина их плохой активности заключается в том, что они подвержены самоокислению и превращению в их O-метилированные метаболиты, а отсутствие гидроксильной группы в конечном итоге приводит к небольшой цитотоксичности для клеток SH-SY5Y. [67].

4. Выводы

Настоящее исследование является первым отчетом о сравнении фенольного состава и антиоксидантной активности четырех коммерческих экстрактов оливок (два из листьев и два из фруктов) с отдельными биофенолами в клетках SH-SY5Y. Отдельные биофенолы оливок, гидрокситирозол (3) и вербаскозид (6) были

наиболее распространены в каждом из коммерческих экстрактов оливок (Таблица 1). Идентичность дополнительных соединений, которые продемонстрировали активность по улавливанию методом ВЭЖХ-АВТС, не удалось подтвердить с помощью анализа ЖХ-МС. Производные эленоловой кислоты (5), включая олеозиды, в экстракте не были фенилпропаноидами, а скорее включали фенилэтанонидный фрагмент в результате этерификации по альтернативному пути биосинтеза [48]. Кверцетин (9) был наиболее эффективным антиоксидантным соединением флавоноидов в анализе SOR из-за его структуры, которая играет ключевую роль в улавливании свободных радикалов. Из-за его быстрого окисления он сам становится радикалом, но образовавшийся неспаренный электрон делокализован по сопряженной π -электронной системе молекулы, что делает радикал кверцетина слишком низким по энергии, чтобы быть реактивным [68]. Кроме того, двойная связь между атомами C2 и C3 в фрагменте хромона (4 H -1-бензопиран) в сочетании с карбонильной группой в положении C4, чтобы стать 4-хромоном (4 H -бензопиран-4-он), увеличивает способность кверцетина для удаления свободных радикалов [69]. Напротив, кверцетин, включающий все флавоноиды, показал низкую активность по улавливанию H_2O_2 , что позволяет предположить, что флавоноиды являются лучшими поглотителями супероксидных радикалов, а не гидроксильных радикалов. Дальнейшее исследование флавоноидов против способности поглощать H_2O_2 в клетках нейробластомы (SH-SY5Y) демонстрирует умеренные поглощающие свойства и предполагает, что механизм снижения внутриклеточных ROS, индуцированных H_2O_2 , не был вызван прямым поглощением H_2O_2 , а скорее для удаления ROS, образующихся из H_2O_2 . Нефлавоноидный вербаскозид (6) был намного сильнее, чем олеуропеин (4), гидрокситирозол (3) или кофейная кислота (1) в отношении поглощения SOR, поглощения радикалов H_2O_2 и анализа FRAP. Это может быть связано с наличием в его структуре двух катехиновых фрагментов, которые в тесте Rancimat показывают более короткое время индукции, чем олеуропеин (4) [70]. Напротив, OLE, который содержит олеуропеин (4) в качестве основного компонента, демонстрирует самую высокую активность по улавливанию SOR, и это предполагает, что комбинация фенольных соединений, действующих совместно, более важна, чем любой отдельный биофенол. При измерении общей антиоксидантной способности с помощью анализа FRAP кверцетин (9) показал самую высокую антиоксидантную активность среди флавоноидов, что согласуется с ранее опубликованными исследованиями [71], хотя условия анализа были немного другими. Было высказано предположение, что O-дигидроксильная структура в В-кольце и 3-гидроксильная группа и 2,3-двойная связь в С-кольце ответственны за самую высокую активность FRAP [71]. Экстракт оливок, НТЕ, показал не только сильную активность по улавливанию H_2O_2 , но и самую высокую активность FRAP, и предположил, что его основной составляющий гидрокситирозол (3) синергетически с другими биофенолами, в то время как сам по себе проявлял активность от слабой до умеренной. Наивысшая антиоксидантная и нейрозащитная активность НТЕ была дополнительно подтверждена токсичностью, вызванной H_2O_2 , и токсичностью, индуцированной Cu, в клетках SH-SY5Y.

