

Porównanie wpływu działania leków przeciwpsychotycznych – I generacji (haloperidolu) i II generacji (klozapiny, olanzapiny i risperidonu) – na peroksydację lipidów osocza *in vitro*

Comparison of influence of I and II generation antipsychotic drugs on peroxidation of serum lipids *in vitro*

Klinika Zaburzeń Afektywnych i Psychotycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jolanta Rabe-Jabłońska

Correspondence to: Dr n. med. Anna Dietrich-Muszalska, Klinika Zaburzeń Afektywnych i Psychotycznych Uniwersytetu

Medycznego w Łodzi, ul. Czechosłowacka 8/10, 92-216 Łódź, tel.: 0 691 881 787, faks: 042 675 74 03, e-mail: tzn_lodz@post.pl

Składam podziękowanie Pani Prof. dr hab. Barbarze Wachowicz, kierownikowi Katedry Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego za umożliwienie przeprowadzenia badań laboratoryjnych.

I am grateful to Professor Barbara Wachowicz, head of the Dept. of General Biochemistry of the Medical University in Łódź, who allowed me to perform laboratory tests.

Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi: badania własne, numer 502-11-176

The study was supported by internal grant of the Medical University of Lodz, Poland, No. 502-11-176

Streszczenie

W schizofrenii występują zaburzenia równowagi pro- i antyoksydacyjnej, które mogą pogarszać wyniki leczenia oraz prowadzić do różnych objawów niepożądanych. W kilku badaniach udokumentowano wzrost peroksydacji lipidów występujący w różnych komórkach i płynach organizmu osób leczonych z powodu schizofrenii. Lohr i wsp. stwierdzili, że leczenie lekami przeciwpsychotycznymi (LPP) może być związane ze wzrostem peroksydacji lipidów. Dotychczas w badaniach eksperymentalnych na zwierzętach lub w układzie *in vitro* i w badaniach klinicznych uzyskiwano zróżnicowane wyniki działania LPP na peroksydację lipidów. Leki przeciwpsychotyczne II generacji (LPIIG) nie mają ustalonego wpływu działania na peroksydację lipidów, w przeciwieństwie do haloperidolu, który przeważnie jest opisywany jako lek wywierający działania prooksydacyjne. Celem badania było określenie działania LPIIG na peroksydację lipidów ludzkiego osocza, w warunkach *in vitro*, oraz porównanie tych wyników z wpływem na peroksydację lipidów wywieraną przez haloperidol w tych samych warunkach doświadczalnych. Poziom peroksydacji lipidów mierzono w osoczu zdrowych ochotników przy pomocy oznaczenia stężenia związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), według metody opisanej przez Rice'a-Evansa i wsp. Osocze inkubowano 24 godziny z badanymi lekami i bez leku (próby kontrolne). Stwierdzono, że w odniesieniu do prób kontrolnych badane LPIIG nie powodują istotnego wzrostu stężenia TBARS w osoczu, w przeciwieństwie do haloperidolu, który wywołuje istotny wzrost stężenia TBARS ($p=0,03$). Klozapina, olanzapina i risperidon wywierają istotnie mniejszy wpływ na peroksydację lipidów niż haloperidol (odpowiednio dla każdego z porównywanych leków $p<0,05$), nie wywołując istotnego działania prooksydacyjnego.

Słowa kluczowe: leki przeciwpsychotyczne I generacji, leki przeciwpsychotyczne II generacji, peroksydacja lipidów, TBARS, schizofrenia

Summary

Schizophrenia is associated with disturbed pro- and antioxidative balance, resulting in worse treatment outcomes and development of various adverse effects. Several studies have documented an increase of lipid peroxidation in many different cells and body fluids in patients treated for schizophrenia. Lohr et al. stated that treatment with antipsychotics may be associated with increase of lipid peroxidation. To date, both *in vitro* and animal experimental studies, as well as clinical studies in humans, yielded contradictory results concerning the influence of antipsychotics on lipid peroxidation. In general opinion, II generation antipsychotics – SGAs do not exert an established effect on lipid peroxidation, in contrast to haloperidol, which is usually described as a drug with a definite prooxidation effect. The aim of this study was to determine the influence of SGAs

on peroxidation of human serum lipids *in vitro versus* haloperidol induced lipid peroxidation under the same experimental conditions. Lipid peroxidation level was measured in serum obtained from healthy volunteers, by assessing the level of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), according to the Rice-Evans method. Blood plasma was incubated for 24 hours with study drugs and without drugs (control group). The study revealed that SGAs do not induce any significant increase of TBARS as compared with control group, in contrast to haloperidol, which resulted in a significant increase of TBARS level ($p < 0.03$). Clozapine, olanzapine and risperidone exert a significantly less pronounced effect on lipid peroxidation than haloperidol ($p < 0.05$ for every comparator drug), not resulting in any significant prooxidative activity.

Key words: I generation antipsychotics, II generation antipsychotics, lipid peroxidation, TBARS, schizophrenia

WSTĘP

W badaniach na zwierzętach stwierdzono, że podawanie leków przeciwpsychotycznych (LPP), przede wszystkim I generacji (LPIG), powoduje wzrost wytwarzania wolnych rodników poprzez blokowanie receptorów dopaminowych, wzrost obrotu i metabolizmu dopaminy, wzrost poziomu peroksydacji lipidów błony komórkowej oraz zmianę poziomu enzymów antyoksydacyjnych w mózgu⁽¹⁾. W badaniach klinicznych u pacjentów chorych na schizofrenię leczonych LPP stwierdzano obniżoną zdolność do obrony antyoksydacyjnej oraz wzrost peroksydacji lipidów⁽²⁻⁴⁾. Zwiększoną peroksydację lipidów stwierdzono również u pacjentów z pierwszym epizodem choroby, jeszcze nieleczonych LPP^(2,5-7).

