



*UTICAJ LITIJUM SULFATA NA ŠENONOVU ENTROPIJU
HROMATINA KOD LIMFOCITA*

**THE INFLUENCE OF LITHIUM SULPHATE ON SHANNON
ENTROPY IN LYMPHOCYTE CHROMATIN**

Marta Jeremić, Igor Pantić, Mila Jakšić

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za medicinsku fiziologiju, Laboratorija za celularnu fiziologiju, Beograd, Srbija

Correspondence: marta.jeremic@gmail.com

Abstract

Introduction: Lithium affects numerous signal pathways in cells, which may ultimately lead to either increased or decreased gene expression in cell nuclei. However, effects of lithium on higher level of gene organization in the nuclei, like chromatin, is still poorly understood.

Aim: To investigate the effects of lithium on chromatin organization in the nuclei of lymphocytes by investigating changes in Shannon entropy of chromatin in these cells.

Material and Methods: Peripheral blood was treated with lithium sulphate until lithium concentrations of 1 mmol/l, 2 mmol/l i 3 mmol/l was not reached. The smears were fixed with methanol and stained by Felgen method for DNK visualization. Cells in the smear were treated with hydrochloric acid for 120 min. Schiff reagent was used for staining for 120 min and smear washing was done with 6 ml of 10% of water solution of natrium metabisulfite. After staining, digital micrographs for each of the most representative sample of 30 lymphocytic chromatin structures were made. Shannon entropy was calculated by converting micrograph in the format of textual numerical string. Lymphocyte chromatin was also analyzed by textural method analysis.

Results: Treatment with 1 mmol/l of lithium sulphate did not lead to a statistically significant increase in entropy values ($p > 0.05$). However, in samples where the concentration of lithium was 2 i 3 mmol/l, respectively, there was a statistically significant increase in entropy ($p < 0.05$). Also, a statistically significant and dose-dependent linear trend of an increase of chromatin entropy was detected in samples ($p < 0.05$). After lithium sulphate treatment, neither the mean value of angular second moment lymphocyte chromatin in control sample nor the inverse moment of the difference of treated lymphocytes changed ($p > 0.05$).

Conclusion: Lithium sulphate in peripheral blood lymphocytes causes dose-dependent increase in Shannon chromatin entropy, which is not followed with similar changes in a textural chromatin parameters.

Keywords:

lithium,
chromatin,
lymphocytes,
Shannon entropy



Sažetak

Uvod: Litijum utiče na brojne signalne puteve u ćelijama. Oni mogu pokrenuti niz fosforilacija enzima koji konačno dovode do povećane ili smanjene ekspresije gena u ćelijskom jedru. Međutim, efekat litijuma na više nivoe genske organizacije u jedru, poput hromatina još uvek nije dovoljno izučen.

Cilj: Određivanje uticaja litijuma na hromatinsku organizaciju u jedru limfocita putem ispitivanja promena Šenonove entropije hromatina u ovim ćelijama.

Materijal i metode: Periferna krv tretirana je litijum sulfatom dok se nisu postigle koncentracije litijuma od 1 mmol/l, 2 mmol/l i 3 mmol/l. Napravljeni razmazi su fiksirani metanolom i obojeni *Felgen* metodom za DNK vizualizaciju. Čelije u razmazu su tretirane sa HCl u trajanju od 120 min. *Schiff*-ov reagens je korišćen u procesu bojenja u trajanju od 120 min i ispiranje razmaza je obavljeno 3 puta po 5 min sa 6 ml 10% vodenog rastvora natrijum metabisulfita. Nakon bojenja, odabran je reprezentativni uzorak od 30 limfocitnih hromatinskih struktura i za svaku strukturu je napravljen digitalni mikrograf. Kao i u našim prethodnim studijama, Šenonovu entropiju smo računali tako što se mikrograf konvertuje u format tekstnog numeričkog stringa. Hromatin limfocita je još analiziran uz pomoć metode teksturalne analize.