Наши результаты согласуются с исследованиями, которые показали, что экстракты оливковых листьев обладают более высокой антиоксидантной активностью, чем витамин С и витамин Е, благодаря синергии между флавоноидами, олеуропеозидами и замещенными фенолами [25]. Действительно, оливковые биофенолы могут предотвращать или минимизировать процессы окислительного повреждения, по существу, поглощая свободные радикалы и / или повышая способность эндогенной антиоксидантной системы, стимулируя, например, синтез эндогенных антиоксидантов. Принято считать [72], что поглощение пищевых биофенолов в оливковом масле приводит к недостаточным концентрациям для учета деятельности, о которой мы сообщаем в этом сообщении. Day et al. [73] сообщили о наличии более 20 метаболитов кверцетина в плазме человека, что указывает на то, что флавонолы действительно абсорбируются, хотя и в виде ряда метаболитов. Эти соединения также попадают в желчь и подвергаются энтерогепатической рециркуляции. Этот процесс повысит абсорбцию всего спектра биофенолов оливок, содержащих катехиновые фрагменты. Этот фактор необходимо дополнительно учитывать при обсуждении общей биодоступности биофенолов оливок. Несмотря на опасения по поводу их на первый взгляд биодоступности, оливковые биорфенолы продолжают проявлять сообщенная биологической активности, а также использование целых листьев оливкового и оливковых листьев экстрактов быстро возрастало как в фармацевтической и пищевой промышленности в качестве пищевых добавок и функциональных пищевых материалов [74,75]. Не было установлено точной корреляции между дозами биофенолов *in vitro* и *in vivo*. Однако исследования зависимости от времени доза-эффект, вероятно, будут способом оценки концентраций конкретных соединений как *in vitro*, так и *in vivo*. Как правило, биофенолы проявляют свою антиоксидантную активность через механизм разрыва цепи, с помощью которого первичный антиоксидант отдает электрон свободному радикалу, присутствующему в системах [76]. Другой механизм включает удаление инициаторов активных форм азота (АФК) (вторичных антиоксидантов) путем гашения этих «катализаторов иницирования цепи» [77]. Кроме того, антиоксидантная способность биофенолов не ограничивается только способностью улавливать свободные радикалы и восстанавливающей способностью, но также включает активацию окислительно-восстановительных факторов транскрипции и активацию генов, которые индуцируют экспрессию антиоксидантных ферментов [78].

Наше исследование поддерживает использование экстрактов оливок, которые могут эффективно принести пользу для здоровья благодаря наличию дополнительных и / или синергических эффектов их фитохимических веществ [79]. Наши результаты подтверждают важность диетических и медицинских биофенолов оливок в качестве альтернативной / дополнительной терапии для профилактики / лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера. Тем не менее, рекомендуется провести дальнейшие *in vivo* (трансгенные животные) и клинические эксперименты, прежде чем можно будет окончательно установить терапевтическую эффективность.

Благодарности

Факультет естественных наук, Школа биомедицинских наук, исследовательская стипендия на высшую степень, Университет Чарльза Стерта, Вагга-Вагга, Новый Южный Уэльс, 2650, Австралия.

Вклад авторов

SHO, НКО и ASH разработали и разработали эксперименты; CJS помогал в экспериментальном дизайне; SHO проводил эксперименты; SHO и НКО проанализировали данные; ШО и ПГК написали статью.

Конфликт интересов

Мы хотели бы подтвердить, что нет известных конфликтов интересов, связанных с этой публикацией, и не было значительной финансовой поддержки этой работы, которая могла бы повлиять на ее результат.

Ссылки:

1. Селькое Д. Д. Болезнь Альцгеймера: гены, белки и терапия. *Physiol. Rev.* 2001 ; 81 : 741–766. DOI: 10.1101 / cshperspect.a004457. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
2. Смит М.А., Роткамп К.А., Нуномура А., Райна А.К., Перри Г. Окислительный стресс при болезни Альцгеймера. *BBA Mol. Основы дис.* 2000; 1502 : 139–144. DOI: 10.1016 / S0925-4439 (00) 00040-5. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
3. Пратико Д. Гипотеза оксидативного стресса при болезни Альцгеймера: переоценка. *Trends Pharmacol. Sci.* 2008; 29 : 609–615. DOI: 10.1016 / j.tips.2008.09.001. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
4. Смит М.А., Харрис П.Л., Сэйр Л.М., Перри Г. Накопление железа при болезни Альцгеймера является источником свободных радикалов, образующихся в результате окислительно-восстановительного потенциала. *Proc. Natl. Акад. Sci. СОЕДИНЕННЫЕ ШТАТЫ АМЕРИКИ.* 1997; 94 : 9866–9868. DOI: 10.1073 / pnas.94.18.9866. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
5. Джомова К., Вондракова Д., Лоусон М., Валко М. Металлы, оксидативный стресс и нейродегенеративные расстройства. *Mol. Cell. Biochem.* 2010; 345 : 91–104. DOI: 10.1007 / s11010-010-0563-x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
6. Бирбен Э., Сахинер У.М., Сакесен С., Эрзурум С., Калайчи О. Окислительный стресс и антиоксидантная защита. *Мировой орган аллергии. J.* 2012; 5 : 9–19. DOI: 10.1097 / WOX.0b013e3182439613. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
7. Омар С.Х. Фармакология биофенолов против амилоидогенной активности при болезни Альцгеймера. *Биомед. Фармакотер.* 2017; 89 : 396–413. DOI: 10.1016 / j.biopha.2017.02.051. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
8. Дай К., Боренштейн А. Р., Ву Ю., Джексон Дж. К., Ларсон Э. Б. Фруктовые и овощные соки и болезнь Альцгеймера: проект «Каме». *Am. J. Med.* 2006; 119 : 751–759. DOI: 10.1016 / j.amjmed.2006.03.045. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
9. Оваскайнен М.Л., Торронен Р., Копонен Дж. М., Синкко Х., Хеллстром Дж., Рейнивуо Х., Маттила П. Диетическое потребление и основные пищевые источники полифенолов у взрослых финнов. *J. Nutr.* 2008; 138 : 562–566. [PubMed] [Google Scholar]

10. Перес-Хименес Дж., Фезеу Л., Тувье М., Арно Н., Манах К., Херкберг С., Галан П., Скальберт А. Потребление 337 полифенолов с пищей взрослыми французами. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011; 93 : 1220–1228. DOI: 10.3945 / ajcn.110.007096. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
11. Tresserra-Rimbau A., Medina-Remon A., Perez-Jimenez J., Martinez-Gonzalez MA, Covas MI, Corella D., Salas-Salvado J., Gomez-Gracia E., Lapetra J., Aros F., и другие. Диетическое потребление и основные пищевые источники полифенолов среди населения Испании с высоким сердечно-сосудистым риском: предварительное исследование. *Nutr. Метаб. Кардиоваск. Дис.* 2013; 23 : 953–959. DOI: 10.1016 / j.numecd.2012.10.008. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
12. Гроссо Г., Степаняк У., Топор-Мадри Р., Шафранец К., Паяк А. Расчетное потребление полифенолов с пищей и основные пищевые источники полифенолов в польской части исследования *harisee*. *Питание.* 2014; 30 : 1398–1403. DOI: 10.1016 / j.nut.2014.04.012. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