Wzrost stężenia różnych markerów świadczących o stresie oksydacyjnym i zwiększonej peroksydacji lipidów u osób chorych na schizofrenię potwierdzono w płynie mózgowo-rdzeniowym, w osoczu, płytkach krwi i moczu, a także w mózgu osób chorych na schizofrenię w badaniach *post mortem*⁽⁸⁻¹²⁾.

W badaniach na zwierzętach dobrze udokumentowano, że haloperidol wywiera działanie prooksydacyjne^(8,13-17). W kilku pracach wskazywano na podobne działanie haloperidolu występujące u chorych na schizofrenię⁽¹⁸⁻²⁰⁾, podkreślając trudności metodologiczne prowadzenia tych badań (leczenie różnymi LPP, krótki okres „wypłukania” leku z organizmu przed rozpoczęciem leczenia haloperidolem). Wzrost peroksydacji lipidów ludzkiego osocza wywoływany przez haloperidol potwierdzono również w badaniach eksperymentalnych prowadzonych *in vitro*^(21,22). W przypadku leków przeciwpsychotycznych II generacji (LPIIG) nadal pozostaje nierozstrzygnięte pytanie, jaki wpływ wywiera leczenie tymi lekami na stres oksydacyjny i zmiany poziomu peroksydacji lipidów.

W kilku badaniach stwierdzano, że LPIIG, takie jak risperidon, klozapina i olanzapina, nie powodują zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych i peroksydacji lipidów^(17,23). Wyniki tych badań wskazują na możliwość indukowania stresu oksydacyjnego poprzez wzrost peroksydacji lipidów błony komórkowej i utrzymujące się zmiany poziomu enzymów antyoksydacyjnych, w cza-

INTRODUCTION

Animal studies revealed that administration of antipsychotics, mainly I generation antipsychotics – FGAs, results in an increase of free radicals production by blocking dopamine receptors, increase of dopamine turnover and metabolism, increase of lipid peroxidation in cell membranes and altering levels of antioxidative enzymes in the brain⁽¹⁾. Clinical studies in patients with schizophrenia treated with antipsychotics revealed a reduced capacity of antioxidative defense mechanisms and increase of lipid peroxidation⁽²⁻⁴⁾.

Increased lipid peroxidation was also noticed in patients with first schizophrenic episode, prior to introduction of antipsychotic drugs^(2,5-7).

Elevated level of several markers associated with oxidative stress and increased lipid peroxidation in patients with schizophrenia has been confirmed in cerebrospinal fluid, blood plasma, urine, as well as in the brain of patients with schizophrenia undergoing *post mortem* studies⁽⁸⁻¹²⁾.

Animal studies have documented unambiguously prooxidative activity of haloperidol^(8,13-17). A few papers suggested a similar effect of haloperidol in patients with schizophrenia⁽¹⁸⁻²⁰⁾, while highlighting methodological difficulties associated with designing and performing such studies (use of various antipsychotics and protocols, short wash-out period prior to institution of haloperidol treatment). Elevated, haloperidol induced plasma lipid peroxidation has been confirmed also by experimental *in vitro* studies^(21,22).

In the case of SGAs, their influence on oxidative stress and alterations of lipid peroxidation is still unclear. In several studies was found that II generation antipsychotics – SGAs, e.g. risperidone, clozapine and olanzapine, do not induce any change of activity of antioxidative enzymes nor lipid peroxidation^(17,23). Results of these studies point to the possibility of induction of oxidative stress by increase of lipid peroxidation of cell membrane and persisting alterations of activity of antioxidative enzymes during long-term haloperidol administration, while no such effect was noticed with SGAs treatment. Results of current studies do not provide a definitive answer on how FGAs and SGAs influence biomarkers of oxidative stress or oxidative cell damage.

się przewlekłego podawania haloperidolu, ale nie leków LPIIG. Obecne wyniki badań nie rozstrzygają ostatecznie, w jaki sposób LPIIG i LPIIG różnią się pod względem wywieranego wpływu na biomarkery stresu oksydacyjnego i oksydacyjnego uszkodzenia komórki.

CEL BADANIA

Celem badania było określenie wpływu wywieranego przez leki przeciwpsychotyczne II generacji (klozapina, olanzapina i risperidon) na peroksydację lipidów ludzkiego osocza w warunkach *in vitro* oraz porównanie ich działania z wpływem haloperidolu na peroksydację lipidów.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło świeże osocze wyizolowane z krwi pobranej na antykoagulant ACD (kwas cytrynowy – 13,6 g, cytrynian sodu – 25 g i glukoza bezwodna – 20,0 g w litrze) w stosunku objętościowym 1:5 (ACD:krew). Krew pobierano od 10 zdrowych ochotników (studentów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi) w wieku 24-26 lat (średnio $25 \pm 0,6$ roku).

Ze wszystkimi badanymi przeprowadzono kwestionariuszowy wywiad dotyczący stanu zdrowia i przebytych chorób oraz nawyków żywieniowych i stosowanych substancji psychoaktywnych.

Do oceny stanu zdrowia psychicznego zastosowano M.I.N.I. – Mini International Neuropsychiatric Interview⁽²⁴⁾. Przeprowadzono badania internistyczne, neurologiczne i laboratoryjne (morfologia, całkowity cholesterol, triglicerydy). Obliczono BMI (kg/m^2).

Przyjęto następujące kryteria wykluczające z udziału w badaniu:

- 1) występowanie chorób somatycznych oraz skłonności do alergii (atopia);
- 2) występowanie chorób psychicznych u badanych i w ich rodzinach;
- 3) używanie leków, używanie narkotyków, palenie papierosów, częste picie alkoholu;
- 4) brak diety zrównoważonej i suplementacja antyoksydantami.

Na badania wyraziła zgodę Komisja Etyczna Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, numer RNN/899/2000. Badani uzyskali informację na temat celu i metod badania oraz wyrazili pisemną zgodę na udział w nich.