Rezultati: Tretman litijum sulfatom (1 mmol/l) nije doveo do povećanja vrednosti entropije koje je bilo statistički signifikantno ($p > 0,05$). Ipak, u uzorcima u kojima je koncentracija litijuma bila 2 i 3 mmol/l, došlo je do statistički značajnog povećanja entropije ($p < 0,05$). Detektovan je takođe statistički značajan dozno-zavisni linearni trend povećanja hromatinske entropije u uzorcima ($p < 0,05$). Nakon tretmana litijum sulfatom, srednja vrednost angularnog drugog momenta hromatina limfocita u kontrolnom uzorku se nije statistički značajno promenila ($p > 0,05$). Takođe, ni inverzni momenat razlike tretiranih limfocita nije se značajno menjao ($p > 0,05$).

Zaključak: Litijum sulfat kod limfocita periferne krvi izaziva dozno zavisno povećanje hromatinske Šenonove entropije, a što nije praćeno sličnim promenama u teksturalnim parametrima hromatina.

Ključne reči:

litijum,
hromatin,
limfociti,
Šenonova entropija

Uvod

Litijum sulfat je litijumova so sumporne kiseline. Iako rastvorljiv u vodi, rastvorljivost litijuma se smanjuje sa povećavanjem temperature. Zahvaljujući svojim piezoelektričnim, hidroskopskim i piroelektričnim svojstvima, on ima višestruku primenu kako u tehnološkim, tako i u medicinskim naukama (1). U medicini, on se koristi u psihijatriji u tretmanu manija, endogenih depresija i psihoza, a takođe i u tretmanu shizofrenije (2). Litijum sulfat se rapidno apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta, za svega nekoliko minuta, ali zahteva do 10 dana da bi se pravilno rasporedio u organizmu (2). Litijum dovodi do mnogih metaboličkih i neuroendokrinih promena, ali detaljan mehanizam ovih promena nije jasan. Moguća objašnjenja uključuju interakciju sa neurotransmiterima, naročito serotoninom i norepinefrinom. U centralnom nervnom sistemu, on utiče na nervnu ekscitaciju, sinaptičku transmisiju i metaboličke procese u neuronima.

Kada se koristi kao lek u psihijatriji, litijum kao neželjeno dejstvo izaziva leukocitozu. Ova promena u krvnoj slici je uglavnom benignog karaktera i ne zahteva dodatne terapijske intervencije. Zbog sposobnosti da poveća proizvodnju leukocita u kostnoj srži, pojedini autori predlažu korišćenje litijuma kao terapijskog sredstva u tretmanu leukopenije izazvane različitim spoljašnjim i unutrašnjim faktorima. Za sada nije poznato na koji način litijum deluje na ćelije bele krvne loze (3).

Litijum utiče na brojne signalne puteve u ćelijama.

Na primer, aktivacija putem G proteina i cikličnog AMPa može biti modulirana litijumom. Takođe, ovaj element može dovesti do pokretanja signalnog puta preko inozitol 3 fostata i diacil glicerola. Svi ovi putevi mogu pokrenuti niz fosforilacija enzima koji konačno dovode do povećane ili smanjene ekspresije gena u ćelijskom jedru. Međutim, efekat litijuma na više nivoe genske organizacije u jedru, poput hromatina još uvek nije dovoljno izučen (4,5).

U ovom radu, prezentujemo rezultate koji ukazuju da litijum značajno utiče na hromatinsku organizaciju u jedru limfocita, tako što dovodi do povećanja Šenonove entropije hromatina u ovim ćelijama. Ovo je prva studija u svetu koja je pokazala da litijum ima modulatornu ulogu na hromatinsku arhitekturu u ćelijama imunskog sistema.