13. Тагучи К., Фукусима Ю., Кишимото Ю., Судзуки-Сугихара Н., Сайта Е., Такахаши Ю., Кондо К. Расчетное потребление полифенолов с пищей и основные источники пищи и напитков среди пожилых японцев. *Питательные вещества.* 2015; 7 : 10269–10281. DOI: 10.3390 / nu7125530. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
14. Ротвелл Дж. А., Перес-Хименес Дж., Невеу В., Медина-Ремон А., М'Хири Н., Гарсиа-Лобато П., Манах К., Нокс К., Эйснер Р., Вишарт Д.С. и др. . Phenol-explorer 3.0: крупное обновление базы данных phenol-explorer для включения данных о влиянии обработки пищевых продуктов на содержание полифенолов. *База данных J. Biol. Базы данных Курирование.* 2013; 2013 : bat070. DOI: 10.1093 / база данных / bat070. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
15. Гу Л., Келм М.А., Хаммерстоун Дж. Ф., Бичер Г., Холден Дж., Хейтовиц Д., Прайор Р. Л. Скрининг пищевых продуктов, содержащих проантоцианидины, и их структурная характеристика с использованием ЖХ-МС / МС и тиолитического разложения. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51 : 7513–7521. DOI: 10.1021 / jf034815d. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
16. Омар С.Х., Скотт С.Дж., Хэмлин А.С., Обид Х.К. Защитная роль растительных биофенолов в механизмах болезни Альцгеймера. *J. Nutr. Biochem.* 2017; 47 : 1–20. DOI: 10.1016 / j.jnutbio.2017.02.016. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
17. Obied НК, Prenzler PD, Omar SH, Ismael R., Servili M., Esposto S., Taticchi A., Selvaggini R., Urbani S. Глава шестая - Фармакология оливковых биофенолов. В: Джеймс К.Ф., редактор. *Успехи молекулярной токсикологии.* Том 6. Эльзевир; Амстердам, Нидерланды: 2012. С. 195–242. [Google Scholar]
18. Knaops KT, de Groot LC, Kromhout D., Perrin AE, Moreiras-Varela O., Menotti A., van Staveren WA Средиземноморская диета, факторы образа жизни и 10-летняя смертность пожилых европейских мужчин и женщин: проект Хейла . *JAMA.* 2004; 292 : 1433–1439. DOI: 10.1001 / jama.292.12.1433. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
19. Софи Ф., Макки К., Аббате Р., Дженсини Г. Ф., Казини А. Средиземноморская диета и здоровье. *Биофакторы.* 2013; 39 : 335–342. DOI: 10.1002 / biof.1096. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
20. Martinez-Lapiscina EH, Clavero P., Toledo E., San Julian B., Sanchez-Tainta A., Corella D., Lamuela-Raventos RM, Martinez JA, Martinez-Gonzalez MA Добавки оливкового масла первого отжима и долгосрочные познание: рандомизированное испытание *preimed-navarra*. *J. Nutr. Старение здоровья.* 2013; 17 : 544–552. DOI: 10.1007 / s12603-013-0027-6. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
21. Контурни АМ, Милона А., Калиора А.С., Андрикопулос Н.К. Биодоступность фенольных соединений плодов (костянок) *olea europaea* (оливок): влияние на антиоксидантный статус плазмы у людей. *Фитомедицина.* 2007; 14 : 659–667. DOI: 10.1016 / j.phymed.2007.06.001. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
22. Омар Ш. Олеуропеин в оливке и его фармакологические эффекты. *Sci. Pharm.* 2010; 78 : 133–154. DOI: 10.3797 / scipharm.0912-18. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
23. Бьянко А., Учелла Н. Биофенольные компоненты оливок. *Food Res. Int.* 2000; 33 : 475–485. DOI: 10.1016 / S0963-9969 (00) 00072-7. [CrossRef] [Google Scholar]

