

PRACE ORYGINALNE

ORIGINAL CONTRIBUTIONS

Anna Dietrich-Muszalska^{1,2}, Anna Kwiatkowska², Justyna Kopka²,
Jolanta Rabe-Jabłońska¹

Wpływ stężeń terapeutycznych amisulprydu i risperidonu na peroksydację lipidów ludzkiego osocza – badania *in vitro*

The effects of therapeutic concentrations of amisulpride and risperidone on human plasma lipid peroxidation – *in vitro* studies

¹ I Katedra Psychiatrii, Klinika Zaburzeń Afektywnych i Psychotycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

² Pracownia Badań Biologicznych w Psychiatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Correspondence to: Dr hab. n. med. Anna Dietrich-Muszalska – kierownik Pracowni Badań Biologicznych w Psychiatrii Kliniki Zaburzeń Afektywnych i Psychotycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Czechosłowacka 8/10, 92-216 Łódź, tel. kom.: 691 881 787,

faks: 42 675 74 03, e-mail: tzn_lodz@post.pl

Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi: numer badań 502-11-100

The study was supported by internal grant of the Medical University of Lodz, Poland, No. 502-11-100

Streszczenie

Wprowadzenie: Leki przeciwpsychotyczne mogą wpływać w różny sposób na stres oksydacyjny, mierzony za pomocą peroksydacji lipidów osocza. Prawdopodobnie niektóre z nich mogą nasilać zaburzenia równowagi oksydacyjnej, występujące w schizofrenii. Działanie amisulprydu i risperidonu na procesy redoks nie jest dostatecznie poznane. **Cel badania:** Ustalenie wpływu amisulprydu i risperidonu na peroksydację lipidów ludzkiego osocza, mierzoną za pomocą oznaczenia stężenia związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), w modelu *in vitro*. **Materiał i metody:** Krew do badań pobrano od zdrowych ochotników (w wieku 24-26 lat) na roztwór ACD. Substancje aktywne badanych leków rozpuszczono w 0,01% dimetylosulfotlenku (DMSO) do stężeń końcowych (amisulprydu 578 ng/ml i risperidonu 64 ng/ml) i inkubowano z osoczem I i 24 godziny w temperaturze 37°C. Do każdego doświadczenia wykonano próby kontrolne osocza z DMSO (bez leku). Poziom peroksydacji lipidów mierzono w osoczu, oznaczając stężenie TBARS metodą spektrofotometryczną (wg Rice'a-Evansa, 1991). Do analizy wyników zastosowano metody statystyczne: sparowany test t-Studenta i analizę wariancji ANOVA II oraz test NIR (StatSoft Inc., Statistica v. 6.0). **Wyniki:** Analiza wariancji ANOVA II wykazała istotne różnice we wpływie obu leków na stężenie TBARS ($F=4,26$; $df=2$; $p<0,05$). W odniesieniu do prób kontrolnych amisulpryd po 24 godzinach inkubacji z osoczem spowodował istotny spadek stężenia TBARS ($p<0,003$), natomiast risperidon – wzrost stężenia TBARS o 14% ($p>0,05$). **Wniosek:** Amisulpryd i risperidon w stężeniach odpowiadających dawkom rekomendowanym do leczenia ostrego epizodu schizofrenii nie powodują stresu oksydacyjnego mierzonego za pomocą peroksydacji lipidów. W przeciwieństwie do risperidonu amisulpryd wywiera działanie antyoksydacyjne.

Słowa kluczowe: leki przeciwpsychotyczne, amisulpryd, risperidon, peroksydacja lipidów, stres oksydacyjny, schizofrenia

Summary

Introduction: Antipsychotics may in different ways affect the oxidative stress measured by plasma lipid peroxidation. Probably some of them may intensify the oxidative balance disturbances occurring in schizophrenia. The effects of amisulpride and risperidone on redox processes are not known sufficiently yet. **Aim of the study:** Establishment of the effects of amisulpride and risperidone on human plasma lipid peroxidation measured by determination of the level

of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), *in vitro*. **Material and methods:** Blood for the studies was collected from healthy volunteers (aged 24-26 years) for ACD solution. Active substances of the examined drugs were dissolved in 0.01% dimethylsulfoxide (DMSO) to the final concentrations (of amisulpride 578 ng/ml and risperidone 64 ng/ml) and incubated with plasma for 1 and 24 hours at 37°C. For each experiment the control samples of plasma with DMSO (without the drug) were performed. The lipid peroxidation level was measured in plasma by determining the TBARS concentration, using the spectrophotometric method (acc. to Rice-Evans, 1991). The results were analysed using the following statistical methods: the paired Student t-test and ANOVA II variance analysis and NIR test (StatSoft Inc., Statistica v. 6.0). **Results:** The ANOVA II variance analysis indicated significant differences in the effects of both drugs on TBARS level ($F=4.26$; $df=2$, $p<0.05$). With reference to control samples, amisulpride after 24 hours' incubation with plasma caused a significant decrease in TBARS concentration ($p<0.003$), whereas risperidone – an increase in TBARS concentration by 14% ($p>0.05$). **Conclusion:** Amisulpride and risperidone in concentrations corresponding to doses recommended for treatment of acute episode of schizophrenia do not induce oxidative stress measured by lipid peroxidation. Unlike risperidone, amisulpride exhibits antioxidative effects.

Key words: antipsychotics, amisulpride, risperidone, lipid peroxidation, oxidative stress, schizophrenia

