

Thesis Title	Influence of Bilirubin and Cationic Metal Ion Interactions on DNA Degradation <i>in vitro</i>
Author	Miss Pichayanut Poolperm
Degree	Master of Science (Medical Technology)
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Rujapa Nimsung

ABSTRACT

Background: Bilirubin was long considered a useless metabolite of heme catabolism, responsible for the clinical manifestation of jaundice, and potentially toxic in high doses, particularly in neonates. Very high levels of bilirubin in the blood stream can cause permanent damage to certain areas of the brain of newborn infants (kernicterus). Early studies established that bilirubin induced a form of neurotoxicity known as kernicterus. Neuronal death results from either necrosis or apoptosis. The possible mechanisms of bilirubin toxicity on the brain via *in vitro* studies were investigated.

Objectives: The purpose of this study was to investigate the effect of bilirubin, cationic metal ions and the factors involved in the degradation of DNA *in vitro* and to investigate the possible mechanism of DNA degradation by bilirubin in the presence of interacting metal ions.

Methods and Results: The study was performed by observing the changes in absorption spectra of the interactions between unconjugated bilirubin (UCB) and 3

types of cationic transition metal ions; Cu(II), Fe(II) and Zn(II). The characteristics of the absorption spectra, such as change or decrease in the absorbance peak, indicated an interaction of UCB with metal ions. The interaction of UCB with Cu(II) resulted in the formation of a complex which shifted the absorbance peak of bilirubin from 424 nm to 343 nm, along with two intermediate products which absorbed highest at 594 and 644 nm, respectively. The interaction of Cu(II) to form a complex with UCB was dependent on the bilirubin concentration. Zn(II) or Fe(II) could form a complex with UCB, but the amounts formed were lower than that observed with Cu(II). In order to confirm that Cu(II) could form a complex with UCB, the effect of polyphenolic flavonoid quercetin, which has been reported to form a complex with Cu(II), was determined to compare the nature of the interaction of Cu(II) with UCB. When the complex is formed an absorbance peak of quercetin-CuCl₂ at 432 nm was obtained (bilirubin-quercetin absorbs at 384 nm). Study of the effect of albumin on the interaction of UCB with metal ions simulated the etiology of neonatal hyperbilirubinemia. A ratio of albumin : bilirubin less than 1:1 in the circulation resulted in excess UCB, which could enter the brain cells. At a 0.5: 1 albumin-bilirubin ratio, there was an excess of bilirubin molecules, which could form complex with transition metal ions, especially at high concentrations of CuCl₂, e.g. 500 μM. In the latter case, a decrease in the absorbance peak of bilirubin was obtained.

