

京都大学	博士（薬学）	氏名	Qand Agha Nazari
論文題目	Protective effects of luteolin and curcumin on oxidative stress induced by sodium nitroprusside in the brain （ニトロプルシドナトリウム誘発脳内酸化ストレスに対するルテオリンとクルクミンの保護作用）		
<p>Free radicals can cause oxidative damage to several biomolecules in the cells such as proteins, DNA, and lipids, resulting in an increased risk for neurodegenerative diseases. Polyphenolic compounds have been inversely associated with risk of major diseases such as neurodegenerative disease in human. Therefore, there is a need for more investigations about the health benefits and efficacy of polyphenolic compounds. In this study, I established <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> oxidative stress models by sodium nitroprusside (SNP) and then evaluated the protective effects of luteolin and curcumin against oxidative damage. It was found that these compounds had potent protective effects against oxidative stress.</p> <p>Chapter 1: <i>In vivo</i> oxidative stress model induced by microinjection of sodium nitroprusside in mice brain.</p> <p>SNP is a vasodilator substance which releases several potentially toxic products such as cyanide anion, NO and iron during its decomposition. The mechanism of cell death and motor dysfunction induced by microinjection of SNP in mice was investigated to establish a brain oxidative stress model in order to evaluate protective effects of antioxidant substances. Intrastriatal microinjection of SNP (1-10 nmol) induced brain damage and motor dysfunction in a dose-dependent manner when the effects were evaluated with behavior tests and histological analysis. NOC-18 (10 nmol), a NO-donor substance, and KCN (10 nmol) did not cause brain damage and motor dysfunction, but FeCl₂ (10 nmol) caused motor dysfunction. In addition, deferoxamine (10 nmol), an iron-chelating agent, prevented SNP-induced brain damage and motor dysfunction. These results suggest that cell death induced by injection of SNP is caused by iron-related radical reactions, but not by NO and cyanide anion.</p> <p>Chapter 2: Protective effects of luteolin on oxidative stress model induced by microinjection of sodium nitroprusside in mice brain.</p> <p>Previous reports showed that luteolin, a polyphenolic compound has anti oxidant, anti cancer and anti-inflammatory effects. However, there is less report about the effects of luteolin on the central nervous system (CNS) associated with neurologic disorders. I evaluated whether administration of luteolin can protect SNP-induced oxidative damage in mice brain. Luteolin was administered by intrastriatal or oral and brain damage was evaluated by behavior tests and histological analysis. Intrastriatal co-injection of luteolin (3 - 30 nmol) with SNP (10 nmol) dose-dependently prevented brain damage and motor dysfunction. RP-HPLC analysis determined the luteolin level in the plasma which was sufficiently absorbed after oral administration. Oral administrations of luteolin (600 - 1200 mg/kg) dose-dependently protected brain damage and motor dysfunction induced by striatal injection of SNP. Furthermore, luteolin</p>			

(1 - 100 $\mu\text{g/ml}$) showed potent DPPH radical scavenging abilities, when compared to the positive control ascorbic acid and glutathione. Iron chelating assay showed that luteolin has iron chelating activity by higher concentrations (30 – 100 $\mu\text{g/ml}$) when compared with control. These results suggest that luteolin potentially protects mice brain from SNP-induced toxicity by radical scavenging and iron chelating effects.

Chapter 3: Protective effect of curcumin against oxidative stress induced by sodium nitroprusside *in vivo* and *in vitro*.

Curcumin, a polyphenolic compound extracted from *Curcuma longa* has been reported to have several activities such as anti cancer, anti-inflammatory and antioxidant. However, the bioavailability of curcumin is lower by oral administration. I investigated the protective effects of the standard formulation of curcumin (SF-Cur) and nano-formulation of curcumin (NF-Cur) against SNP-induced oxidative damage *in vivo* and *in vitro*. Intrastriatal microinjections of SF-Cur or NF-Cur prevented SNP-induced brain damage and motor dysfunction. Pre-administration of NF-Cur (1 - 3 g containing 100 - 300 mg/kg curcumin, p.o.) for 24 h, dose-dependently protected brain damage and motor dysfunction induced by striatal injection of SNP. However, oral administrations of the same concentrations of SF-Cur did not prevented SNP-induced brain damage and motor dysfunction, suggesting higher bioavailability of NF-Cur following oral administration.

Then, I investigated the protective effects and mechanisms of protective effects of SF-Cur and NF-Cur against SNP-induced damage in rat primary striatal cell culture *in vitro*. Treatment of rat striatal cell culture with SF-Cur or NF-Cur (10 μM) significantly protected SNP-induced cytotoxicity. SF-Cur and NF-Cur (10 μM) significantly elevated intracellular GSH level in the striatal cell culture. However, treatment of cell culture by SNP (300 μM) significantly depleted GSH content of the cells, but curcumin attenuated the SNP-induced GSH depletion. Moreover, SF-Cur (1 - 100 $\mu\text{g/ml}$) showed potent DPPH radical scavenging abilities, when compared to the positive control. Finally, iron chelating assay showed that SF-Cur has iron chelating ability with higher concentrations (10 - 100 $\mu\text{g/ml}$). These results suggest that curcumin protected SNP-induced toxicity, by scavenging and chelating effects.

In summary, I established *in vivo* brain oxidative stress model by SNP-toxicity and found that iron moiety of SNP was involved in cell death induced by SNP. Using this *in vivo* model, I found that luteolin induces a potent protective effect against SNP-toxicity by its radical scavenging and iron chelating effects. Moreover, local administration of SF-Cur and NF-Cur or oral administration of NF-Cur, potentially protected brain damage induced by SNP-toxicity. It is suggested that NF-Cur increases its bioavailability following oral administration.