WSTĘP

Od czasu opublikowania przez Hoffer'a i wsp. (1954) sugestii o udziale wolnych rodników w etiopatogenezie schizofrenii⁽¹⁾ podjęto szereg badań w celu udowodnienia tej hipotezy – badania te rozwinęły się szczególnie dynamicznie w ostatnich latach. U chorych na schizofrenię opisano różne zmiany w zakresie biomarkerów świadczące o stresie oksydacyjnym: podwyższony poziom reaktywnych form tlenu (ROS), obniżoną aktywność/stężenie markerów obrony antyoksydacyjnej, a także zwiększone uszkodzenia oksydacyjne i nitracyjne w elementach morfotycznych krwi, w osoczu, płynie mózgowo-rdzeniowym oraz w badaniach autopsyjnych mózgu⁽²⁻¹²⁾. Doświadczalne badania prowadzone na zwierzętach wskazują, że zwiększona peroksydacja lipidów i peroksydacyjne uszkodzenia neuronów mogą być wywołane przez niektóre leki przeciwpsychotyczne. W badaniach prowadzonych w modelu zwierzęcym wykazano zwiększoną peroksydację lipidów błon komórkowych i indukowanie stresu oksydacyjnego w czasie podawania haloperidolu oraz niektórych innych leków przeciwpsychotycznych^(13,14). Zauważono, że różne leki przeciwpsychotyczne II generacji (LPIIG) mogą wywierać wpływ na stres oksydacyjny w sposób zróżnicowany, ale zagadnienie to nie jest dostatecznie wyjaśnione. W kilku badaniach prowadzonych w modelu *in vitro* na komórkach PC12 stwierdzono, że LPIIG takie jak klozapina, olanzapina, kwetiapina czy risperidon chronią komórki przed apoptozą spowodowaną stresem oksydacyjnym, wywołanym doświadczalnie przez różne czynniki⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. W nielicznych badaniach klinicznych u chorych na schizofrenię (dość trudnych do przeprowadzenia *in vivo* ze względu na różne ograniczenia metodologiczne) sugerowano wpływ leczenia lekami przeciwpsychotycznymi na zmiany peroksydacji lipidów⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Wskazywano na zwiększoną peroksydację lipidów w czasie leczenia haloperidolem i brak istotnego wzrostu peroksydacji lipidów u pacjentów leczonych niektórymi LPIIG⁽¹⁸⁾. W badaniach własnych prowadzonych u chorych na schizofrenię leczonych niektórymi LPIIG wykazano ogólnoustrojowy stres oksydacyjny^(3,21) oraz oksydacyjne uszkodzenia białek i lipidów^(9,10). Jednocześnie w modelu *in vitro* nie stwierdzono działania prooksy-

INTRODUCTION

Since Hoffer et al. published (in 1954) a suggestion about the contribution of free radicals to etiopathogenesis of schizophrenia⁽¹⁾, a number of studies have been undertaken to prove this hypothesis; these studies have developed dynamically in recent years. In schizophrenic patients various changes within biomarkers, which point to oxidative stress, have been described: increased level of reactive oxygen species (ROS), decreased activity/concentration of antioxidative defence markers, as well as increased oxidative and nitrate damages in morphotic elements of blood, in plasma, cerebrospinal fluid, and in the brain *post mortem* examinations⁽²⁻¹²⁾. Experimental studies conducted on animals demonstrate that an increased lipid peroxidation and peroxidative damages to neurons may be induced by some antipsychotics. The experimental studies performed in the animal model indicated an increased lipid peroxidation in cell membranes and induction of oxidative stress when haloperidol and certain other antipsychotics were administered^(13,14). It has been noticed that various second generation antipsychotics (SGAs) may affect oxidative stress in different ways, but this issue has not been explained sufficiently yet. Several studies conducted *in vitro* on PC12 cells indicate that such SGAs as clozapine, olanzapine, quetiapine or risperidone protect the cells from apoptosis caused by oxidative stress induced experimentally by various factors⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Few clinical trials in schizophrenic patients (quite difficult to carry out *in vivo* because of various methodological limitations) implied an effect of the treatment with antipsychotics on alternation in lipid peroxidation⁽¹⁸⁻²⁰⁾. An increased lipid peroxidation was indicated during treatment with haloperidol, as well as the lack of a significant increase in lipid peroxidation in patients treated with some SGAs⁽¹⁸⁾. In our own studies carried out in schizophrenic patients treated with certain SGAs, a systemic oxidative stress^(3,21) and oxidative damages to proteins and lipids were demonstrated^(9,10). At the same time, *in vitro* did not demonstrate any prooxidative effects of these drugs in concentrations corresponding to the drug doses administered in treatment of acute schizophrenia episode, as opposed to the first

dacyjnego tych leków w stężeniach odpowiadających dawkom leku stosowanym w leczeniu ostrego epizodu schizofrenii, w przeciwieństwie do leku I generacji (LPIG) – haloperidolu, który zwiększając istotnie stężenie TBARS, wykazywał działanie prooksydacyjne^(22,23).

Zarówno w badaniach klinicznych, jak i przedklinicznych nie ustalono działania amisulpridu na procesy redoks, w niewielkim zakresie prowadzono też takie badania w przypadku risperidonu.

Amisulpryd (4-amino-*N*-[(1-etylopirolidyn-2-ylo)metylo]-5-etylosulfonylo-2-metoksybenzamid) jest pochodną benzamidu, która wiąże się wybiórczo z receptorami dopaminergicznymi D₂ i D₃ w układzie mezolimbicznym (dwukrotnie silniej z receptorami D₃), nie wykazując powinowactwa do receptorów D₁, D₄ i D₅^(24,25). W odróżnieniu od większości leków przeciwpsychotycznych amisulpryd nie wykazuje powinowactwa do receptorów serotoninergicznych (5HT_{1A} i 5HT_{2A}), α-adrenergicznych, histaminowych H₁ i cholinergicznymi⁽²⁶⁾. Amisulpryd selektywnie wysyca receptory D₂/D₃ w korze mózgu i wzgórzu⁽²⁷⁾, a jego powinowactwo do receptorów układu limbicznego jest większe niż do receptorów w strukturach prążkowania. W mniejszych dawkach (do 10 mg/kg) amisulpryd blokuje głównie receptory presynaptyczne D₂ i D₃ w korze mózgu, nasilając uwalnianie dopaminy przez osłabienie ujemnego sprzężenia zwrotnego⁽²⁶⁾. Z kolei większe dawki leku (>10 mg/kg) blokują receptory postsynaptyczne, osłabiając transmisję dopaminergiczną⁽²⁸⁾. Ich względnie wybiórcze działanie w obszarze limbicznym w stosunku do prążkowania klinicznie oznacza niski potencjał wywoływania objawów pozapiramidowych. Amisulpryd podany doustnie szybko się wchłania i osiąga dwa stężenia maksymalne: po 1 godzinie oraz po 3-4 godzinach, natomiast stałe stężenie osiąga po 2-3 dniach podawania⁽²⁹⁾. Muller i wsp. (2007 r.) wykazali liniową zależność pomiędzy dawką dobową i stężeniem leku we krwi – dzienne dawki amisulpridu (594±262 mg) osiągały stężenie leku w osoczu 315±277 ng/ml^(29,30). W pracach innych autorów opisano występowanie podobnych stężeń amisulpridu w osoczu po podaniu podobnych dziennych dawek leku⁽³¹⁾. Zidentyfikowano tylko dwa nieaktywne metabolity amisulpridu stanowiące w przybliżeniu 4% podanej dawki. Amisulpryd nie kumuluje się w organizmie, a jego farmakokinetyka po powtarzonym dawkowaniu pozostaje niezmienną⁽³²⁾. Po podaniu doustnym okres półtrwania amisulpridu w fazie eliminacji wynosi 12 godzin.

