

**EFFECTS OF IRON AND OXIDATIVE STRESS IN SK-N-SH
DOPAMINERGIC NEUROBLASTOMA CELLS: MODEL OF
PARKINSON'S DISEASE**

PATCHAREE KOONCUMCHOO

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (NEUROSCIENCE)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005**

**ISBN 974-04-5642-1
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

ผลกระทบของเหล็กและ Oxidative stress ในเซลล์ประสาทโดปามีน SK-N-SH แบบจำลองของโรคพาร์กินสัน (EFFECTS OF IRON AND OXIDATIVE STRESS IN SK-N-SH DOPAMINERGIC NEUROBLASTOMA CELLS: MODEL OF PARKINSON'S DISEASE)

พัชรี คุณคำชู 4336523 STNS/D

ปร.ด. (ประสาทวิทยาศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ปิยะรัตน์ โกวิททรงศ์, Ph.D., MUNUCHAIR EBADI, Ph.D., นัยพินิจ คชภักดี, Ph.D., บัณฑิต เจตน์สว่าง, Ph.D.

บทคัดย่อ

ปริมาณของเหล็กอิสระที่มีมากผิดปกติ เป็นอาการบ่งชี้อย่างหนึ่งถึงความผิดปกติและอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสื่อมของเซลล์ประสาทภายในสมอง ความเสื่อมดังกล่าวนี้สามารถก่อให้เกิดความผิดปกติขึ้นได้มากมายรวมทั้งความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน การเกิดภาวะ oxidative stress และปริมาณของเหล็กอิสระที่มีมากเกินไปอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคพาร์กินสัน แต่ก็ยังไม่มีผู้ทราบแน่ชัดว่าความเสื่อมดังกล่าวเกิดขึ้นก่อนหรือหลังภาวะ oxidative stress ในการศึกษาแบบจำลองของโรคพาร์กินสันด้วยเซลล์ประสาทโดปามีนของมนุษย์ชนิด SK-N-SH พบว่าปริมาณของเหล็กที่มีความเข้มข้นสูง (100-250 μM FeSO_4) สามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อไขมันและทำให้เซลล์ตายมากขึ้น ความผิดปกติดังกล่าวนี้สามารถแก้ไขให้น้อยลงด้วยสาร DFO ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่กำจัดเหล็กอิสระ ในทางตรงกันข้ามคือในสภาวะที่ปราศจากเหล็กนั้น สาร DFO กลับก่อให้เกิดผลเสียมากกว่าผลดี โดยจะส่งผลทำให้เกิดการหลุดสั้นของโครมาติน ทำให้เกิดความผิดปกติในการทำงานและนำไปสู่การตายของเซลล์ได้เช่นกัน นอกจากนั้นเหล็กอิสระยังทำให้เกิดกระตุ้นการทำงานของ caspase-3 มากขึ้น ส่งผลให้มีการเพิ่มปริมาณการทำงานของ transcription factor (NF- κ B) มากขึ้น ในขณะที่โปรตีนที่ทำหน้าที่ช่วยป้องกันอันตรายให้แก่เซลล์อย่างโปรตีน Bcl-2 กลับมีปริมาณลดลง แต่เหล็กไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของโปรตีน Bax ในขณะที่เดียวกันเหล็กยังกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มขึ้นของสารต้านอนุมูลอิสระอย่าง glutathione และ metallothionein อีกด้วย จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเซลล์แสดงให้เห็นว่าเหล็กที่มีความเข้มข้น 50-100 μM จะส่งผลกระทบต่อไมโทคอนเดรีย ทำให้เกิดการฉีกขาดของผนังนิวเคลียสและมีการเคลื่อนย้าย α -synuclein จากบริเวณรอบๆนิวเคลียสเข้าไปยังภายในนิวเคลียสที่เกิดการฉีกขาด ทำให้เซลล์ตายเพิ่มมากขึ้น ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าปริมาณเหล็กอิสระที่มีมากเกินไปในเซลล์ สามารถก่อให้เกิดภาวะ oxidative stress และก่อให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์ได้ แต่ความเสียหายดังกล่าวนี้สามารถป้องกันได้ด้วยสาร DFO แต่หากปราศจากเหล็กอิสระ สาร DFO กลับให้โทษและทำให้เซลล์ตายได้

EFFECTS OF IRON AND OXIDATIVE STRESS IN SK-N-SH DOPAMINERGIC NEUROBLASTOMA CELLS: MODEL OF PARKINSON'S DISEASE

PATCHAREE KOONCUMCHOO 4336523 STNS/D

Ph.D.(NEUROSCIENCE)

THESIS ADVISORS: PIYARAT GOVITRAPONG, Ph.D., MUNUCHAIR EBADI, Ph.D., NAIPHINICH KOTCHABHAKDI, Ph.D., BANTHIT CHETSAWANG, Ph.D.

ABSTRACT

Parkinson's disease is one of the progressive neurodegenerative diseases, which is caused by an abnormal accumulation of iron in the affected brain areas. Parkinson's disease involves in the degeneration of dopaminergic neurons. Oxidative stress and transition metal, iron, have been linked to the Parkinson's disease pathogenesis. However, it is difficult to determine if oxidative stress is a cause or consequence of the degeneration process. By using SK-N-SH, a human dopaminergic neuroblastoma cell line, it was found that 100-250 μM FeSO_4 decreased cell viability, induced reactive oxygen species (ROS) production, and increased lipid peroxidation. These effects were reduced by 10 μM deferoxamine (DFO). Simultaneously, glutathione and metallothionein levels were increased in order to counteract the toxicity effects of FeSO_4 . Furthermore, DFO, in the absence of FeSO_4 , enhanced the levels of cellular adenosine triphosphate (ATP), but caused cell damage, chromatin condensation, and cell death. Morphological study revealed that FeSO_4 (50-100 μM) altered mitochondrial morphology, disrupted the nuclear membrane, and translocated α -synuclein from the perinuclear region into the disrupted nucleus. Moreover, FeSO_4 (100 μM) increased the transcription factor, NF- κB , levels and induced the activation of caspase-3 activity. Apoptotic protein studies showed a decrease in anti-apoptotic Bcl₂ protein levels, but not pro-apoptotic Bax protein levels.

The results of these studies suggest that excess FeSO_4 produces numerous reactive oxygen species that counteract with increased glutathione and metallothionein levels. These changes produce an oxidative stress environment, damaging the cells by disrupting mitochondrial functions, decreasing ATP, including lipid, protein, and DNA damage. DFO, an iron chelator, was able to reduce and attenuate iron-mediated oxidative stress. Unfortunately, in the absence of excess FeSO_4 , DFO itself had deleterious effects on the cell morphology and hence integrity of dopaminergic neurons. Moreover, FeSO_4 caused cell death by increasing NF- κB levels, decreasing Bcl₂ levels, and increasing caspase-3 activity. These results indicate that oxidative stress induced by FeSO_4 lead to cell damage and cell death via the apoptotic pathway.

**KEY WORDS: PARKINSON'S DISEASE / OXIDATIVE STRESS / IRON /
DEFEROXAMINE / ANTIOXIDANT**

121 P. ISBN 974-04-5642-1