24. Ле Тутур Б., Гедон Д. Антиоксидантная активность листьев оливы европейской и родственных фенольных соединений. *Фитохимия*. 1992; 31 : 1173–1178. DOI: 10.1016 / 0031-9422 (92) 80255-D. [CrossRef] [Google Scholar]
25. Бенавенте-Гарсия О., Кастильо Дж., Лоренте Дж., Ортуньо А., Дель Рио Дж. А. Антиоксидантная активность фенольных соединений, экстрагированных из листьев *Olea europaea* L. *Food Chem*. 2000; 68 : 457–462. DOI: 10.1016 / S0308-8146 (99) 00221-6. [CrossRef] [Google Scholar]
26. Casaburi I., Puoci F., Chimento A., Sirianni R., Ruggiero C., Avena P., Pezzi V. Потенциал фенолов оливкового масла в качестве химиопрофилактических и терапевтических агентов против рака: обзор исследований *in vitro*. *Mol. Nutr. Food Res*. 2013; 57 : 71–83. DOI: 10.1002 / mnfr.201200503. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
27. Obied HK, Prenzler PD, Konczak I, Rehman AU, Robards K. Химия и биоактивность оливковых биофенолов в некоторых антиоксидантных и антипролиферативных биотестах *in vitro*. *Chem. Res. Toxicol*. 2009; 22 : 227–234. DOI: 10.1021 / tx8004168. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
28. Оуэн Р.В., Джакоза А., Халл В.Е., Хаубнер Р., Шпигельхалдер Б., Бартч Х. Антиоксидантный / противораковый потенциал фенольных соединений, выделенных из оливкового масла. *Евро. J. Pak*. 2000; 36 : 1235–1247. DOI: 10.1016 / S0959-8049 (00) 00103-9. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
29. Обид Х.К., Аллен М.С., Бедгуд Д.Р., мл., Пренцлер П.Д., Робардс К. Исследование отходов австралийских оливковых заводов для извлечения биофенолов. *J. Agric. Food Chem*. 2005; 53 : 9911–9920. DOI: 10.1021 / jf0518352. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
30. Чжишен Дж., Менгченг Т., Цзяньмин В. Определение содержания флавоноидов в шелковице и их улавливающее действие на супероксидные радикалы. *Food Chem*. 1999; 64 : 555–559. DOI: 10.1016 / S0308-8146 (98) 00102-2. [CrossRef] [Google Scholar]
31. Камран М., Хэмлин А.С., Скотт С.Дж., Обид Г.К. Сушка при высокой температуре в течение короткого времени максимизирует извлечение биофенолов оливковых листьев. *Ind. Crops Prod*. 2015; 78 : 29–38. DOI: 10.1016 / j.indcrop.2015.10.031. [CrossRef] [Google Scholar]
32. Benzie IF, Strain JJ. Способность плазмы к восстановлению железа (frap) как мера «антиоксидантной силы»: анализ frap. *Анальный. Biochem*. 1996; 239 : 70–76. DOI: 10.1006 / abio.1996.0292. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
33. Xiao Z., Huang C., Wu J., Sun L., Hao W., Leung LK, Huang J. Нейрозащитные эффекты иприфлавона против H₂O₂ и токсичности, вызванной бета-амилоидом, на клетки нейробластомы человека SH-SY5Y. *Евро. J. Pharmacol*. 2013; 721 : 286–293. DOI: 10.1016 / j.ejphar.2013.09.023. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
34. Арчиелло М., Ротилио Г., Росси Л. Медьзависимая токсичность в клетках нейробластомы SH-SY5Y связана с повреждением митохондрий. *Biochem. Биофиз. Res. Commun*. 2005; 327 : 454–459. DOI: 10.1016 / j.bbrc.2004.12.022. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
35. Shi C., Zhao L., Zhu B., Li Q., Yew DT, Yao Z., Xu J. Защитные эффекты экстракта гинкго билоба (egb761) и его составляющих кверцетин и гинкголид В против β-амилоидного пептида - индуцированная токсичность в клетках SH-SY5Y. *Chem. Биол. Взаимодействовать*. 2009; 181 : 115–123. DOI: 10.1016 / j.cbi.2009.05.010. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
36. Chetsawang J., Govitrapong P., Chetsawang B. Токсичность перекиси водорода индуцирует передачу сигналов gas в культивируемых клетках нейробластомы человека SH-SY5Y. *J. Biomed. Biotechnol*. 2010; 2010 г. DOI: 10.1155 / 2010/803815. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
37. Милонаки С., Киассос Э., Макрис Д. П., Кефалас П. Оптимизация экстракции фенольных соединений листьев оливы (*Olea europaea*) с использованием систем растворителей на основе воды / этанола и методологии поверхности отклика. *Анальный. Биоанал. Chem*. 2008; 392 : 977–985. DOI: 10.1007 / s00216-008-2353-9. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
38. Кардосо С.М., Гайот С., Марнет Н., Лопес-да-Силва Дж.А., Ренар CMGC, Коимбра М.А. Характеристика фенольных экстрактов из оливковой мякоти и оливковых жмыхов с помощью масс-спектрометрии с электрораспылением. *J. Sci. Food Agric*. 2005; 85 : 21–32. DOI: 10.1002 / jsfa.1925. [CrossRef] [Google Scholar]