Risperidon (3-{2-[4-(6-fluoro-1,2-benzoksazol-3-ilo)piperidyn-1-ylo]etylo}-2-metylo-4H,6H,7H,8H,9H-pirydo[1,2-a]pirymidyn-4-on) jest pochodną benzoksazolu, charakteryzującą się bardzo dużym powinowactwem do receptorów 5-HT_{2A} i umiarkowanie dużym powinowactwem do receptorów dopaminergicznymi D₂, histaminowych H₁ oraz receptorów α₁- i α₂-adrenergicznych. Zasadniczo nie wykazuje powinowactwa do receptorów muskarynowych. Powinowactwo do receptorów 5-HT_{2A} jest ponad 100-krotnie silniejsze niż do innych podtypów receptora serotoniny⁽³²⁾. Risperidon „łączy” antagonizm receptorów 5-HT₂ z blokadą D₂ i jest „ściśle związany” z receptorem D₂, ze stałą dysocjacji mniejszą niż dla dopaminy (DA)⁽³²⁾. Jego aktywny metabolit 9-hydroksyrisperidon (paliperidon) ma podobny profil powinowactwa do receptorów jak risperidon. Antagonizm risperidonu do receptorów 5-HT_{2A} częściowo chroni przed wystąpieniem neuro-

generation antipsychotic (FGA) – haloperidol which, significantly increasing the TBARS concentration, exhibited prooxidative effects^(22,23).

Neither clinical nor preclinical studies indicated amisulpride effects on redox processes; such trials were also conducted for risperidone, though to a limited extent. **Amisulpride** (4-amino-*N*-[(1-ethylpyrrolidin-2-yl)methyl]-5-ethylsulfonyl-2-methoxybenzamide) is a derivative of benzamide which binds selectively with dopaminergic receptors D₂ and D₃ in mesolimbic system (twice more strongly with receptors D₃), showing no affinity to receptors D₁, D₄ and D₅^(24,25). Unlike most antipsychotics, amisulpride does not exhibit any affinity to serotonergic (5HT_{1A} and 5HT_{2A}), α-adrenergic, histamine H₁ and cholinergic receptors⁽²⁶⁾. Amisulpride selectively saturates receptors D₂/D₃ in cerebral cortex and thalamus⁽²⁷⁾, and its affinity to the limbic system receptors is higher than to the receptors in striatum structures. In lower doses (up to 10 mg/kg), amisulpride inhibits mainly presynaptic receptors D₂ and D₃ in cerebral cortex, increasing the release of dopamine by reducing the negative feedback⁽²⁶⁾. On the other hand, higher doses of the drug (>10 mg/kg) inhibit postsynaptic receptors, reducing dopaminergic transmission⁽²⁸⁾. Their relatively selective effects in the limbic region in relation to striatum clinically mean a low potential of inducing extrapyramidal symptoms. Orally administered amisulpride is absorbed fast and achieves two maximum concentrations: after 1 hour and after 3-4 hours, whereas after 2-3 days of administration it reaches steady-state concentration⁽²⁹⁾. Muller et al. (in 2007) showed a linear correlation between the drug's daily dose and blood concentration – daily doses of amisulpride (594±262 mg) achieved the drug's plasma concentration of 315±277 ng/ml^(29,30). Other authors described the occurrence of similar concentrations of amisulpride in plasma after administration of similar daily doses of the drug⁽³¹⁾. Only two inactive metabolites of amisulpride were identified, constituting approximately 4% of the administered dose. Amisulpride does not cumulate in the organism, and its pharmacokinetics after repeated dosage remain unchanged⁽³²⁾. After oral administration, amisulpride's half-life in the elimination phase reaches 12 hours.

Risperidone (3-{2-[4-(6-fluoro-1,2-benzoxazol-3-yl)piperidin-1-yl]ethyl}-2-methyl-4H,6H,7H,8H,9H-pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one) is a derivative of benzisoxazol, characterised by a very high affinity to receptors 5-HT_{2A} and moderately high affinity to dopaminergic receptors D₂, histamine H₁ receptors and α₁- and α₂-adrenergic receptors. Basically, it does not exhibit any affinity to muscarinic receptors. Affinity to receptors 5-HT_{2A} is over 100-fold stronger than to other subtypes of serotonin receptor⁽³²⁾. Risperidone “combines” the antagonism of receptors 5-HT₂ with blockade D₂ and is “strictly bounded” with receptor D₂, with the dissociation constant lower than for dopamine (DA)⁽³²⁾. Its active metabolite 9-hydroxyrisperidone (paliperidone) has a similar affinity profile to receptors as risperidone. The antagonism of risperidone to receptors 5-HT_{2A} partly protects against the occurrence of neurological adverse symptoms induced by antagonists of receptor D₂, it may also reduce negative symptoms of schizophrenia

logicznych objawów niepożądanych, indukowanych przez antagonistów receptora D_2 , może również zmniejszyć objawy negatywne schizofrenii oraz poprawić funkcje poznawcze poprzez modulowanie aktywności mezokortycznej $DA^{(32)}$. Z kolei blokada autoreceptorów może zwiększyć przedczołową aktywność korową i skuteczność przeciwpsychotyczną, poprzez modulowanie aktywności mezolimbicznej $DA^{(32)}$. Risperidon w odróżnieniu od innych leków atypowych (LPIIG) nie różni się od klasycznych neuroleptyków (LPIIG) pod względem stałej dysocjacji od receptora D_2 . Cecha ta wydaje się wyjaśniać ryzyko wystąpienia objawów pozapiramidowych podczas stosowania wyższych dawek tego leku oraz większą skłonność do powodowania hiperprolaktynemii. Risperidon po podaniu doustnym wchłania się szybko, osiągając maksymalne stężenie w osoczu w ciągu 1 godziny⁽³³⁾. Ustalono w badaniach I fazy, że risperidon dawkowany pomiędzy 0,5 a 25 mg/dobę wykazuje linearną farmakokinetykę⁽³²⁾. Dzielne dawki risperidonu 4-8 mg/dobę (średnio $6,3 \pm 1,2$ mg) osiągały stężenie w osoczu 2-66 ng/ml (średnio 16 ± 18 ng/ml)^(33,34). Risperidon jest metabolizowany w wyniku hydroksylacji pierścienia tetrahydrobiopirymidynu w pozycjach 7. i 9. oraz w wyniku oksydacyjnej N-dealkilacji⁽³³⁾. Jego metabolit 9-hydroksyrisperidon ma profil powinowactwa do receptorów podobny do risperidonu i jest odpowiedzialny za wydalanie z moczem przeważnie do 31% dawki związku macierzystego⁽³⁵⁾. W wielośrodkowym badaniu rejestracyjnym (USA) wykazano, że korelacje pomiędzy dawką risperidonu a stężeniem risperidonu i 9-hydroksyrisperidonu w osoczu wynosiły odpowiednio 0,59 i 0,88⁽³²⁾. Hydroksylacja risperidonu jest katalizowana przez izoenzym 2D6 cytochromu P450, w związku z tym okres półtrwania leku zależy od aktywności tego enzymu. Osoby słabo metabolizujące lek (*poor metabolizers*) metabolizują risperidon przede wszystkim w szlakach oksydacyjnych i okres półtrwania leku może przekraczać 20 godzin, natomiast u osób „szybko metabolizujących” (*extensive metabolizers*) okres półtrwania risperidonu wynosi około 3 godzin. Aktywny metabolit 9-hydroksyrisperidon jest wolniej metabolizowany w wyniku oksydacyjnej N-dealkilacji^(32,33). Aktywność izoenzymu 2D6 cytochromu P450 istotnie wpływa na okres półtrwania risperidonu i na relatywny stosunek risperidonu do 9-hydroksyrisperidonu w osoczu, jednak u osób „dobrze i źle” metabolizujących risperidon stężenie „aktywnej domeny” (składającej się z risperidonu i 9-hydroksyrisperidonu) mierzone w osoczu nie różni się istotnie^(32,33). Stężenie w osoczu „aktywnej domeny” o działaniu przeciwpsychotycznym jest liniowo powiązane z dawkami risperidonu. Niewielka zmienność osobnicza w okresie półtrwania i stężeniu „aktywnej domeny” w osoczu wyjaśnia mechanizm kompensacyjny pomiędzy jej składnikami: risperidonem i 9-hydroksyrisperidonem, niezależny od metabolicznego statusu pacjenta.