IZOLOWANIE OSOCZA

Krew (2×9 ml) od zdrowych ochotników pobierano z żyły odłokciowej na roztwór ACD. Krew wirowano w temperaturze 20°C przez 30 min przy 1600 obr./min w wirowce SIGMA 3K30. Otrzymane osocze bogatopłytkowe wirowano przez 20 min przy 2500 obr./min w celu osadzenia płytek i otrzymania osocza ubogopłytkowego.

AIM OF PAPER

The aim of this paper was to determine the influence of SGAs (clozapine, olanzapine and risperidone) on lipid peroxidation of human blood plasma *in vitro*, as well as to compare their effect on lipid peroxidation with that of haloperidol.

MATERIAL AND METHOD

Study material consisted of fresh blood plasma obtained from peripheral blood samples mixed with ACD (citric acid 13.6 g; sodium citrate 25 g; glucose anhydrate 20.0 g per liter) at a 5:1 ratio. Blood samples were obtained from 10 healthy volunteers (male students of the Medical University in Lodz) aged 24-26 (mean age 25 ± 0.6 years). In all persons a structured medical interview was obtained, concerning health status, past diseases, dietary habits and usage of psychoactive substances. The patients' mental health was assessed using the M.I.N.I. (Mini-International Neuropsychiatric Interview)⁽²⁴⁾. All patients underwent formal medical, neurological examination, as well as laboratory tests (peripheral blood count, total cholesterol, triglycerides), the patients' BMI (body mass index) was calculated.

The following exclusion criteria were adopted:

- 1) coexisting somatic diseases and susceptibility to allergic reactions (atopy);
- 2) coexisting mental diseases in the subjects and his/her family;
- 3) use of drugs, narcotics, tobacco smoking, abuse of alcohol;
- 4) lack of a balanced diet and current supplementation with antioxidants.

The study has been approved by the Ethical Committee of the Medical University in Lodz (ref. no. RNN/899/2000). All patients included in the study have been informed about aims of the study and methods implemented and expressed their written informed consent for participation in this study.

ISOLATION OF BLOOD PLASMA

Peripheral blood samples (2×9 ml) were obtained from healthy volunteers by puncture of antecubital vein and were stored in ACD solution. Blood was centrifuged at 20°C and 1600 rpm for 30 minutes (SIGMA 3K30 centrifuge). Platelet rich plasma thus obtained was further centrifuged at 2500 rpm for 20 minutes to enable sedimentation of platelets and to obtain platelet poor plasma.

INCUBATION OF PLASMA WITH DRUGS

Active substances of particular drugs dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) were added to 0.5 ml of platelet poor plasma (PPP), yielding the final concentra-

INKUBACJA OSOCZA Z LEKIEM

Do 0,5 ml osocza ubogopłytkowego (PPP) dodawano kolejno substancję czynną badanych leków rozpuszczoną w dimetylosulfotlenku – DMSO (stężenia końcowe: haloperidol 0,5 µg/ml, risperidon 0,4 µg/ml, olanzapina 2 µg/ml, klozapina 40 µg/ml). Substancje czynne badanych leków otrzymano z firm farmaceutycznych (risperidon z Janssen-Cilag, Belgia, olanzapinę z firmy Adamed, klozapinę z Anpharm, haloperidol z Polfy). Próby inkubowano 24 godziny w temperaturze pokojowej. Do każdego doświadczenia wykonano próby kontrolne, które stanowiło osocze z DMSO, bez leku. W próbach osocza badanego po 24-godzinnej inkubacji z określonym stężeniem leku oraz próbach kontrolnych oznaczano spektrofotometrycznie stężenie związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) metodą opisaną przez Rice'a-Evansa⁽²⁵⁾.

OZNACZANIE STĘŻENIA ZWIĄZKÓW REAGUJĄCYCH Z KWASEM TIOBARBITUROWYM (TBARS)

Do 0,5 ml osocza kontrolnego (bez leku) i osocza badanego (próby z odpowiednimi stężeniami końcowymi badanych leków) dodano 0,5 ml 15% kwasu trichlorooctowego (TCA) w 0,25 M HCl, 0,5 ml 0,37% kwasu tiobarbiturowego (TBA) w 0,25 M HCl. Próby mieszano i ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej przez 10 minut. Następnie próbki osocza odwirowywano przez 15 minut (8000 obr./min, wirówka SIGMA 3K30) w celu otrzymania klarownego supernatantu. Absorbancję supernatantu oznaczano na spektrokolorymetrze SEMCO przy długości fali $\lambda = 535$ nm w kuwecie o grubości warstwy 1 cm. Ilość TBARS obliczano na podstawie wartości absorbancji, korzystając z molowego współczynnika absorpcji ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Wszystkie badania powtarzano dwukrotnie.

ANALIZA STATYSTYCZNA

Wyniki badań poddano analizie statystycznej: obliczono średnie arytmetyczne, błąd standardowy średniej oraz współczynniki zmienności dla badanych cech. Istotność różnic w stężeniu TBARS między próbkami z inkubowanym lekiem i próbkami kontrolnymi obliczono za pomocą testu t-Studenta dla prób zależnych (test sparowany). W celu porównania wpływu badanych leków na peroksydację lipidów obliczono różnice w stężeniach TBARS między próbkami z inkubowanym lekiem i próbkami kontrolnymi oraz przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA I. Dla każdej pary porównywanych leków wykonano obliczenia testem t-Studenta dla prób niezależnych (StatSoft Inc., Statistica v. 6.0).

tion of haloperidol – 0.5 µg/ml, of risperidone – 0.4 µg/ml, of olanzapine – 2 µg/ml and of clozapine – 40 µg/ml.