39. Хейс Дж. Э., Аллен П., Брантон Н., О'Грэди М. Н., Керри Дж. П. Фенольный состав и антиоксидантная способность *in vitro* четырех коммерческих фитохимических продуктов: экстракт листьев оливы (*Olea europaea* L.), лютеин, сезамол и эллаговая кислота. *Food Chem.* 2011; 126 : 948–955. DOI: 10.1016 / j.foodchem.2010.11.092. [CrossRef] [Google Scholar]
40. Ниаунакис М., Халвадакис С.П. Управление отходами переработки оливок : обзор литературы и патентный обзор. Эльзевир; Амстердам, Нидерланды: 2006 г. [Google Scholar]
41. Райан Д., Робардс К., Лави С. Определение фенольных соединений в оливках с помощью обращенно-фазовой хроматографии и масс-спектрометрии. *J. Chromatogr. A.* 1999; 832 : 87–96. DOI: 10.1016 / S0021-9673 (98) 00838-3. [CrossRef] [Google Scholar]
42. Контोगианни В.Г., Харисиадис П., Маргианни Э., Ламари Ф.Н., Геротанассис И.П., Цакос А.Г. Экстракты оливковых листьев являются естественным источником передовых ингибиторов конечного продукта гликирования. *J. Med. Еда.* 2013; 16 : 817–822. DOI: 10.1089 / jmf.2013.0016. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
43. Чен Х.Дж., Инбарадж Б.С., Чен Б.Х. Определение фенольных кислот и флавоноидов в *Taraxacum formosanum* Kitam методом жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии в сочетании с методом постколоночной дериватизации. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13 : 260–285. DOI: 10.3390 / ijms13010260. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
44. Саварезе М., Де Марко Э., Сакки Р. Характеристика фенольных экстрактов оливок (*Olea europaea* cv. *Pisciottana*) с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением. *Food Chem.* 2007; 105 : 761–770. DOI: 10.1016 / j.foodchem.2007.01.037. [CrossRef] [Google Scholar]
45. Hamden K., Allouche N., Damak M., Elfeki A. Гипогликемические и антиоксидантные эффекты фенольных экстрактов и очищенного гидрокситирозола из отходов оливковых мельниц *in vitro* и у крыс. *Chem. Биол. Взаимодействовать.* 2009; 180 : 421–432. DOI: 10.1016 / j.cbi.2009.04.002. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
46. Райан Д., Антолович М., Херлт Т., Пренцлер П.Д., Лави С., Робардс К. Идентификация фенольных соединений в тканях нового сорта оливок Hardy's Mammoth. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50 : 6716–6724. DOI: 10.1021 / jf025736p. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
47. Эрреро М., Темирзода Т.Н., Сегура-Карретеро А., Кирантес Р., Плаза М., Ибанез Э. Новые возможности повышения ценности побочных продуктов оливкового масла. *J. Chromatogr. A.* 2011; 1218 : 7511–7520. DOI: 10.1016 / j.chroma.2011.04.053. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
48. Райан Д., Антолович М., Пренцлер П., Робардс К., Лави С. Биотрансформации фенольных соединений в *Olea europaea* L. *Sci Hort.* 2002; 92 : 147–176. DOI: 10.1016 / S0304-4238 (01) 00287-4. [CrossRef] [Google Scholar]
49. Сервили М., Балдиоли М., Селваджини Р., Маччиони А., Монтедоро Г. Фенольные соединения плодов оливы: Одно- и двумерная характеристика ядерно-магнитного резонанса нуклеида и его распределение в составных частях фруктов. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47 : 12–18. DOI: 10,1021 / jf9806210. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
50. Йованович С.В., Стинкен С., Тошич М., Марьянович Б., Симич М.Г. Флавоноиды как антиоксиданты. *Варенье. Chem. Soc.* 1994; 116 : 4846–4851. DOI: 10.1021 / ja00090a032. [CrossRef] [Google Scholar]
51. Д'Имперо М., Кардинали А., Д'Антуоно И., Линсалата В., Минервини Ф., Редан Б.В., Ферруцци М.Г. Стабильность - активность вербаскозида, известного антиоксидантного соединения, при различных рН-условиях. *Food Res. Int.* 2014; 66 : 373–378. DOI: 10.1016 / j.foodres.2014.09.037. [CrossRef] [Google Scholar]
52. Cai W., Chen Y., Xie L., Zhang H., Hou C. Исследование характеристик и теории функциональной плотности антиоксидантной активности кверцетина и его сахаросодержащих аналогов. *Евро. Food Res. Technol.* 2014; 238 : 121–128. DOI: 10.1007 / s00217-013-2091-x. [CrossRef] [Google Scholar]
53. Масуока Н., Мацуда М., Кубо И. Характеристика антиоксидантной активности флавоноидов. *Food Chem.* 2012; 131 : 541–545. DOI: 10.1016 / j.foodchem.2011.09.020. [CrossRef] [Google Scholar]