Materijal i metode

Protokol i *Felgen* bojenje

Periferna krv prethodno tretirana heparinom, i inkubirana na 37°C sa dodatkom RPMI medijuma, tretirana je litijum sulfatom dok se nisu postigle koncentracije litijuma od 1 mmol/l, 2 mmol/l i 3 mmol/l. Zatim su napravljeni razmazi na predmetnom staklu, koji su fiksirani metanolom nakon čega se pristupilo bojenju *Felgen* metodom za DNK vizuelizaciju. Čelije u razmazu su tretirane sa hlorovodoničnom kiselinom u trajanju od 120 min i *Schiff*-ovim reagensom sa baznim fuksinom i natrijum metabisulfatom, takođe u trajanju od 120 min. Čelije su

oprane 3 puta po 5 min sa 6 ml 10% vodenog rastvora natrijum metabisulfita. *Felgen* bojenje je specijalna histološka tehnika koja se poslednjih godina relativno često koristi za identifikaciju i kvantifikaciju DNK u jedru (6). DNK molekul se hidrolizuje tokom ovog procesa, i hromatin je obojen bledom crvenom bojom. Citoplazma i međućeljski prostor su obično obojeni zeleno (**Slika 1**).



Slika 1. Limfocit obojen Felgen metodom.

U našoj studiji, nakon bojenja, odabran je reprezentativni uzorak od 30 limfocitnih jedara. Digitalni mikrofotografiji ćelija su napravljeni uz pomoć DEM 200 digitalne kamere za mikroskop sa CMOS 1/3 (DC 5V / 250 mA) senzorom (*Oplenic Optronics*, Hangzhou, Kina). Senzor je montiran na *Olympus CX21FS1* binokularni mikroskop (1000 x uvećanje). Polja od interesa (*regions of interest, ROI*) hromatinskih struktura su označena u specijalnom softveru *ImageJ* (Nacionalni institut za zdravlje, *Bethesda, Maryland*). Analiza regiona od interesa je obavljena direktno sa mikrofotografom bez dodatne obrade poput kropovanja/segmentovanja. Pojediničnosti vezane za formiranje i obradu mikrofotografom (7,8) su prethodno objavljene.

Analiza Šenonove entropije i teksturalna analiza hromatina

Šenonova entropija (H) predstavlja meru informacione neuređenosti biološkog sistema (9). Računa se tako što se mikrofotograf, odnosno dvodimenzionalni objekat konvertuje u format tekstnog numeričkog stringa, a na osnovu sledeće formule:

$$H = - \sum_x p(x) \log [p(x)]$$

Gde p predstavlja verovatnoću nalaženja varijable x u seriji stringova u skriptu. Računanje entropije je izvršeno po ugledu na prethodno publikovane studije (8,10).

Kao dodatak studiji, korišćena je teksturalna analiza hromatina limfocita. Tokom ove metode, formira se specijalni matematički matriks vrednosti rezolucionih jedinica sivog spektra, primenom takozvanog *Gray Level Co-occurrence Matrix (GLCM)* matematičkog algoritma.

U GLCM algoritmu, svakoj individualnoj rezolucionoj jedinici je dodeljena numerička vrednost imajući u vidu intenzitet sive boje u 8-bit formatu. Koristeći matriks vrednosti rezolucionih jedinica i metoda statistike drugog reda određuju se GLCM angularni drugi momenat (indikator uniformnosti) i inverzni momenat razlike (indikator homogenosti). Ovi parametri se računaju na osnovu sledećih matematičkih formula:

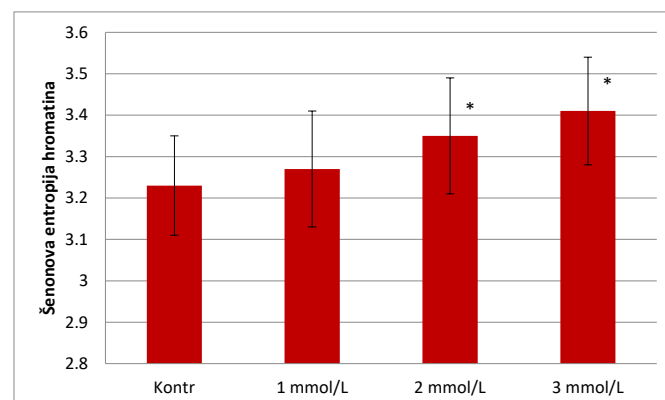
$$\text{Angularni drugi momenat} = \sum_i \sum_j \{p(i,j)\}^2$$

$$\text{Inverzni momenat razlike} = \sum_i \sum_j \frac{1}{1+(i-j)^2} p(i,j)$$

gde su i i j koordinate matrice, σ i μ aritmetička sredina odnosno standardna devijacija numeričkih vrednosti dodeljenih rezolucionim jedinicama. Teksturalni parametri su izračunati na sličan način kao u prethodno publikovanim radovima (7,8,10). GLCM analiza jedara je urađena korišćenjem programa za *ImageJ* u okviru MATLAB softverskog koda (*MathWorks, Natick, Massachusetts, USA*). Za statističku analizu, korišćen je test ANOVA u SPSS statističkom softveru (*v. 10; SPSS Inc., Chicago, IL, SAD*).

Rezultati

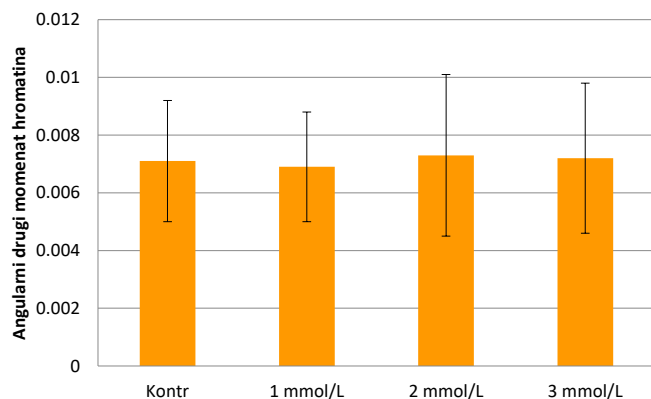
Prosečna vrednost Šenonove entropije hromatina netretiranih (kontrolnih) limfocita iznosila je $3,23 \pm 0,12$. Nakon tretmana litijum sulfatom (1 mmol/l), vrednost entropije se povećala na $3,27 \pm 0,14$, međutim, ovo povećanje nije bilo statistički signifikantno ($p > 0,05$). U uzorcima u kojima je koncentracija litijuma bila 2 i 3 mmol/l, došlo je to statistički značajnog povećanja entropije na vrednosti $3,35 \pm 0,14$, odnosno $3,41 \pm 0,13$ ($p < 0,05$). **Grafik 1** pokazuje srednje vrednosti i standardne devijacije Šenonove entropije hromatina limfocita u različitim uzorcima. Detektovan je takođe statistički značajan doznno-zavisni linearni trend povećanja hromatinske entropije u uzorcima ($p < 0,05$).



Grafik 1. Vrednosti Šenonove entropije hromatina u različitim uzorcima (* $p < 0,05$).

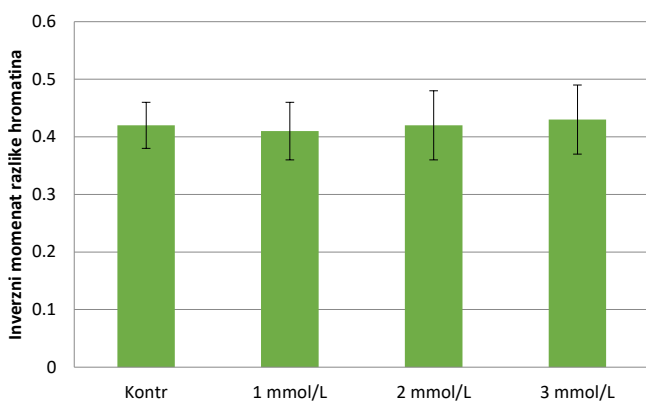
Srednja vrednost angularnog drugog momenta hromatina limfocita u kontrolnom uzorku bila je $0,0071 \pm 0,0021$. Nakon tretmana litijum sulfatom, ova vrednost se nije statistički značajno promenila ($p > 0,05$). U uzorku sa koncentracijom litijuma od 1 mmol/l,