In conclusion, this study suggests that luteolin and curcumin protected CNS neurons against oxidative stress.

(論文審査の結果の要旨)

フリーラジカルは、タンパク質、DNA、脂質などの細胞内の複数の生体分子に酸化ストレスを引き起こしうる。そのことにより、結果として神経変性疾患のリスクが増加する。ポリフェノール化合物は、そのような神経変性疾患などの主要な疾病のリスクと負に相関している。したがって、ポリフェノール化合物の健康上の利点と有効性についての詳細な検討が必要である。本研究は、ニトロプルシドナトリウム (SNP) による *in vivo* および *in vitro* 酸化的ストレスモデルで確立した後、酸化ストレスに対するルテオリンとクルクミンの保護効果を検討した。これらの化合物は、酸化ストレスに対する強力な保護効果を持っていることが明らかとなった。

SNPは、シアン化物アニオン、NOおよび鉄といった毒性を発揮しうる化合物を遊離する血管拡張物質である。マウスにおけるSNPのマイクロインジェクションにより誘導される細胞死と運動機能障害の機序が、抗酸化物質の保護効果を評価するための脳酸化ストレスモデルを確立するために検討した。線条体へのSNP (1-10 nmol) のマイクロインジェクションは用量依存的に脳障害と運動機能障害を引き起こした。効果は脳損傷と行動試験と組織学的分析を用いて検討した。NOドナーであるNOC-18 (10 nmol) およびKCN (10 nmol) で脳の損傷や運動機能障害が誘発されなかったが、FeCl₂ (10 nmol) は運動機能障害を誘発した。また、鉄キレート剤であるデフェロキサミン (10 nmol) はSNP誘発脳障害および運動機能障害を抑制した。これらの結果は、SNPの注入によって引き起こされる細胞死はNOとシアン化物イオンではなく鉄関連ラジカル反応によって引き起こされることを示唆している。

ポリフェノール化合物であるルテオリンは、抗酸化作用、抗がん作用や抗炎症作用を有することが以前に報告された。しかし、神経疾患に関する中枢神経系 (CNS) のルテオリンの効果についてはあまり報告がない。ルテオリンがSNP誘発性酸化的損傷を保護できるかどうかを評価した。ルテオリンは線条体内または経口で投与し、脳障害は行動学的評価と組織学的分析により評価した。ルテオリン (3 - 30 nmol) とSNP (10 nmol) を同時に線条体に投与すると用量依存的に脳障害と運動機能障害を抑制した。逆相HPLC分析により経口投与したルテオリンは血漿中にて充分量のルテオリンを検出した。ルテオリンの経口投与 (600 - 1200 mg/kg) は、SNPの線条体注入により誘発される脳の損傷や運動機能障害を用量依存的に保護した。さらに、ルテオリン (1-100 µg/ml) は、陽性対照であるアスコルビン酸とグルタチオンと比較してより強力なDPPHラジカル消去能を示した。鉄キレートアッセイによりルテオリンが高濃度 (30 - 100 µg/ml) で鉄キレート活性を有することが示された。これらの結果は、ルテオリンは強力なラジカル消去能と鉄キレート効果によって、SNPによって誘発される毒性からマウスの脳を保護することを示唆している。

クルクミンは、ウコンから抽出されたポリフェノール化合物であり、抗ガン、抗炎症作用や抗酸化作用など、いくつかの活性を有することが報告されている。しかし、経口投与したクルクミンの生物学的利用率は非常に低い。標準クルクミン (SF

-Cur) とナノ粒子化したクルクミン (NF-Cur) のin vivoおよびin vitroでのSNPによって誘発される酸化障害に対する保護作用を検討した。SF-CurまたはNF-Curの線条体へのマイクロインジェクションは、SNP誘発脳障害および運動機能障害を抑制した。24時間の前処置によって、NF-Curは用量依存的にSNPの線条体注入による脳障害および運動機能障害誘発を抑制した。しかし、同じ濃度のSF-Curの経口投与は、SNP誘発脳損傷および運動機能障害を抑制しなかった。このことは経口投与後のNF-Curの高い生物学的利用能を示唆している。

次に、in vitroでのラット初代線条体培養細胞におけるSNP誘発損傷に対するSF-CurおよびNF-Curの保護作用とそのメカニズムを検討した。SF-CurまたはNF-Curはラット線条体培養細胞におけるSNP誘発細胞毒性を有意に抑制した。SF-CurまたはNF-Curは細胞内GSHレベルを有意に上昇させた。また、SF-Curは、強力なDPPHラジカル消去能を示した。最後に、鉄キレートアッセイによって、SF-Curが高濃度の場合鉄キレート能を有することが示された。これらの結果は、クルクミンがラジカル消去能およびキレート作用により、SNP誘発毒性を保護することを示唆している。

要約すると、SNPによって誘発されるin vivo脳酸化ストレスモデルを確立し、SNPによる毒性は、鉄部分が重要な役割を果たしていることを明らかにした。in vivoモデルにおいてルテオリンは、そのラジカル消去と鉄キレート効果によってSNP毒性に対して強力な保護作用を示した。また、NF-Curの経口投与は、SNPによって誘導される毒性を強力に保護することを明らかにした。それは、NF-Curが経口投与後のバイオアベイラビリティが高いことを示唆している。結論として、本研究では、ルテオリンやクルクミンが酸化ストレスに対して中枢ニューロンを保護することを示唆している。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成25年2月25日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降