CEL BADANIA

Celem badania jest porównanie, w warunkach *in vitro*, wpływu wywieranego przez amisulpryd i risperidon na peroksydację lipidów ludzkiego osocza, mierzoną za pomocą oznaczenia stężenia związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS).

and improve cognitive functions by modulating the mesocortical activity $DA^{(32)}$. Instead, the autoreceptors' blockade may increase the prefrontal cortical activity and antipsychotic efficacy by modulating the mesolimbic activity $DA^{(32)}$. Unlike other atypical drugs (SGAs), risperidone does not differ from typical neuroleptics (FGAs) in respect of the constant dissociation from receptor D_2 . This feature seems to explain the risk of the occurrence of extrapyramidal symptoms during the use of higher doses of this drug and a higher predisposition to induce hyperprolactinaemia. Risperidone after oral administration is absorbed fast, achieving maximum plasma concentration within 1 hour⁽³³⁾. The 1st phase examinations indicate that risperidone in doses between 0.5 and 25 mg/daily exhibits linear pharmacokinetics⁽³²⁾. Daily doses of risperidone of 4-8 mg/day (on average 6.3 ± 1.2 mg) reached the plasma concentration of 2-66 ng/ml (on average 16 ± 18 ng/ml)^(33,34). Risperidone is metabolised in result of hydroxylation of tetrahydrobiopyrimidinone in positions 7 and 9 and in result of oxidative N-dealkylation⁽³³⁾. Its metabolite – 9-hydroxyrisperidone has a profile of affinity to receptors similar to risperidone and accounts for urination usually up to 31% of the mother compound's dose⁽³⁵⁾. The multicentre registration study (USA) demonstrated that the correlations between risperidone dose and risperidone concentration and 9-hydroxyrisperidone in plasma amounted respectively to 0.59 and 0.88⁽³²⁾. Hydroxylation of risperidone is catalysed by isoenzyme 2D6 of cytochrome P450, therefore the drug's half-life depends on the activity of this enzyme. The people who are poor metabolizers metabolise risperidone mostly in oxidative tracks and the drug's half-life may exceed 20 hours, whereas in extensive metabolizers the risperidone half-life reaches approximately 3 hours. Active metabolite 9-hydroxyrisperidone is metabolised more slowly in result of oxidative N-dealkylation^(32,33). The activity of isoenzyme 2D6 of cytochrome P450 significantly affects risperidone's half-life and relative ratio of risperidone to 9-hydroxyrisperidone in plasma, however in people who metabolise risperidone “well and badly” the concentration of an “active domain” (consisting of risperidone and 9-hydroxyrisperidone) measured in plasma does not differ significantly^(32,33). The plasma concentration of the „active domain” of antipsychotic effects is linearly connected with risperidone doses. A slight individual variability during the half-life and the “active domain” concentration in plasma explains the compensatory mechanism between its components: risperidone and 9-hydroxyrisperidone, independent of the patient's metabolic status.

AIM OF THE STUDY

The study is aimed at the comparison, under *in vitro* conditions, of the effects of amisulpride and risperidone on lipid peroxidation of human plasma, measured by determination of the concentration of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS).

MATERIAL AND METHODS

The research material consisted of fresh blood plasma obtained from peripheral blood samples mixed with ACD (citric

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło świeże osocze wyizolowane z krwi pobranej na antykoagulant ACD (kwas cytrynowy/cytrynian sodu/dekstroza; 5:1 v/v). Krew pobrano od 20 zdrowych mężczyzn (studentów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi) w wieku 24-26 lat (średnio $25 \pm 0,6$ roku). Do oceny stanu zdrowia psychicznego zastosowano M.I.N.I. – Mini-International Neuropsychiatric Interview (Sheehan i wsp., 1998)⁽³⁶⁾. Przeprowadzono badania internistyczne, neurologiczne i laboratoryjne oraz kwestionariuszowe wywiady dotyczące przebytych chorób, nawyków żywieniowych, stosowanych leków, antyoksydantów pochodzenia roślinnego i farmaceutycznego oraz używanych substancji psychoaktywnych. Do badań przyjęto osoby pochodzenia polskiego, żyjące w podobnych warunkach socjoekonomicznych, zdrowe (bez chorób psychicznych i somatycznych), bez cech zespołu metabolicznego (w tym zaburzeń gospodarki lipidowej i węglowodanowej), stosujące dietę zrównoważoną, które nie używały substancji psychoaktywnych (narkotyków, alkoholu, nikotyny), jakichkolwiek leków i nie suplementowały antyoksydantów pochodzenia roślinnego lub farmaceutycznego ani preparatów zawierających wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Na badania wyraziła zgodę Komisja Etyczna Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – numer RNN/899/2000. Ochotnicy uzyskali informację na temat celu i metod badania oraz wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu.