iznosila je $0,0069 \pm 0,0019$, dok u uzorcima sa koncentracijama 2 i 3 mmol/l, iznosila je $0,0073 \pm 0,0028$, odnosno $0,0072 \pm 0,0026$ (**Grafik 2**).



Grafik 2. Angularni drugi momenat entropije hromatina u različitim uzorcima.

Prosečna vrednost inverznog momenta razlike u uzorcima iznosila je $0,42 \pm 0,04$ (kontola), $0,41 \pm 0,05$ (1 mmol/l), $0,42 \pm 0,06$ (2 mmol/l), $0,43 \pm 0,06$ (3 mmol/l). Kao ni u slučaju angularnog drugog momenta, ni inverzni momenat razlike tretiranih limfocita nije se značajno menjao ($p > 0,05$) (**Grafik 3**).



Grafik 3. Inverzni momenat razlike hromatina u različitim uzorcima.

Diskusija

Naša studija ukazuje da litijum sulfat izaziva dozno-zavisno povećanje Šenonove entropije hromatina limfocita periferne krvi. Sa druge strane, ovo jedinjenje ne utiče na vrednosti GLCM analize hromatina poput angularnog drugog momenta i inverznog momenta razlike. Prema našim saznanjima, ovo je prva studija u svetu koja je na ovaj način testirala efekte litijuma na jedro ćelije.

U našem eksperimentu korišćeno je *Felgen* bojenje za vizuelizaciju hromatina. Iako se entropija jedra može računati i na konvencionalnim hematoksilin/eozin i Gimza bojenjima, *Felgen* metoda je superiornija jer je

DNK specifična. Bazni fuksin i ostala jedinjenja u *Felgen* metodi se vezuju za DNK sa tolikom afinitetom da mnogi autori predlažu da se ona ponekad može koristiti za preciznu kvantifikaciju količine genetskog materijala u pojedinim delovima jedra (6). Toluidin plavo bojenje, upotrebjeno u našoj prethodnoj studiji (8), ima određene prednosti s obzirom da je specifično za sve nukleinske kiseline (i DNK i RNK) i predstavlja potencijalnu alternativu u budućim istraživanjima promena u hromatinskoj arhitekturi.

Imunostimulatorna dejstva litijuma u medicini su od ranije poznata. Litijum u određenim okolnostima može stimulisati kostnu srž da proizvodi veći broj granulocita i limfocita. Litijum takođe ispoljava značajno anti-inflamatorno dejstvo, verovatno putem supresije COX-2 ekspresije kao i putem inhibicije stvaranja citokina IL-1 β ili TNF- α i putem povećanja sinteze IL-2 i IL-10. (11,12). Moguće je da su promene u jedru u našoj studiji indukovane nekim od signalnih puteva na koje litijum utiče u ćelijama poput G protein /ciklični AMP ili inozitol 3 fosfatnog puta.

Entropija u termodinamskom smislu predstavlja meru termodinamske neuređenosti sistema. Šenonova entropija je modifikovani koncept neuređenosti primenjen na informatičku organizaciju biološke ili neke druge strukture. Tokom računanja ovog parametra, reprezentacija strukture kao što je dvodimenzionalni mikrograf se konvertuje u format koji se sastoji iz tekstovnih stringova, a onda se putem specifičnog matematičkog algoritma računa stepen informacione neuređenosti stringova (13).