Active substances of drugs tested were supplied by respective pharmaceutical companies (risperidone – Janssen-Cilag, Belgium; olanzapine – Adamed; clozapine – Anpharm; haloperidol – Polfa). Samples were incubated for 24 hours at room temperature. Each set of samples was accompanied by a control sample, consisted of PPP with DMSO alone, with no drug added. After a 24-hours' incubation period, plasma samples with predefined drug concentrations and control samples were spectrophotometrically tested for the level of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), using the Rice-Evans method⁽²⁵⁾.

DETERMINATION OF TBARS LEVEL

0.5 ml of control samples (no drug) and 0.5 ml of study samples (with predefined final concentrations of particular drugs) were added to 0.5 ml of 15% trichloroacetic acid (TCA) in 0.25 M HCl, and 0.5 ml of 0.37% of thiobarbituric acid (TBA) in 0.25 M HCl.

Samples were mixed and heated in a boiling water bath for 10 minutes. Next, samples were centrifugated for 15 minutes at 8000 rpm (SIGMA 3K30 centrifuge) in order to obtain a transparent and clear supernatant. Light absorption of the supernatant was measured using 1 cm thick cuvettes at $\lambda = 535$ nm (SEMCO spectrophotometer). TBARS content in particular samples was calculated based on absorbance value, using the molar extinction coefficient ($\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). All measures were done in duplicate.

STATISTICAL ANALYSIS

Results obtained were subjected to statistical analysis, calculating arithmetic mean, standard error of the mean and variance coefficients for parameters studied. Significance of differences in TBARS level between samples incubated with drugs and control samples was determined using paired Student t-test for dependent variables. The influence of particular drugs on lipid peroxidation was compared based on calculated differences in TBARS levels between samples incubated with drugs and control samples, and was tested using the ANOVA I univariate analysis. Each pair of compared drugs was analyzed using the Student t-test for independent variables (StatSoft Inc., Statistica v. 6.0).

RESULTS

TBARS level for particular drugs was assessed after 24-hours' incubation and repeated twice (20 assays for every drug concentration). Results obtained are presented in table 1 and in figs. 1 and 2.

WYNIKI

Dla badanych leków wykonano oznaczenia stężenia TBARS, po 24-godzinnej inkubacji, w dwukrotnych po-

It was noticed that elevation of blood plasma TBARS level upon incubation with SGAs (clozapine, olanzapine and risperidone) was nonsignificant ($p > 0.05$) compared with control groups where no drug had been added

N	Badana próba Sample	Poziom TBARS ($\mu\text{mol/l}$) TBARS level ($\mu\text{mol/l}$)							
		Haloperidol Haloperidol		Risperidon Risperidone		Olanzapina Olanzapine		Klozapina Clozapine	
		$\mu\text{mol/l}$	%	$\mu\text{mol/l}$	%	$\mu\text{mol/l}$	%	$\mu\text{mol/l}$	%
1	Kontrola/Control	1,058	191	1,058	128	0,914	101	1,154	91
	Lek/Drug	2,020		1,356		0,924		1,049	
2	Kontrola/Control	0,991	131	0,991	125	1,212	106	0,471	147
	Lek/Drug	1,299		1,241		1,288		0,693	
3	Kontrola/Control	0,962	112	0,962	96	1,443	108	1,347	103
	Lek/Drug	1,077		0,924		1,558		1,385	
4	Kontrola/Control	0,885	108	0,885	93	1,260	110	1,000	102
	Lek/Drug	0,952		0,827		1,385		1,020	
5	Kontrola/Control	0,866	138	0,866	111	1,289	93	0,885	104
	Lek/Drug	1,193		0,962		1,193		0,924	
6	Kontrola/Control	0,933	105	0,933	99	1,472	100	1,039	94
	Lek/Drug	0,981		0,924		1,472		0,981	
7	Kontrola/Control	0,847	107	0,847	102	1,337	114	0,673	106
	Lek/Drug	0,904		0,866		1,530		0,712	
8	Kontrola/Control	0,962	103	0,962	96	1,270	103	1,077	100
	Lek/Drug	0,991		0,924		1,308		1,077	
9	Kontrola/Control	0,943	166	0,943	114	1,308	99	1,154	105
	Lek/Drug	1,568		1,077		1,299		1,212	
10	Kontrola/Control	1,530	104	1,530	90	1,433	103	0,827	119
	Lek/Drug	1,587		1,376		1,472		0,981	
Średnia \pm SEM Mean \pm SEM	Kontrola/Control	0,957 \pm 0,094		0,957 \pm 0,094		1,015 \pm 0,080		0,853 \pm 0,030	
	Lek/Drug	1,213 \pm 0,140*		1,088 \pm 0,122		1,065 \pm 0,096		0,788 \pm 0,025	
CV%	Kontrola/Control	30,9		30,9		24,9		11,0	
	Lek/Drug	36,4		35,5		28,4		10,2	

Tabela 1. Wpływ działania leków przeciwpsychotycznych na stężenie TBARS po 24-godzinnej inkubacji osocza z lekiem – badania in vitro; sparowany test t-Studenta względem kontroli (bez leku); * $p < 0,05$

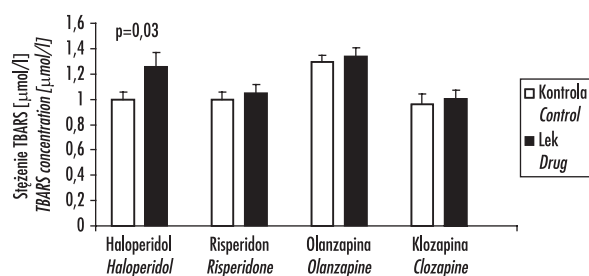
Table 1. Influence of antipsychotic drugs on TBARS level after 24-hours' incubation of blood plasma with drug – an in vitro study; paired Student t-test vs. control (without drug); * $p < 0.05$

wtórzeniach (dla każdego stężenia leku – 20 oznaczeń). Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 1 i na rys. 1 i 2. Stwierdzono, że stężenie związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) po inkubacji osocza z LPIIG (klozapiną, olanzapiną, risperidonem) wzrosło nieistotnie statystycznie ($p > 0,05$) w porównaniu z próbami kontrolnymi bez leku (tabela 1 i rys. 1). Natomiast dla haloperidolu stężenie TBARS, po inkubacji z lekiem, w odniesieniu do prób kontrolnych (bez leku) wzrosło istotnie statystycznie ($p = 0,005$).