54. Сон Т.Г., Камандола С., Маттсон М.П. Фитохимические вещества, питательные для гормиков. *Neuromol. Med.* 2008; 10 : 236–246. DOI: 10.1007 / s12017-008-8037-у. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
55. Коннор Дж. Р., Снайдер Б. С., Берд Дж. Л., Файн Р. Э., Муфсон Е. Дж. Региональное распределение железа и железорегулирующих белков в головном мозге при старении и болезни Альцгеймера. *J. Neurosci. Res.* 1992; 31 : 327–335. DOI: 10.1002 / jnr.490310214. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
56. Зекка Л., Юдим МБ, Ридерер П., Коннор Дж. Р., Крайтон Р. Р. Железо, старение мозга и нейродегенеративные расстройства. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004; 5 : 863–873. DOI: 10,1038 / номер 1537. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
57. Ямамото А., Шин Р.В., Хасегава К., Наики Х., Сато Х., Йошимасу Ф., Китамото Т. Железо (iii) индуцирует агрегацию гиперфосфорилированного тау, а его восстановление до железа (ii) меняет агрегацию: Последствия в образовании нейрофибриллярных клубков при болезни Альцгеймера. *J. Neurochem.* 2002; 82 : 1137–1147. DOI: 10.1046 / j.1471-4159.2002.t01-1-01061.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
58. Дайрам А., Фогель Р., Дайя С., Лимсон Дж. Л. Антиоксидантные и связывающие железо свойства куркумина, капсаицина и S-аллицистеина снижают окислительный стресс в гомогенате головного мозга крысы. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56 : 3350–3356. DOI: 10,1021 / jf0734931. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
59. Miller EW, Dickinson BC, Chang CJ Аквапорин-3 опосредует поглощение перекиси водорода, регулируя внутриклеточную передачу сигналов ниже по течению. *Proc. Natl. Акад. Sci. СОЕДИНЕННЫЕ ШТАТЫ АМЕРИКИ.* 2010; 107 : 15681–15686. DOI: 10.1073 / pnas.1005776107. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
60. Биндоли А., Фукуто Дж. М., Форман Х. Дж. Химия тиолов в пероксидазном катализе и окислительно-восстановительной передаче сигналов. *Антиоксид. Редокс-сигнал.* 2008; 10 : 1549–1564. DOI: 10.1089 / ars.2008.2063. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
61. Милтон Н.Г. Роль перекиси водорода в этиологии болезни Альцгеймера: значение для лечения. *Наркотики старения.* 2004; 21 : 81–100. DOI: 10.2165 / 00002512-200421020-00002. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
62. Шен К., Чен Ю., Лю Х., Чжан К., Чжан Т., Лин А., Цзин Н. Перекись водорода способствует выработке абета через jnk-зависимую активацию гамма-секретазы. *J. Biol. Chem.* 2008; 283 : 17721–17730. DOI: 10.1074 / jbc.M800013200. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
63. Jo DG, Arumugam TV, Woo HN, Park JS, Tang SC, Mughal M., Hyun DH, Park JH, Choi YH, Gwon AR, et al. Доказательства того, что γ -секретазы опосредует индуцированную окислительным стрессом экспрессию β -секретазы при болезни Альцгеймера. *Neurobiol. Старение.* 2010; 31 : 917–925. DOI: 10.1016 / j.neurobiolaging.2008.07.003. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
64. Арнал Н., де Аланис М.Дж., Марра К.А. Цитотоксические эффекты перегрузки медью на человеческие клетки легких и печени в культуре. *Биохим. Биофиз. Acta.* 2012; 1820 : 931–939. DOI: 10.1016 / j.bbagen.2012.03.007. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
65. Ватт Н.Т., Хупер Н.М. Ответ нейронов и глиальных клеток на повышенное содержание меди. *Brain Res. Бык.* 2001; 55 : 219–224. DOI: 10.1016 / S0361-9230 (01) 00506-8. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
66. Дин Р., Белл Р.Д., Сагаре А., Злокович Б.В. Клиренс пептида амилоида- β через гематоэнцефалический барьер: значение для терапии болезни Альцгеймера. *CNS Neurol. Disord. Цели наркотиков.* 2009; 8 : 16–30. DOI: 10,2174 / 187152709787601867. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
67. Бандарук Ю., Мукай Р., Терао Дж. Поглощение кверцетина и лютеолина клетками и их влияние на моноаминоксидазу- α в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y. *Toxicol. Rep.* 2014 ; 1 : 639–649. DOI: 10.1016 / j.toxrep.2014.08.016. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
68. Мариани К., Брака А., Виталини С., Де Томмази Н., Визиоли Ф., Фико Г. Характеристика флавоноидов и антиоксидантная активность in vitro *Aconitum anthora* L. (ranunculaceae). *Фитохимия.* 2008; 69 : 1220–1226. DOI: 10.1016 / j.phytochem.2007.12.009. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