Pojam entropije u biološkim strukturama je u fokusu istraživanja tokom poslednjih nekoliko godina. Shamir i saradnici su pokazali da je teksturalna entropija mišićnog tkiva validni pokazatelj starosno-zavisne degradacije mišićnog tkiva na animalnom eksperimentalnom modelu (14). Takođe, pokazano je da se tokom starenja ćelija, entropija jedara određenih prekursorskih ćelija hematopoeznog tkiva slezine značajno povećava (15). Neka istraživanja su takođe pokazala da je teksturalna entropija i drugi GLCM pokazatelji, potencijalno važni parametri u izučavanju ranih apoptotskih promena u ćelijskoj kulturi (16).

Zaključak

Litijum sulfat kod limfocita periferne krvi izaziva dozno zavisno povećanje hromatinske Šenonove entropije. Promene u entropiji nisu praćene sličnim promenama u teksturalnim parametrima hromatina poput angularnog drugog momenta i inverznog momenta razlike. I pored zanimljivih rezultata drugih autora u vezi hromatinske entropije, ovo je prva studija u svetu koja je pokazala da se hromatinska arhitektura limfocita menja na ovaj način kao posledica dejstva litijum sulfata.

Literatura

1. De AK. Textbook of inorganic chemistry, New Delhi, New Age International Publishers, 2003.
2. Haddad LM, Winchester JF, eds. Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999: 960–965. <http://search.msn.com/encarta/results.aspx>
3. Palominao A, Kukoyi O, Xiong GL. Leukocytosis after lithium and clozapine combination therapy. *Ann Clin Psychiatry*. 2010; 22:205-206
4. Ferenczajt-Rochowiak E, Rybakowski JK. The effect of lithium on hematopoietic, mesenchymal and neural stem cells. *Pharmacol Rep*. 2016; 68:224-230.
5. Wolffe A. Chromatin, structure and function. Academic Press: London-San Diego, 2000.
6. Chieco P, Derenzini M. The Feulgen reaction 75 years on. *Histochem Cell Biol*. 1999; 111:345-358.
7. Pantic I, Dacic S, Brkic P, et al. Discriminatory ability of fractal and grey level co-occurrence matrix methods in structural analysis of hippocampus layers. *J Theor Biol*. 2015; 370:151-156.
8. Pantic I, Petrovic D, Paunovic J, Vučević D, Radosavljević T, Pantic S. Age-related reduction of chromatin fractal dimension in toluidine blue - stained hepatocytes. *Mech Ageing Dev*. 2016; 157:30-34.
9. Shannon, CE. A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*. 1948; 27: 379–423.
10. Bywater, R.P. Prediction of protein structural features from sequence data based on Shannon entropy and Kolmogorov complexity. *PLoS One* 2015; 10, e0119306.
11. Modabbernia A, Taslimi S, Brietzke E, Ashrafi M. Cytokine alterations in bipolar disorder: a meta-analysis of 30 studies. *Biol. Psychiatry* 2013; 74: 15–25.
12. Nassar A, Azab AN. Effects of lithium on inflammation. *ACS Chem Neurosci* 2014; 5: 451-458.
13. Nezmar LR. Shannon information entropy in the canonical genetic code. *J Theor Biol*. 2017; 415:158-170.
14. Shamir L, Wolkow CA, Goldberg IG. Quantitative measurement of aging using image texture entropy. *Bioinformatics*. 2009; 25:3060-3063.
15. Pantic I, Pantic S, Paunovic J. Aging increases nuclear chromatin entropy of erythroid precursor cells in mice spleen hematopoietic tissue. *Microsc Microanal*. 2012; 18:1054-1059.
16. Losa GA, Castelli C. Nuclear patterns of human breast cancer cells during apoptosis: characterisation by fractal dimension and co-occurrence matrix statistics. *Cell Tissue Res*. 2005;322:257-267.