IZOLOWANIE OSOCZA I INKUBACJA OSOCZA Z LEKIEM

Pobraną krew (2×9 ml) wirowano 20 min przy 2500 obr./min w wirówce SIGMA 3K30, w temperaturze 20°C w celu otrzymania osocza ubogopłytkowego. Do 0,5 ml osocza ubogopłytkowego (PPP) dodawano kolejno substancję czynną badanych leków, rozpuszczoną w 0,01% dimetylosulfotlenku – DMSO (stężenia końcowe, odpowiadające stabilnemu stężeniu leku, osiąganemu po wielokrotnym zastosowaniu dawek stosowanych w leczeniu ostrego epizodu schizofrenii: amisulpryd 578 ng/ml, risperidon 64 ng/ml). Substancje czynne badanych leków otrzymano z firm farmaceutycznych: amisulpryd z Sanofi-Synthelabo (Francja), risperidon z Janssen-Cilag (Belgia). Badane próby osocza z lekami rozpuszczonymi w DMSO inkubowano 1 i 24 godziny w temperaturze pokojowej. Do każdego doświadczenia wykonano próby kontrolne, które stanowiło osocze z DMSO, bez leku. W próbach osocza badanego po 1- i 24-godzinnej inkubacji z określonym stężeniem leku oraz w próbach kontrolnych oznaczano spektrofotometrycznie stężenie związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) metodą opisaną przez Rice'a-Evansa⁽³⁷⁾.

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)

acid/sodium citrate/dextrose; 5:1 v/v). Blood samples were obtained from 20 healthy men (students of the Medical University of Lodz) aged 24-26 (mean age 25 ± 0.6 years). The patients' mental health was assessed using the M.I.N.I. – Mini-International Neuropsychiatric Interview (Sheehan et al., 1998)⁽³⁶⁾. All patients underwent formal medical, neurological examinations and laboratory tests. Besides, a structured medical interview was carried out, concerning past diseases, dietary habits, used drugs, antioxidants of vegetable and pharmaceutical origin, and psychoactive substances. People of Polish origin were admitted to the studies, who lived in similar socioeconomic conditions, healthy (without mental and somatic diseases), without features of metabolic syndrome (including disorders in lipid and carbohydrate metabolism), using a balanced diet, who did not use psychoactive substances (narcotics, alcohol, tobacco), drugs or antioxidants of vegetable or pharmaceutical origin and preparations containing polyunsaturated fatty acids. The study has been approved by the Ethical Committee of the Medical University of Lodz – No RNN/899/2000. The volunteers included in the study have been informed about its aims and implemented methods and expressed their written consent for participation in it.

ISOLATION OF BLOOD PLASMA AND INCUBATION OF PLASMA WITH DRUGS

The collected blood (2×9 ml) was centrifuged for 20 minutes at 20°C and 2500 rpm (SIGMA 3K30 centrifuge) to obtain platelet poor plasma. Active substances of particular drugs, dissolved in 0.01% dimethylsulfoxide – DMSO were added consecutively to 0.5 ml of platelet poor plasma (PPP) (the final concentration, corresponding to stable concentration of the drug achieved after multiple use of the doses used in the treatment of acute schizophrenic episode: amisulpride 578 ng/ml, risperidone 64 ng/ml). Active substances of the tested drugs were supplied by respective pharmaceutical companies: amisulpride by Sanofi-Synthelabo (France), risperidone by Janssen-Cilag (Belgium). The tested samples of plasma with the drugs dissolved in DMSO were incubated for 1 and 24 hours at room temperature. Each set of samples was accompanied by a control sample consisting of plasma with DMSO, without the drug. After 1 and 24 hours' incubation, plasma samples with predefined drug concentrations and control samples were tested spectrophotometrically for the level of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), using the Rice-Evans method⁽³⁷⁾.

DETERMINATION OF THE LEVEL OF THIOBARBITURIC ACID-REACTIVE SUBSTANCES (TBARS)

0.5 ml of control samples (no drug) and 0.5 ml of the tested 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% thiobarbituric acid (TBA) in 0.25 M HCl. The samples were mixed and heated in a boiling water bath for 10 minutes. Then the samples were centrifuged

dodano 0,5 ml 15% kwasu trichlorooctowego (TCA) w 0,25 M HCl i 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 min (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 ($\epsilon=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Oznaczenia stężenia TBARS wykonano dla każdego leku po 1- i 24 godzinnej inkubacji osocza z lekiem, w dwukrotnych powtórzeniach.

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 dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA II i *post hoc* test NIR. Do badań zastosowano pakiet StatSoft Inc., Statistica v. 6.0.

WYNIKI

Amisulpryd po 24-godzinnej inkubacji z osoczem, w porównaniu z próbkami kontrolnymi, powodował znaczący spadek peroksydacji lipidów, wyrażonej stężeniem TBARS ($p<0,003$). Natomiast po 1 godzinie inkubacji amisulprydu z osoczem nie wystąpiły istotne zmiany w stężeniu TBARS w porównaniu z próbkami kontrolnymi ($p>0,05$). Risperidon po 1- i 24-godzinnej inkubacji z osoczem spowodował odpowiednio spadek (4%) lub wzrost (14%) stężenia TBARS w odniesieniu do prób kontrolnych bez leku. Różnice te nie są istotne statystycznie. Porównując różnice w stężeniach TBARS wywołanych inkubacją osocza z badanymi lekami dwuczynnikową analizą wariancji ANOVA II, wykazano, że amisulpryd i risperidon różnią się istotnie w wywieranym wpływie na peroksydację lipidów ($F=4,26$; $df=2$; $p<0,05$, czas inkubacji $p>0,05$, interakcja lek – czas $p>0,002$). Analiza *post hoc* testem NIR wykazała, że amisulpryd w osoczu inkubowanym 24 godziny z badanym lekiem wywiera wpływ na stężenie TBARS istotnie różny od risperidonu ($p<0,0004$) (rys. 1). Wyniki tych badań wskazują, że oba leki przeciwpsychotyczne II generacji (amisulpryd i risperidon) w dawkach rekomendowanych do leczenia ostrego epizodu schizofrenii nie indukują oksydacyjnego stresu mierzonego za pomocą peroksydacji lipidów. Amisulpryd po 24 godzinach inkubacji spowoduje istotny spadek stężenia TBARS w osoczu, wykazując działanie antyoksydacyjne.

OMÓWIENIE

Obecne wyniki badań, zarówno przedklinicznych, jak i klinicznych, nie rozstrzygają, jaki wpływ różne LPIIG wywiera-

for 15 minutes (8000 rpm, SIGMA 3K30 centrifuge) to obtain a transparent and clear supernatant. Light absorption of the supernatant was measured using 1 cm thick cuvette at $\lambda=535$ nm (SEMCO spectrophotometer). TBARS content in particular samples was calculated basing on absorbance value, using the molar extinction coefficient ($\epsilon=1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). The level of TBARS was determined for each drug after 1 and 24 hours' incubation of plasma with the drug. The measurements were repeated in duplicate.