Porównując różnice w stężeniach TBARS analizą wariancji ANOVA I, wykazano, że badane leki w wywieranym wpływie na peroksydację lipidów różnią się istotnie statystycznie ($F = 3,42$; $df = 3$; $p = 0,03$). Dalsza analiza wpływu badanych leków na zmiany stężenia TBARS w inkubowanym osoczu (test t-Studenta) wykazała, że klozapina, olanzapina i risperidon istotnie różnią się od haloperidolu ($p < 0,05$; odpowiednio dla każdej pary leków), nie wpływając na istotny wzrost peroksydacji lipidów (rys. 2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w wartościach stężenia TBARS między badanymi LPIIG (klozapiną i olanzapiną, olanzapiną i risperidonem oraz risperidonem i klozapiną).

OMÓWIENIE

Peroksydacja lipidów jest związana z toksycznym działaniem wielu związków chemicznych i może uczestniczyć w uszkodzeniu komórek oraz w różnych procesach chorobowych. Obecnie coraz więcej dowodów wskazuje, że reaktywne formy tlenu mogą brać udział w uszkodzeniu neuronów poprzez indukowanie wzrostu peroksydacji lipidów. Peroksydacyjne zmiany składu fosfolipidów błony komórkowej mogą zmieniać funkcję neuronów, jak się przypuszcza, wskutek zmian płynności błony albo w wyniku zmian na poziomie receptorów błonowych^(26,27), co może spowodować upośledzenie wychwytu i uwalniania



Rys. 1. Porównanie peroksydacji lipidów (wyrażanej stężeniem TBARS) w próbach z badanymi lekami (klozapiną, olanzapiną, risperidonem i haloperidolem) w porównaniu z kontrolą (bez leku); sparowany test t-Studenta

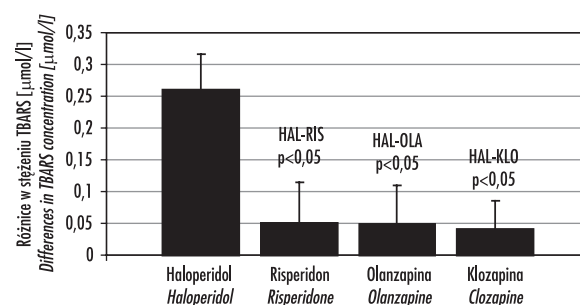
Fig. 1. Comparison of lipid peroxidation (expressed as TBARS level) in samples with drugs tested (clozapine, olanzapine, risperidone and haloperidol) vs. control (no drug); paired Student t-test

(table 1 and fig. 1). In contrast, blood plasma TBARS level after incubation with haloperidol increased significantly compared with control group ($p = 0,005$).

Comparison of differences in TBARS level using the ANOVA I variance analysis revealed statistically significant differences between particular drugs in their influence on lipid peroxidation ($F = 3,42$; $df = 3$; $p = 0,03$). Further analysis of influence of the drugs studied on blood plasma TBARS level using the Student t-test revealed that clozapine, olanzapine and risperidone differ significantly from haloperidol ($p < 0,05$ for each pair of drugs), not resulting in any significant increase of lipid peroxidation (fig. 2). No statistically significant differences were noticed in TBARS level between studied SGAs (clozapine and olanzapine, olanzapine and risperidone, risperidone and clozapine).

DISCUSSION

Lipid peroxidation is associated with toxic effect of many chemical compounds and may play a role in cell damage and several pathologic conditions. At present, there is an increasing number of data indicating that reactive oxygen species may participate in the process of neuronal injury by inducing an increase of lipid peroxidation. Peroxidative alterations of cell membrane phospholipids composition may alter neuronal function, presumably by changing membrane fluidity or as a result of dysfunction of membrane receptors^(26,27), resulting in a compromised release and uptake of neurotransmitters and even cell death. Alterations in neuronal membranes may contribute to disturbed neuronal transmission within several brain structures.



Rys. 2. Porównanie wpływu LPIIG (klozapiny, olanzapiny i risperidonu) z LPIIG (haloperidolem) na stężenie TBARS (test t-Studenta); porównania przeprowadzono, uwzględniając wartości różnic w stężeniu TBARS między próbą z badanym lekiem i próbą kontrolną

Fig. 2. Comparison of influence of II generation antipsychotic drugs (clozapine, olanzapine and risperidone) vs. I generation antipsychotic drug (haloperidol) on TBARS level (Student t-test); comparison was done considering differences in TBARS level between sample with study drug and control sample

nia neurotransmitera, a nawet śmierć komórki. Zmiany w błonach neuronów mogą przyczynić się do zaburzeń neurotransmisji w różnych strukturach mózgu.

Mahadik i wsp. sprecyzowali hipotezę, że stres oksydacyjny poprzedza początek psychozy, a ostry epizod psychiatryczny może dalej go pogorszyć poprzez podwyższony metabolizm oksydacyjny mózgu prowadzący do zwiększonej peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych błon komórkowych zachodzącej przy udziale wolnych rodników⁽⁵⁾.

W różnych badaniach przeprowadzonych na zwierzętach wykazywano, że stres oksydacyjny i zmiany peroksydacji lipidów mogą występować wskutek działania LPP, a efekty tych działań mogą być zróżnicowane w zależności od badanej struktury mózgu oraz testowanego leku (LPIG lub LPIIG).