69. Brown JE, Khodr H., Hider RC, Rice-Evans CA Структурная зависимость взаимодействий флавоноидов с ионами Cu²⁺ : влияние на их антиоксидантные свойства. Pt 3 Biochem. J. 1998; 330 : 1173–1178. DOI: 10.1042 / bj3301173. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
70. Artajo LS, Romero MP, Morello JR, Motilva MJ Обогащение рафинированного оливкового масла фенольными соединениями: оценка их антиоксидантной активности и их влияние на индекс горечи. J. Agric. Food Chem. 2006; 54 : 6079–6088. DOI: 10.1021 / jf060874q. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
71. Фирузи О., Лаканна А., Петруччи Р., Марросу Г., Сасо Л. Оценка антиоксидантной активности флавоноидов с помощью анализа «восстанавливающая антиоксидантная сила железа» и циклической вольтамперометрии. Биохим. Биофиз. Acta. 2005; 1721 : 174–184. DOI: 10.1016 / j.bbagen.2004.11.001. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
72. Vissers MN, Zock PL, Katan MB Биодоступность и антиоксидантные эффекты фенолов оливкового масла у человека: обзор. Евро. J. Clin. Nutr. 2004; 58 : 955–965. DOI: 10.1038 / sj.ejcn.1601917. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
73. Day AJ, Mellon F., Barron D., Sarrazin G., Morgan MR, Williamson G. Человеческий метаболизм пищевых флавоноидов: Идентификация метаболитов кверцетина в плазме. Свободный Радич. Res. 2001; 35 : 941–952. DOI: 10.1080 / 10715760100301441. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
74. Дельгадо-Пертиньес М., Гомес-Кабрера А., Гарридо А. Прогнозирование питательной ценности оливкового листа (*Olea europaea*): усвояемость и химический состав, исследования *in vitro*. Anim. Feed Sci. Technol. 2000; 87 : 187–201. DOI: 10.1016 / S0377-8401 (00) 00195-4. [CrossRef] [Google Scholar]
75. Омар Ш. Открытие и разработка нейропротекторных агентов из натуральных продуктов. Эльзеvier; Амстердам, Нидерланды: 2018. Глава 4 - Биофенолы: влияние и перспективы открытия лекарств против болезни Альцгеймера а2-брахмачари, гаутам; С. 103–148. [Google Scholar]
76. Линденмайер М., Буркон А., Сомоза В. Новый метод измерения как восстановительной, так и улавливающей активности активности в модельной системе линолевой кислоты. Мол. Nutr. Food Res. 2007; 51 : 1441–1446. DOI: 10.1002 / mnfr.200700210. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
77. Янг И.С., Вудсайд Ю.В. Антиоксиданты в здоровье и болезнях. J. Clin. Патол. 2001; 54 : 176–186. DOI: 10.1136 / jcp.54.3.176. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
78. Лян Н., Китс Д.Д. Антиоксидантные свойства компонентов кофе: оценка методов, определяющих механизмы действия. Молекулы. 2014; 19 : 19180–19208. DOI: 10.3390 / молекулы191119180. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
79. Перейра А.П., Феррейра И.С., Марселино Ф., Валентао П., Андраде П.Б., Сибра Р., Эстевиньо Л., Бенто А., Перейра Дж. А. Фенольные соединения и антимикробная активность оливковых листьев (*Olea europaea* L. Cv. *Cobrançosa*) . Молекулы. 2007; 12 : 1153–1162. DOI: 10.3390 / 12051153. [Бесплатная статья PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]