STATISTICAL ANALYSIS

The obtained results of the studies were subjected to statistical analysis, calculating arithmetical means, standard deviations of the mean value and variance coefficients for the tested parameters. The significance of differences in TBARS level between the samples incubated with drugs and the control samples was determined using the Student t-test for dependent variables (paired test). The influence of the tested drugs on lipid peroxidation was compared basing on calculated differences in TBARS levels between the samples incubated with drugs and the control samples, besides the two-factor variance analysis (ANOVA II) and *post hoc* test NIR were carried out. Package StatSoft Inc., Statistica v. 6.0 was used for the studies.

RESULTS

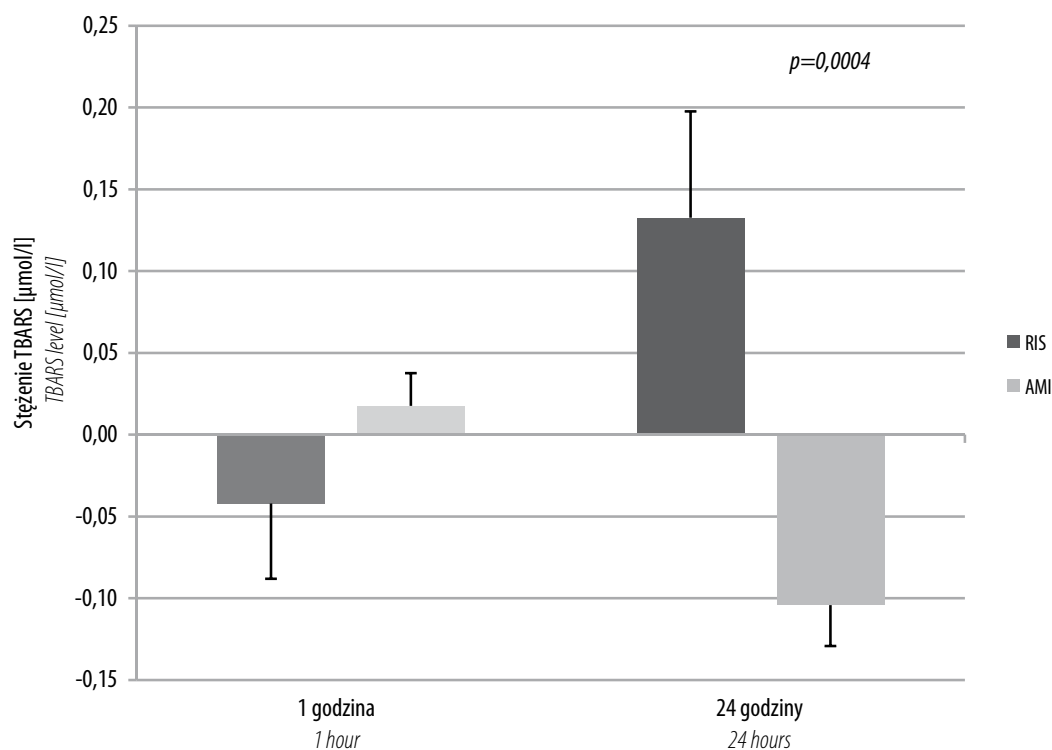
Amisulpride after 24 hours' incubation with blood plasma, as compared to the control samples, caused a significant decrease in lipid peroxidation expressed with TBARS level ($p<0.003$). On the other hand, after 1 hour's incubation of amisulpride with blood plasma there were no significant changes in TBARS concentration, as compared to control samples ($p>0.05$). Risperidone, after 1 and 24 hours' incubation with plasma, caused respectively a decrease (4%) or increase (14%) in TBARS level, as compared to the control samples without the drug. These differences are not statistically significant. A comparison of the differences in TBARS levels induced by the blood plasma incubation with the tested drugs using the two-factor variance analysis ANOVA II demonstrates that amisulpride and risperidone differ significantly in their impact on lipid peroxidation ($F=4.26$; $df=2$; $p<0.05$, incubation time $p>0.05$, interaction drug – time $p>0.002$). The *post hoc* analysis, carried out by NIR test, indicated that amisulpride in the blood plasma, incubated for 24 hours with the tested drug, affected the TBARS level significantly different from risperidone ($p<0.0004$) (fig. 1). The results of these studies indicate that both second generation antipsychotics (amisulpride and risperidone) at the doses recommended for treatment of acute schizophrenia episode do not induce the oxidative stress measured by lipid peroxidation. Amisulpride after 24 hours' incubation causes a significant decrease in TBARS concentration in blood plasma, exhibiting antioxidative effects.

DISCUSSION

The current results of the studies, both preclinical and clinical, do not determine the impact of different SGAs on oxida-

ją na stres oksydacyjny i zmiany poziomu peroksydacji lipidów. Perokсыdacja lipidów wiąże się z toksycznym działaniem wielu związków chemicznych i może brać udział w uszkodzeniu komórek w różnych procesach chorobowych. TBARS należy do dobrze znanych produktów perokсыdacji lipidów i jest używany jako marker tego procesu⁽³⁸⁾. Wzrost stężenia TBARS wykazywano u osób chorych na schizofrenię^(2,3,21,39), a także opisywano wpływ na stężenie TBARS (lub dialdehydu malonowego – MDA) w modelu zwierzęcym leków przeciwpsychotycznych I i II generacji, takich jak chlorpromazyna, haloperidol, risperidon, olanzapina, klozapina^(14,40,41). Podobnie wyniki badań prowadzone u chorych na schizofrenię wskazywały na wpływ leków przeciwpsychotycznych na stężenie TBARS i markery obrony antyoksydacyjnej^(19-21,42,43). Stężenie TBARS lub MDA było wyższe u pacjentów leczonych LPIG niż u pacjentów otrzymujących LPIIG⁽¹⁸⁾. Z kolei w badaniach Zhang i wsp. (2006) wykazano, że aktywność enzymów antyoksydacyjnych (dysmutazy ponadtlenkowej – SOD, perokсыdazy glutationowej – GPx) była znacząco niższa u chorych na schizofrenię, natomiast po leczeniu klozapiną lub risperidone nie stwierdzono znaczących różnic w stężeniu MDA i aktywności enzymów: SOD, GPx i katalazy – CAT⁽²⁰⁾. Jednak w innych badaniach (Dakhale i wsp., 2004) wykazano, że 8-tygodniowe leczenie lekami przeciwpsychotycznymi II generacji znacząco zmniejsza stężenie MDA w osoczu⁽⁴³⁾. Wyniki tych badań wskazują na zróżnicowany wpływ leków przeciwpsychotycznych I i II generacji na markery perokсыdacji lipidów i aktywność enzymów antyoksydacyjnych u chorych na schizofrenię wynikający prawdopodobnie