Pai i wsp. oraz Lohr i wsp. uznali, że stres oksydacyjny jest zaangażowany w toksyczne efekty wywierane przez haloperidol, który, wywołując sekwencję zmian komórkowych, prowadzi do śmierci komórki, a integralną częścią kaskady tych przemian jest produkcja reaktywnych form tlenu (ROS)^(8,28). Dowody podtrzymujące tę hipotezę obejmują podwyższony poziom peroksydacji lipidów stwierdzany w badaniach doświadczalnych prowadzonych na zwierzętach^(8,16,17).

Sagara w badaniach na zwierzętach wykazał, że toksyczności indukowanej przez haloperidol w neuronach korowych oraz linii komórek hipokampa towarzyszą zmiany mitochondrialnego potencjału błonowego (MMP), generowanie reaktywnych form tlenu (ROS), spadek poziomu glutationu (GSH) oraz wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} ⁽¹⁶⁾. Haloperidol powoduje wzrost obrotu dopaminy, a więc stres oksydacyjny indukowany przez ten lek może być związany z wytwarzaniem nadtlenu wodoru (H_2O_2) w wyniku zaburzeń metabolizmu katecholamin przy udziale monoaminooksydaz⁽¹⁾. Dopamina może też działać jak wolny rodnik, prowadząc do wzrostu ilości innych wolnych rodników, co w konsekwencji może doprowadzić do uszkodzenia peroksydacyjnego i przyczynić się do śmierci neuronów⁽²⁰⁾.

Nasze wyniki badań, prowadzone w układzie *in vitro*, wykazały, że haloperidol istotnie statystycznie zwiększał stężenie markera peroksydacji lipidów (TBARS), co jest zgodne z badaniami innych autorów prowadzonymi na zwierzętach oraz z wstępnymi obserwacjami klinicznymi wskazującymi na prooksydacyjne działanie haloperidolu^(18,20).

W badaniach własnych nie stwierdzono również istotnego wzrostu peroksydacji lipidów osocza powodowanego przez oceniane LPIIG, w odniesieniu do peroksydacji lipidów zachodzącej w inkubowanym bez leku osoczu (próby kontrolne), co wskazuje na nieznaczny wzrost peroksydacji wywoływanej przez te leki w czasie 24-godzinnej inkubacji z osoczem. Nasze wyniki są zgodne z wynikami badań innych autorów prowadzonymi na

Mahadik et al. suggest that oxidative stress may precede the onset of psychosis. Furthermore, an active psychotic episode may further exacerbate it by increasing the rate of oxidative metabolism of the brain, resulting in an enhanced peroxidation of polyunsaturated fatty acids of cell membranes, occurring in the presence of free radicals⁽⁵⁾.

Several animal studies indicate that oxidative stress and altered lipid peroxidation may result from activity of antipsychotics, while the net effect of this activity may be variable, depending on the brain structure studied and type of drug tested (FGAs or SGAs).

Pai et al. and Lohr et al. showed, that oxidative stress may be involved many toxic effects of haloperidol, which initiates a cascade of events at cellular level leading to cell death, an integral part of the transformation is the production of reactive oxygen species (ROS)^(8,28). Observed in experimental studies on animals increase of lipid peroxidation level supports this hypothesis^(8,16,17).

Animal studies performed by Sagara demonstrated that haloperidol induced toxicity in cortical neurons and in hippocampal cell lines is associated with alterations of mitochondrial membrane potential (MMP), generation of ROS, reduced level of glutathione (GSH) and elevated level of intracellular calcium ions⁽¹⁶⁾. Haloperidol induced an increased turnover of dopamine, therefore oxidative stress induced by this drug be associated with production of oxygen peroxide (H_2O_2) as a result of monoamine oxidase-mediated metabolism of catecholamines⁽¹⁾. Dopamine itself may act as a free radical, causing an increase of level of other free radicals what in consequence may lead to peroxidative damage and contribute to neuronal death⁽²⁰⁾.

The results of our *in vitro* study indicate that haloperidol significantly increase of lipid peroxidation marker level (TBARS), thus confirming other authors' findings stemming from animal studies and preliminary clinical observations concerning prooxidative effect of haloperidol^(18,20). Our studies showed that SGAs do not produce any significant increase of plasma lipid peroxidation, as compared with lipid peroxidation occurring in blood plasma incubated without the drug (control samples), indicating the insignificant increase of peroxidation caused by these drugs during 24-hours' incubation with blood plasma. Our findings are consistent with those of other authors, stemming from animal studies and cell cultures, as well as with slight alterations of TBARS in patients treated with SGAs (clozapine, olanzapine, risperidone), clearly differing from changes in TBARS level caused by some other FGAs.

A study by Zhang et al. demonstrated that clozapine induced less oxidative damage than haloperidol; no oxidative damage produced by olanzapine has been noticed either⁽²⁰⁾.

Parikh et al. presented evidence for increased lipid peroxidation and reduced of superoxide dismutase (SOD)

zwierzętach i w kulturach komórkowych oraz z zaobserwowanymi niewielkimi zmianami stężenia TBARS u pacjentów leczonych LPIIG (klozapiną, olanzapiną i risperidonem), istotnie różnymi w odniesieniu do zmian w stężeniu TBARS wywoływanych przez niektóre LPIIG. Zhang i wsp. wykazali w swoich badaniach, że klozapina wywoływała mniejsze uszkodzenie oksydacyjne niż haloperidol, nie stwierdzili też uszkodzenia oksydacyjnego indukowanego przez olanzapinę⁽²⁰⁾.