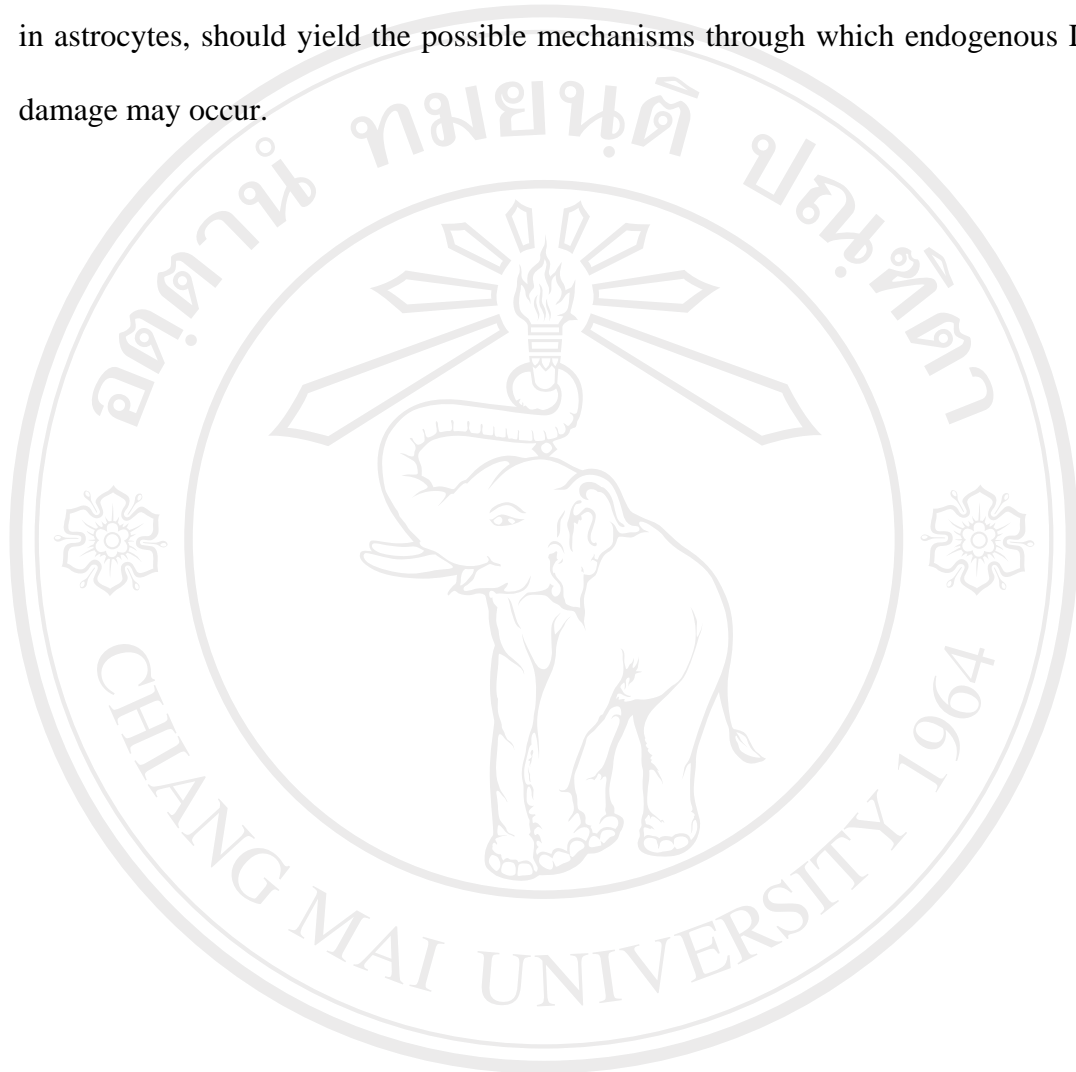
The interaction of bilirubin with transition metal ions can cause oxidative DNA damage. In the present study, we investigated the effect of transition metal ion complex with UCB on DNA degradation. Bilirubin-Cu(II) complex generated a dose dependent increase in DNA degradation. A similar increase in acid soluble DNA hydrolysis detected by diphenylamine reaction was also observed; this was correlated

with the DNA degradation patterns. Bilirubin-Cu(II) complex generated time dependent increase in DNA degradation when DNA was incubated with various concentrations of bilirubin and Cu(II) for 4-48 hours. The maximum degradation was at 48 hours after incubation at 37 °C in the reaction mixtures containing 200 µg calf thymus DNA, 200 µM of bilirubin and 200 µM of Cu(II), respectively.

Mechanism of bilirubin interaction with metal ion influenced DNA degradation was investigated *in vitro*. DNA degradation in cells has been thought to be caused by the reactive oxygen species produced by the lipid peroxidation process. In this study, the mechanism of DNA degradation *in vitro* caused by UCB interacting with the transition metal ions was proposed to occur through the generation of reactive oxygen species. The rate of formation of hydroxyl radicals was measured by Thyobarbituric acid (TBA) reaction (Malondialdehyde, MDA assay). The results were reflected in patterns of DNA degradation, % DNA hydrolysis and the MDA concentrations. Confirmation of free radical generation by bilirubin-transition metal ion causing DNA degradation *in vitro* was demonstrated by the inhibition effect of free radical scavengers sodium azide, thiourea and mannitol. The most potent free radical scavenger that could inhibit DNA breakage was thiourea. The MDA concentrations of the reactions of bilirubin-Cu(II), bilirubin-Fe(II) and bilirubin-Zn(II) were 29.0, 16.0 and 12.3 µM, respectively.