tywny stress and changes in the lipid peroxidation level. The lipid peroxidation is associated with toxic effects of many chemical compounds and may participate in damaging the cells in various pathological processes. TBARS belongs to well-known products of lipid peroxidation and is used as a marker of this process⁽³⁸⁾. An enhanced TBARS level was indicated in schizophrenic patients^(2,3,21,39), furthermore, the impact of the FGAs and SGAs, such as chlorpromazine, haloperidol, risperidone, olanzapine and clozapine on TBARS level (or malondialdehyde – MDA) in the animal model was described^(14,40,41). Similarly, the results of studies in schizophrenic patients showed an effect of antipsychotics on TBARS level and markers of antioxidative protection^(19-21,42,43). The level of TBARS or MDA was higher in patients treated with the FGAs than in those treated with the SGAs⁽¹⁸⁾. On the other hand, the studies carried out by Zhang et al. (in 2006) indicated that the activity of antioxidative enzymes (superoxide dismutase – SOD, glutathione peroxidase – GPx) was significantly lower in schizophrenic patients, whereas after treatment with clozapine or risperidone no significant differences were found in MDA concentration and activity of enzymes: SOD, GPx and catalase – CAT⁽²⁰⁾. However, other studies (Dakhale et al., 2004) indicated that the 8-week treatment with the second generation antipsychotics significantly reduces the plasma level of MDA⁽⁴³⁾. The results of those studies point to the differentiated impact of the first and second generation antipsychotics on markers of lipid peroxidation and activity of antioxidative enzymes in schizophrenic patients which probably results from complex mecha-



Rys. 1. Wpływ działania amisulprydu i risperidonu na stężenie TBARS po 1 i 24 godzinach inkubacji osocza z lekiem – badania in vitro
Fig. 1. The effects of amisulpride and risperidone on TBARS level after 1 and 24 hours' incubation of blood plasma with the drug – in vitro studies

ze złożonych mechanizmów ich komórkowego i molekularnego działania. Nasze wyniki badań, prowadzone w układzie *in vitro*, wskazują, że amisulpryd nie powoduje wzrostu peroksydacji lipidów, a nawet po 24-godzinnej inkubacji istotnie zmniejsza stężenie TBARS – markera peroksydacji lipidów, co jest zgodne z obserwacjami klinicznymi Kroppa i wsp.⁽¹⁸⁾ Kropp odnotował, że po 3-tygodniowym okresie leczenia pacjentów chorych na schizofrenię amisulprydem (średnia dawka 447,2 mg/dobę), podobnie jak risperidonem (średnia dawka 4,7 mg/dobę) nie występuje wzrost stężenia TBARS⁽¹⁸⁾. W naszym badaniu nie stwierdziliśmy, aby risperidon powodował istotny wzrost peroksydacji lipidów osocza w odniesieniu do prób kontrolnych bez leku (*in vitro*). Wyniki te są zgodne z wnioskami z badań innych autorów wskazującymi na ochronne właściwości risperidonu przed apoptozą wywołaną w hodowlach komórek przez indukowany różnymi czynnikami stres oksydacyjny⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ oraz z brakiem istotnego wzrostu peroksydacji lipidów u pacjentów leczonych risperidonem⁽¹⁸⁾. W badaniach prowadzonych na zwierzętach, którym podawano przewlekle risperidon, Parikh i wsp. (2003) nie wykazali wzrostu peroksydacji lipidów w różnych strukturach mózgu⁽¹⁴⁾. Podobne wyniki badań w modelu zwierzęcym uzyskali również inni autorzy⁽⁴⁴⁾.

W świetle ustaleń, że stres oksydacyjny jest zaangażowany w etiopatogenezę schizofrenii, badania zmierzające do określenia wpływu leków przeciwpsychotycznych stosowanych w sposób przewlekły w tej chorobie są niewątpliwie bardzo ważne zarówno ze względów poznawczych, jak i praktycznych. Zależność między stosowaniem leków a stresem oksydacyjnym wymaga dalszych badań, a ich wyniki mogą istotnie wpłynąć na poszukiwanie nowych, lepszych metod leczenia chorych z zaburzeniami psychicznymi, uwzględniających złożone aspekty zaburzeń równowagi pro- i antyoksydacyjnej.

WNIOSKI

Risperidon nie powoduje istotnego wzrostu peroksydacji lipidów w ludzkim osoczu w czasie 24-godzinnej inkubacji, z kolei amisulpryd, powodując istotny spadek peroksydacji lipidów, wykazuje działanie antyoksydacyjne.

PIŚMIENNICTWO: BIBLIOGRAPHY:

1. Hoffer A., Osmond H., Smythies J.: Schizophrenia; a new approach. II. Result of a year's research. *J. Ment. Sci.* 1954; 100: 29-45.
2. Dietrich-Muszalska A., Olas B., Rabe-Jabłońska J.: Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. *Platelets* 2005; 16: 386-391.
3. Dietrich-Muszalska A., Olas B.: Isoprostanes as indicators of oxidative stress in schizophrenia. *World J. Biol. Psychiatry* 2009; 10: 27-33.
4. 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.

nisms of their cellular and molecular effects. Our results of the studies carried out *in vitro* indicate that amisulpride does not cause an increase in lipid peroxidation, and even after 24 hours' incubation significantly reduces the level of TBARS – marker of lipid peroxidation, which conforms with clinical observations of Kropp et al.⁽¹⁸⁾ Kropp noted that after a 3-week treatment of schizophrenic patients with amisulpride (average dose 447.2 mg/24 hours), similarly as with risperidone (average dose 4.7 mg/24 hours) the level of TBARS is not elevated⁽¹⁸⁾. Our study did not show that risperidone would cause a significant elevation of the blood plasma lipid peroxidation in the case of control samples without the drug (*in vitro*). These results conform with the conclusions from the studies carried out by other authors which point to protective properties of risperidone against apoptosis induced in cellular cultures, by the oxidative stress induced by various factors⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ and with the lack of a significant elevation of lipid peroxidation in patients treated with risperidone⁽¹⁸⁾. In their studies on animals chronically administered with risperidone, Parikh et al. (2003) did not show any elevation of lipid peroxidation in different structures of the brain⁽¹⁴⁾. Similar results of the studies in the animal model were also obtained by other authors⁽⁴⁴⁾.