Parikh i wsp. przedstawili dowody na wzrost peroksydacji lipidów i obniżoną aktywność dyzmutazy ponadtenkowej (SOD) w mózgu szczurów traktowanych w sposób przewlekły haloperidolem, ale nie wykazali zmian poziomu enzymów antyoksydacyjnych i produktów peroksydacji lipidów w mózgu szczurów traktowanych w sposób przewlekły risperidonem, olanzapiną lub klozapiną⁽¹⁷⁾. Reinke i wsp. wykazali wysoki poziom TBARS w mózgu szczura po podawaniu haloperidolu, jednocześnie stwierdzili, że działanie klozapiny było związane z mniejszym uszkodzeniem oksydacyjnym⁽²⁹⁾.

Wskazywano też, że LPIIG (klozapina i risperidon) chronią hodowane w kulturze komórki PC12 przed śmiercią komórek indukowaną przez usunięcie surowicy⁽³⁰⁾. Stwierdzono również, że olanzapina chroni komórki PC12 przed śmiercią indukowaną przez H₂O₂ lub po potraktowaniu ich peptydem β-amyloidu^(23,31). Podobnie kwetiapina, klozapina, olanzapina i risperidon chronią komórki PC12 przed apoptozą indukowaną przez jon N-metylo-4-fenylpirydynowy (MPP⁺)⁽³²⁾.

Kropp i wsp. wysunęli hipotezę, że neurotoksyczność LPIIG może brać udział w peroksydacji lipidów⁽¹⁸⁾. W ich badaniu, po 3-tygodniowym leczeniu pacjentów LPP, poziom produktów peroksydacji lipidów w osoczu był istotnie podwyższony u pacjentów leczonych haloperidolem. Nie stwierdzono istotnego wzrostu peroksydacji lipidów u pacjentów leczonych klozapiną, olanzapiną i risperidonem.

Z drugiej strony w badaniach doświadczalnych prowadzonych na zwierzętach stwierdzano w niektórych strukturach mózgu (prążkowie) wzrost stężenia TBARS wywoływany przez haloperidol, natomiast w korze mózgu występował spadek stężenia TBARS zarówno po podawaniu haloperidolu, jak i LPIIG (klozapiny i olanzapiny)⁽²⁹⁾.

W tych badaniach pomimo braku istotności statystycznej dane liczbowe wskazują, że olanzapina obniża poziom TBARS w korze w większym stopniu niż haloperidol.

Mahadik i wsp. stwierdzili, że LPIIG u szczurów nie tylko redukują peroksydację lipidów, ale również wywierają efekty antyoksydacyjne⁽²⁷⁾.

Wyniki prowadzonych dotychczas badań wskazują na zróżnicowany wpływ LPP w różnych strukturach mózgu (spadek poziomu TBARS w korze indukowany przez haloperidol i klozapinę), zależny być może od redukcji aktywności kory indukowanej przez antagonizm receptorów dopaminowych⁽³³⁾.

activity in the brains of rats on chronic haloperidol administration, while no alterations of antioxidative enzymes and lipid peroxidation products were detected in the brains of rats on chronic risperidone, olanzapine or clozapine administration⁽¹⁷⁾. Reinke et al. demonstrated high level of TBARS in the brain of rat receiving haloperidol, while administration of clozapine produced less oxidative damage⁽²⁹⁾.

There is some data indicating that SGAs (clozapine and risperidone) protect cultured PC12 cells from cell death induced by plasma removal⁽³⁰⁾. It was also found that olanzapine protects PC12 cells from cell death induced by H₂O₂ or resulting from β-amyloid peptide treatment^(23,31). Similarly, quetiapine, clozapine, olanzapine and risperidone protect PC12 cells from apoptosis induced by the N-methyl-4-phenylpyridine ion (MPP⁺)⁽³²⁾.

Kropp et al. proposed a hypothesis that neurotoxicity of FGAs may be connected with lipid peroxidation⁽¹⁸⁾. In their study, after a 3-week treatment of human subjects with antipsychotics, the level of lipid peroxidation products was significantly higher in blood plasma of patients treated with haloperidol. No significant increase of lipid peroxidation has been observed in patients receiving clozapine, olanzapine and risperidone.

Nevertheless, studies performed on animals revealed a haloperidol induced increase of TBARS level in some specific brain structures (e.g. striatum), while their level in the cortex was decreased both after haloperidol and SGAs (clozapine and olanzapine)⁽²⁹⁾.

In spite of a lack of statistical significance, numerical data indicate that olanzapine reduces cortical level of TBARS much more than haloperidol does.

Mahadik et al. noticed that SGAs not only reduce lipid peroxidation, but also have an antioxidative effect⁽²⁷⁾.

The results of hitherto performed studies indicate a highly variable effect of antipsychotics on TBARS level in particular brain structures (a reduction of cortical TBARS induced by haloperidol and clozapine), possibly depended on a reduced cortical activity, induced by an antagonism of dopamine receptors⁽³³⁾.

Determination of the influence of FGAs and SGAs on oxidative stress is crucial for improvement of mental disorders treatment and minimalizing of adverse effects of currently available antipsychotic medications in patients with schizophrenia.

CONCLUSIONS

Clozapine, olanzapine and risperidone do not produce any significant increase of lipid peroxidation in human blood plasma after a 24-hours' incubation, in contrast to haloperidol, which does possess prooxidative properties.

Ustalenie, jaki wpływ wywierają LPIG i LPIIG na stres oksydacyjny, ma istotne znaczenie dla ich lepszego zastosowania w terapii zaburzeń psychicznych, może też pomóc w przygotowaniu metod leczenia minimalizujących niepożądane działanie LPP na stres oksydacyjny i wzrost peroksydacji lipidów u pacjentów leczonych z powodu schizofrenii.

WNIOSKI

Klozapina, olanzapina i risperidon nie powodują istotnego wzrostu peroksydacji lipidów w ludzkim osoczu (24-godzinna inkubacja) w przeciwieństwie do haloperidolu, który wykazuje działanie prooksydacyjne.

PIŚMIENNICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

1. Dalla Libera A., Rigobello M.P., Bindoli A.: Inhibitory action of neuroleptic drugs and serotonin on dopamine autooxidation and lipid peroxidation. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 1995; 19: 291-298.
2. Khan M.M., Evans D.R., Gunna V. i wsp.: Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophr. Res.* 2002; 58: 1-10.
3. Arvindakshan M., Sitasawad S., Debsikdar V. i wsp.: Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. *Biol. Psychiatry*. 2003; 53: 56-64.
4. Dietrich-Muszalska A., Kontek B.: Lipid peroxidation in patients with schizophrenia. W druku 2008.
5. Mahadik S.P., Mukherjee S., Scheffer R.S. i wsp.: Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis. *Biol. Psychiatry* 1998; 43: 674-679.
6. Mukherjee S., Mahadik S.P., Horrobin D.F. i wsp.: Membrane fatty acid composition of fibroblasts from schizophrenic patients. *Biol. Psychiatry* 1994; 35: 701.
7. Shivakumar B.R., Ravindranath V.: Oxidative stress and thiol modification induced by chronic administration of haloperidol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993; 265: 1137-1141.
8. Pai B.N., Janakiramaiah N., Gangadhar B.N., Ravindranath V.: Depletion of glutathione and enhanced lipid peroxidation in the CSF of acute psychotics following haloperidol administration. *Biol. Psychiatry* 1994; 36: 489-491.
9. Mahadik S.P., Mukherjee S., Correnti E., Scheffer R.: Elevated levels of lipid peroxidation products in plasma from drug-naive patients at the onset of psychosis. *Schizophr. Res.* 1995; 15: 66.
10. Dietrich-Muszalska A., Olas B., Rabe-Jabłońska J.: Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. *Platelets* 2005; 16: 386-391.
11. Dietrich-Muszalska A., Olas B.: Isoprostanes as indicators of oxidative stress in schizophrenia. *World J. Biol. Psychiatry* 2007; 11: 1-7.
12. Yao J.K., Leonard S., Reddy R.D.: Membrane phospholipid abnormalities in postmortem brains from schizophrenic patients. *Schizophr. Res.* 2000; 42: 7-17.
13. Cadet J.L., Lohr J.B., Jeste D.V.: Free radical and tardive dyskinesia. *Trends Neurosci.* 1986; 9: 107-108.
14. Lohr M.A., Wasli E., Hilliard B. i wsp.: Self-perception of tardive dyskinesia and neuroleptic-induced parkinsonism:

a study of clinical correlates. *Psychopharmacol. Bull.* 1987; 23: 211-214.

15. Jeding I., Evans P.J., Akanmu D. i wsp.: Characterization of the potential antioxidant and pro-oxidant actions of some neuroleptic drugs. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 49: 359-365.
16. Sagara Y.: Induction of reactive oxygen species in neurons by haloperidol. *J. Neurochem.* 1998; 71: 1002-1012.
17. Parikh V., Khan M.M., Mahadik S.P.: Differential effects of antipsychotics on expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J. Psychiatr. Res.* 2003; 37: 43-51.
18. Kropp S., Kern V., Lange K. i wsp.: Depletion of glutathione and enhanced lipid peroxidation in the CSF of acute psychotics following haloperidol administration. *Biol. Psychiatry* 1994; 36: 489-491.
19. Gama C.S., Salvador M., Andreazza A.C. i wsp.: Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2006; 30: 512-515.
20. Zhang X.Y., Tan Y.L., Cao L.Y. i wsp.: Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics. *Schizophr. Res.* 2006; 81: 291-300.
21. Dietrich-Muszalska A.: The impact of different concentrations of haloperidol on lipids peroxidation in human blood platelets and plasma at *in vitro* studies. *Psychiatr. Psychol. Klin.* 2004; 4: 150-156.
22. Dietrich-Muszalska A., Jolanta Rabe-Jabłońska J.: A comparison of influence of clozapine, and haloperidol on lipid peroxidation in human plasma (*in vitro*). W druku.
23. Shao Z., Dyck L.E., Wang H., Li X.M.: Antipsychotic drugs cause glial cell line-derived neurotrophic factor secretion from C6 glioma cells. *J. Psychiatry Neurosci.* 2006; 31: 32-37.
24. Sheehan D.V., Lecrubier Y., Sheehan K.H. i wsp.: The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J. Clin. Psychiatry* 1998; 59 suppl. 20: 22-33.
25. Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R.: *Techniques in Free Radical Research*, Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo 1991.
26. Dal-Pizzol F., Klami F., Frota M.L. Jr i wsp.: Retinol supplementation induces DNA damage and modulates iron turnover in rat Sertoli cells. *Free Radic. Res.* 2000; 33: 677-687.
27. Mahadik S.P., Evans D., Lal H.: Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2001; 25: 463-493.
28. Lohr J.B., Underhill S., Moir S., Jeste D.V.: Increased indices of free radical activity in the cerebrospinal fluid of patients with tardive dyskinesia. *Biol. Psychiatry* 1990; 28: 535-539.
29. Reinke A., Martins M.R., Lima M.S. i wsp.: Haloperidol and clozapine, but not olanzapine, induces oxidative stress in rat brain. *Neurosci. Lett.* 2004; 372: 157-160.
30. Bai O., Wei Z., Lu W. i wsp.: Protective effects of atypical antipsychotic drugs on PC12 cells after serum withdrawal. *J. Neurosci. Res.* 2002; 69: 278-283.
31. Wei Z., Bai O., Richardson J.S. i wsp.: Olanzapine protects PC12 cells from oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *J. Neurosci. Res.* 2003; 73: 364-368.
32. Qing H., Xu H., Wei Z. i wsp.: The ability of atypical antipsychotic drugs vs. haloperidol to protect PC12 cells against MPP⁺-induced apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* 2003; 17: 1563-1570.
33. Desco M., Gispert J.D., Reig S. i wsp.: Cerebral metabolic patterns in chronic and recent-onset schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2003; 122: 125-135.