Conclusion and Discussion: Bilirubin and cationic metal ion interactions, Cu(II), Fe (II) and Zn (II), can cause DNA degradation *in vitro*. Mechanism of DNA degradation were bilirubin and cationic metal ion complexes that produced hydroxyl radicals, causing DNA damage. This results suggest a possible mechanism of DNA damage in brain cells, via hyperbilirubinemia in newborns, since some cationic metal ions such as

copper, iron and zinc have been reported to be play specific roles in the central nervous system. Further study for *in vivo* investigations in biologically active systems, such as in astrocytes, should yield the possible mechanisms through which endogenous DNA damage may occur.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ อิทธิพลของการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างบิลิรูบินและโลหะประจุ
บวกทำให้ ดี เอ็น เอ แตกสลายในหลอดทดลอง

ผู้เขียน นางสาวพิชญานุช พูลเพิ่ม

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.รุจจาภา นิมสังข์

บทคัดย่อ

ภูมิหลัง: บิลิรูบินเป็นสารที่ไม่มีประโยชน์ที่ได้จากกระบวนการสลายตัวของเม็ดเลือดแดง บิลิรูบินเป็นสารที่แสดงถึงสถานะดีซ่าน โดยบิลิรูบินที่มีปริมาณสูงมากในซีรัมจะทำให้เกิดพิษต่อร่างกาย โดยเฉพาะทารกแรกคลอด บิลิรูบินที่มีระดับสูงในกระแสเลือดทำให้สมองของทารกแรกคลอดบางส่วนถูกทำลายได้อย่างถาวรหรือ เคอร์นิคเตอร์ส (kernicterus) จากผลการวิจัยก่อนหน้านี้พิสูจน์ว่าบิลิรูบินเหนี่ยวนำให้ระบบประสาทเกิดภาวะความเป็นพิษซึ่งรู้จักกันในชื่อว่าเคอร์นิคเตอร์ส โดยพบว่าการตายของเซลล์ประสาทอาจเป็นผลเนื่องมาจาก necrosis หรือไม่ก็ apoptosis อย่างไรก็ตามจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาลึกลงไปถึงความเป็นไปได้ที่บิลิรูบินจะทำให้เกิดพิษต่อสมอง โดยทำการศึกษากายในหลอดทดลองถึงผลกระทบของความเป็นพิษและปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาถึงผลกระทบของบิลิรูบิน โลหะประจุบวก และปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการทำให้ DNA เกิดการแตกสลายได้ในหลอดทดลอง และเพื่อศึกษาถึงกลไกที่เป็นไปได้ของบิลิรูบินที่ทำปฏิกิริยากับโลหะประจุบวกแล้วทำให้ DNA เกิดการแตกทำลายภายในหลอดทดลอง

วิธีการทดลองและผลการทดลอง: ในการศึกษานี้ได้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นจาก Unconjugated bilirubin (UCB) ทำปฏิกิริยากับโลหะประจุบวก ซึ่งได้แก่ Cu(II), Fe(II) และ Zn(II) โดยค่าการดูดกลืนแสงนี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงหรือมีค่าการดูดกลืนแสงลดลง ซึ่งใช้เป็นตัวที่แสดงถึงการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง UCB กับโลหะประจุบวก เมื่อ UCB กับโลหะประจุบวกมีการทำปฏิกิริยากันจะทำให้เกิดสารประกอบใหม่ ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนไปจากที่ 424 นาโน-

เมตรเป็น 343 นาโนเมตร และยังให้สารประกอบอื่นๆอีกที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ 594 และ 644 นาโนเมตร การทำปฏิกิริยาของบิลิรูบินกับ Cu(II) แล้วทำให้เกิดสารประกอบนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของบิลิรูบิน จากการศึกษาที่ยังพบว่า Fe(II) และ Zn(II) สามารถเกิดสารประกอบกับ UCB ได้เช่นเดียวกับที่เกิดในปฏิกิริยาของบิลิรูบินและ Cu(II) และในการยืนยันว่า Cu(II) สามารถทำปฏิกิริยากับ UCB แล้วทำให้เกิดสารประกอบได้นั้น อาศัยผลของ polyphenolic flavonoid quercetin ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้แล้วว่าสามารถเกิดสารประกอบกับ Cu(II) ได้ โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยาของบิลิรูบินและ Cu(II) ที่มี quercetin พบว่าสารประกอบของ quercetin กับ Cu(II) ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 432 นาโนเมตร (สารประกอบของ quercetin กับ UCB ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 384 นาโนเมตร) จากการศึกษาถึงผลกระทบของอัลบูมินที่มีต่อปฏิกิริยาของบิลิรูบินและโลหะประจุบวกเป็นการจำลองสภาวะความเจ็บป่วยที่เกิดในเด็กทารกแรกคลอดที่มีบิลิรูบินสูงในกระแสเลือด ในกระแสเลือดที่มีอัลบูมินในอัตราส่วนของบิลิรูบินน้อยกว่า 1.0 จะทำให้มีปริมาณ UCB ในกระแสเลือดมากเกินไปแล้วสามารถเข้าสู่เซลล์ประสาทในสมองได้ ในการศึกษาที่มีอัลบูมินในอัตราส่วนต่อบิลิรูบินเป็นโมลาร์เท่ากับ 0.5 ต่อ 1.0 พบว่ามีโมเลกุลของบิลิรูบินที่มากเกินไปทำให้สามารถจับกับโลหะประจุบวกโดยเฉพาะกับ CuCl_2 ได้