In the light of the contribution of oxidative stress to etiopathogenesis of schizophrenia, the studies aimed at determining the effects of antipsychotics used chronically in this disease are surely very important both for research and practical respects. The correlation between the use of drugs and the oxidative stress has to be investigated further, and the results of such investigations may significantly affect searching for new, better methods of treatment for patients with mental disorders, considering the complex aspects of disturbed pro- and antioxidative balance.

CONCLUSIONS

Risperidone does not cause a significant elevation of lipid peroxidation in human plasma during 24 hours' incubation, whereas amisulpride, causing a significant decrease in lipid peroxidation, exhibits antioxidative effects.

5. Mahadik S.P., Mukherjee S., Correnti E.E., Scheffer R.: Elevated levels of lipid peroxidation products in plasma of drug-naive patients at the onset of psychosis. *Schizophr. Res.* 1995; 15: 66.
6. Reddy R.D., Yao J.K.: Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 1996; 55: 33-43.
7. Yao J.K., Reddy R., McElhinny L.G., van Kammen D.P.: Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 1998; 32: 1-8.
8. Yao J.K., Reddy R.D., van Kammen D.P.: Human plasma glutathione peroxidase and symptom severity in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 1999; 45: 1512-1515.
9. Dietrich-Muszalska A., Olas B.: Modifications of blood platelet proteins of patients with schizophrenia. *Platelets* 2009; 20: 90-96.

10. Dietrich-Muszalska A., Olas B., Glowacki R., Bald E.: Oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and thiols from patients with schizophrenia. *Neuropsychobiology* 2009; 59: 1-7.
11. Lohr J.B., Kuczenski R., Bracha H.S. i wsp.: Increased indices of free radical activity in the cerebrospinal fluid of patients with tardive dyskinesia. *Biol. Psychiatry* 1990; 28: 535-539.
12. Yao J.K., Leonard S., Reddy R.D.: Increased nitric oxide radicals in postmortem brain from patients with schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 2004; 30: 923-934.
13. Sagara Y.: Induction of reactive oxygen species in neurons by haloperidol. *J. Neurochem.* 1998; 71: 1002-1012.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Kropp S., Kern V., Lange K. i wsp.: Oxidative stress during treatment with first- and second-generation antipsychotics. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 2005; 17: 227-231.
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., Kontek B.: Lipid peroxidation in patients with schizophrenia. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2010; 64: 469-475.
22. Dietrich-Muszalska A., Rabe-Jabłońska J.: Porównanie wpływu działania leków przeciwpsychotycznych – I generacji (haloperidolu) i II generacji (klozapiny, olanzapiny i risperidonu) – na peroksydację lipidów osocza *in vitro*. *Psychiatr. Psychol. Klin.* 2007; 7: 210-218.
23. Dietrich-Muszalska A.: Wpływ działania haloperidolu na peroksydację lipidów w ludzkich płytkach krwi i osoczu w badaniach *in vitro*. *Psychiatr. Psychol. Klin.* 2004; 4: 150-156.
24. Perrault G., Depoortere R., Morel E. i wsp.: Psychopharmacological profile of amisulpride: an antipsychotic drug with presynaptic D₂/D₃ dopamine receptor antagonist activity and limbic selectivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997; 280: 73-82.
25. Schwartz J.C., Levesque D., Martres M.P., Sokoloff P.: Dopamine D₃ receptor: basic and clinical aspects. *Clin. Neuropharmacol.* 1993; 16: 295-314.
26. Schoemaker H., Claustre Y., Fage D. i wsp.: Neurochemical characteristics of amisulpride, an atypical dopamine D₂/D₃ receptor antagonist with both presynaptic and limbic selectivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997; 280: 83-97.
27. Bressan R.A., Erlandsson K., Jones H.M. i wsp.: Is regionally selective D₂/D₃ dopamine occupancy sufficient for atypical antipsychotic effect? An *in vivo* quantitative [¹²³I]epidepride SPET study of amisulpride-treated patients. *Am. J. Psychiatry* 2003; 160: 1413-1420.
28. Martinot J.L., Paillère-Martinot M., Poirier M.F. i wsp.: *In vivo* characteristics of dopamine D₂ receptor occupancy by amisulpride in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl.)* 1996; 124: 154-158.
29. Müller M.J., Regenbogen B., Härtter S. i wsp.: Therapeutic drug monitoring for optimizing amisulpride therapy in patients with schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 2007; 41: 673-679.
30. Mauri M.C., Volonteri L.S., Colasanti A. i wsp.: Clinical pharmacokinetics of atypical antipsychotics: a critical review of the relationship between plasma concentrations and clinical response. *Clin. Pharmacokinet.* 2007; 46: 359-388.
31. Bergemann N., Kopitz J., Kress K.R., Frick A.: Plasma amisulpride levels in schizophrenia or schizoaffective disorder. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2004; 14: 245-250.
32. Schatzberg A.F., Nemeroff C.B. (red.): *The American Psychiatric Publishing Textbook of Psychopharmacology*. Wyd. 3, American Psychiatric Publishing, Inc., Arlington 2004.
33. Heykants J., Huang M.L., Mannens G. i wsp.: The pharmacokinetics of risperidone in humans: a summary. *J. Clin. Psychiatry* 1994; 55 suppl.: 13-17.
34. Eerdeken M., van Hove I., Remmerie B., Mannaert E.: Pharmacokinetics and tolerability of long-acting risperidone in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2004; 70: 91-100.
35. Spina E., Avenoso A., Facciola G. i wsp.: Relationship between plasma risperidone and 9-hydroxyrisperidone concentrations and clinical response in patients with schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl.)* 2001; 153: 238-243.
36. 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.
37. Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R.: *Techniques in Free Radical Research*. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo 1991.
38. Karatas F., Karatepe M., Baysar A.: Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 2002; 311: 76-79.
39. 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.
40. 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.
41. Jacobsen J.P., Rodriguiz R.M., Mørk A., Wetsel W.C.: Monoaminergic dysregulation in glutathione-deficient mice: possible relevance to schizophrenia? *Neuroscience* 2005; 132: 1055-1072.
42. Zhang X.Y., Zhou D.F., Cao L.Y. i wsp.: Elevated blood superoxide dismutase in neuroleptic-free schizophrenia: association with positive symptoms. *Psychiatry Res.* 2003; 117: 85-88.
43. Dakhale G., Khanzode S., Khanzode S. i wsp.: Oxidative damage and schizophrenia: the potential benefit by atypical antipsychotics. *Neuropsychobiology* 2004; 49: 205-209.
44. Pillai A., Parikh V., Terry A.V. Jr, Mahadik S.P.: Long-term antipsychotic treatments and crossover studies in rats: differential effects of typical and atypical agents on the expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J. Psychiatr. Res.* 2007; 41: 372-386.