อิทธิพลของบิลิรูบินที่ทำปฏิกิริยากับโลหะประจุบวกแล้วทำให้ DNA เกิดแตกสลายจากภาวะ oxidation ได้ ซึ่งจากผลการศึกษารุ่นนี้ได้อธิบายถึงผลการทำปฏิกิริยาของโลหะประจุบวกกับบิลิรูบินแล้วทำให้ DNA เกิดการแตกสลาย โดยพบว่าทั้งบิลิรูบินและ Cu(II) ที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยานี้สามารถทำให้ DNA เกิดการแตกสลายมากขึ้นด้วย และยังพบปริมาณ DNA ที่ถูก hydrolyze มากขึ้นเมื่อตรวจด้วยปฏิกิริยาของ diphenylamine ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับลักษณะของ DNA ที่มีการแตกสลาย สารประกอบของบิลิรูบินและ Cu(II) ทำให้ DNA มีการแตกสลายเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการอุ่น (incubate) ของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ซึ่งในการทดลองนี้ได้ทดลองอุ่นปฏิกิริยาดัง 4-48 ชั่วโมง เมื่ออุ่นปฏิกิริยาที่มี calf thymus DNA 200 μg บิลิรูบิน 200 μM และ Cu(II) 200 μM ที่ 37 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมงจะพบว่า DNA มีการแตกสลายสูงที่สุด

สำหรับการศึกษาดังกล่าวการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างบิลิรูบินและโลหะประจุบวกทำให้ ดีเอ็นเอ แตกสลายในหลอดทดลอง พบว่าจากกลไกการแตกสลายของ DNA ภายในเซลล์มีสาเหตุมาจาก reactive oxygen species จากกระบวนการของ lipid peroxidation ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาดังกล่าวที่ทำให้ DNA แตกสลายในหลอดทดลองที่มีสาเหตุมาจากการทำปฏิกิริยาระหว่างบิลิรูบินและโลหะประจุบวกแล้วทำให้เกิด reactive oxygen species ซึ่งทำการศึกษาอัตราการเกิด hydroxyl radicals ด้วยการวัดจากปฏิกิริยาของ thiobarbituric acid (malondialdehyde, MDA assay) จากผลการศึกษาทั้งหมดให้ผลสอดคล้องกันทั้งลักษณะการแตกสลายของ DNA ปริมาณการ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง: การมีปฏิสัมพันธ์ของบิลิรูบินและโลหะประจุบวก ซึ่งได้แก่ Cu(II), Fe(II) และ Zn(II) สามารถทำให้ DNA แตกสลายได้ในหลอดทดลอง ซึ่งกลไกที่ทำให้ DNA เกิดการแตกสลายนั้นมาจากสารประกอบที่เกิดจากบิลิรูบินทำปฏิกิริยากับ Cu(II) แล้วทำให้ได้เป็น hydroxyl radical ไปทำให้ DNA เกิดการแตกสลาย โดยผลการศึกษานี้ได้เสนอแนะถึงกลไกที่อาจเป็นไปได้ ที่ทำให้ DNA เกิดการแตกสลายในเซลล์ประสาทที่เกิดจากการมีบิลิรูบินสูงในกระแสเลือดของทารกแรกคลอด นับตั้งแต่พบว่าโลหะประจุบวกซึ่งได้แก่ copper, iron และ zinc มีหน้าที่สำคัญต่อระบบประสาท การศึกษาเพิ่มเติมในร่างกาย เช่น ศึกษาในเซลล์ประสาท astrocytes จะทำให้ทราบถึงกลไกความเป็นไปได้ที่ทำให้ DNA แตกสลายภายในร่างกายได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved