

# ARTYKUŁ REDAKCYJNY

## EDITORIAL

Anna Dietrich-Muszalska<sup>1</sup>, Justyna Kopka<sup>1</sup>, Paweł Kropiwnicki<sup>2</sup>,  
Bogdan Kontek<sup>3</sup>, Jolanta Rabe-Jabłońska<sup>4</sup>

## Wpływ kwetiapiny na stężenie wolnych tioli i związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym w osoczu, *in vitro*

The effect of quetiapine on the *in vitro* serum concentration of free thiols and thiobarbituric acid-reacting substances

<sup>1</sup> Zakład Psychiatrii Biologicznej, Katedra Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>2</sup> Klinika Psychiatrii Młodzieżowej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>3</sup> Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki

<sup>4</sup> Klinika Zaburzeń Afektywnych i Psychotycznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Correspondence to: Dr hab. n. med. Anna Dietrich-Muszalska – kierownik Zakładu Psychiatrii Biologicznej Katedry Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź, tel.: 42 272 56 59, faks: 42 272 56 52, e-mail: tzn\_lodz@post.pl

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki, decyzja nr 2011/01/B/NZ4/04903

(badania realizowane w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi)

The project has been financed by the means of the National Centre of Science, dec. No. 2011/01/B/NZ4/04903

### Streszczenie

Kwetiapina, lek przeciwpsychotyczny drugiej generacji, nie wywiera istotnego wpływu na występowanie późnej dyskinesy oraz innych zaburzeń ruchowych (*movement disorders*), w których etiopatogenezę mogą być zaangażowane zaburzenia równowagi pro- i antyoksydacyjnej. Mechanizm działania kwetiapiny na biomarkery stresu oksydacyjnego, a tym samym na redoks, nie jest znany. **Celem badania** było ustalenie wpływu kwetiapiny, w dawkach rekomendowanych do leczenia ostrego epizodu schizofrenii, na peroksydację lipidów mierzoną za pomocą oznaczenia stężenia związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) oraz na wolne tiole w ludzkim osoczu, w modelu *in vitro*. **Material i metody:** Krew do badań pobrano od 10 zdrowych ochotników – kobiet i mężczyzn w wieku 24–26 lat (średnio 25 lat, *SD* = 0,6 roku) – na roztwór ACD. Substancję aktywną kwetiapiny rozpuszczono w 0,01% dimetylosulfotlenku do stężenia końcowego 400 ng/ml i inkubowano z osoczem przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Do każdego doświadczenia wykonano próby kontrolne (bez leku). Oznaczenia poziomu wolnych tioli przeprowadzono metodą Ellmana, a stężenia TBARS – metodą spektrofotometryczną opisaną przez Rice'a-Evansa. Do analizy wyników zastosowano sparowany test *t*-Studenta (StatSoft Inc., Statistica v. 6.0). **Wyniki:** Stwierdzono, że kwetiapina w stężeniu 400 ng/ml w porównaniu z próbami kontrolnymi powoduje istotny statystycznie spadek stężenia TBARS o 22% ( $p < 0,04$ ) oraz wywiera istotny wpływ na wzrost stężenia wolnych tioli ( $p < 0,002$ ). **Wniosek:** Kwetiapina w stężeniu 400 ng/ml wykazuje działanie antyoksydacyjne, powodując wzrost stężenia wolnych tioli w osoczu i zmniejszenie peroksydacji lipidów osocza.

Słowa kluczowe: leki przeciwpsychotyczne, kwetiapina, tiole, peroksydacja lipidów, stres oksydacyjny

### Summary

Quetiapine, a second generation antipsychotic, has no significant effect on the occurrence of tardive dyskinesia or other motoric disorders whose aetiology may be related to a pro- and antioxidative imbalance. The mechanism of quetiapine effect on the oxidative stress biomarkers remains unknown. **The aim of the study** was to establish

the effect of quetiapine, administered in doses recommended in the treatment of acute phase of schizophrenia, on lipid peroxidation measured by levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and on free thiols in human plasma *in vitro*. **Material and methods:** Blood samples were obtained from 10 healthy volunteers – males and females aged 24–26 (mean 25, *SD* = 0.6) and placed in the ACD solution. Quetiapine was dissolved in a 0.01% solution of dimethylsulfoxide to reach the final concentration of 400 ng/ml and incubated with plasma for 24 h at 37°C. For each experiment a control test (without drug) has been done. Thiol levels were evaluated by the Ellmann method and the TBARS concentrations by the spectrophotometric Rice-Evans method. For statistical analysis we used the *t*-test (Statistica 6.0, StatSoft, Inc.). **Results:** Quetiapine at 400 ng/ml shows antioxidative properties causing an increase of plasma free thiol level and decrease of plasma lipid peroxidation.

Key words: antipsychotics, quetiapine, thiols, lipid peroxidation, oxidative stress

## WSTĘP

U chorych na schizofrenię występuje podwyższone stężenie produktów peroksydacji lipidów w osoczu<sup>(1,2)</sup>, krwinkach czerwonych<sup>(3)</sup>, płytkach krwi<sup>(4)</sup> i płynie mózgowo-rdzeniowym<sup>(5)</sup>. W badaniach na zwierzętach stwierdzono, że leczenie lekami przeciwpsychotycznymi, przede wszystkim pierwszej generacji (LPIG), powoduje wzrost wytwarzania wolnych rodników poprzez blokowanie receptorów dopaminowych, wzrost obrotu oraz metabolizmu dopaminy, wzrost poziomu peroksydacji lipidów błony oraz zmianę poziomu enzymów antyoksydacyjnych w mózgu<sup>(6,7)</sup>. Niektórzy autorzy stwierdzili, że zwiększenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych jest mechanizmem kompensacyjnym w odpowiedzi na zwiększony stres oksydacyjny powstający w obecności leków przeciwpsychotycznych<sup>(8)</sup>. Parikh i wsp.<sup>(7)</sup> stwierdzili, że przewlekłe leczenie haloperidolem (LPIG) powoduje istotny spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy (CAT), z jednoczesnym znaczącym wzrostem stężenia hydroksyalkenów (HAEs) – markera peroksydacji lipidów. Jednak leczenie lekami przeciwpsychotycznymi drugiej generacji (LPIIG) – risperidonem, klozapiną i olanzapiną – nie wpływa na zmianę aktywności enzymów antyoksydacyjnych i stężenia HAEs<sup>(7)</sup>. Podobnie Kropp i wsp.<sup>(9)</sup> nie stwierdzili w czasie 3-tygodniowego leczenia kwetiapiną, klozapiną, risperidonem lub amisulpridem wzrostu peroksydacji lipidów w odniesieniu do wartości wyjściowych, to jest przed włączeniem wymienionych leków. Wyniki tych badań wskazują, że leczenie haloperidolem, w porównaniu z wymienionymi LPIIG, indukuje stres oksydacyjny, powodując peroksydację lipidów i spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych<sup>(6,8,10)</sup>. Stwierdzono jednak, że nie wszystkie LPIIG wykazują korzystne działanie zmniejszające peroksydację lipidów. Dietrich-Muszalska i wsp.<sup>(10,11)</sup> wykazali, że ziprazidon podobnie jak haloperidol (LPIG) zwiększa *in vitro* peroksydację lipidów osocza.

W kilku badaniach u chorych na schizofrenię udowodniono wpływ leków przeciwpsychotycznych zarówno na peroksydację lipidów osocza, jak i enzymy antyoksydacyjne. Jednakże prawdziwa zmiana aktywności enzymów antyoksydacyjnych, jak również stężenia markerów

## INTRODUCTION

In schizophrenic patients the elevated levels of lipid peroxidation products was found in plasma<sup>(1,2)</sup>, red blood cells<sup>(3)</sup>, platelets<sup>(4)</sup> and the cerebrospinal fluid<sup>(5)</sup>. Studies on animals showed that treatment with antipsychotics, especially that of first generation (FGA), caused an increase of free radicals by blocking dopamine receptors, increase of dopamine turnover and metabolism, increase of membrane lipid peroxidation and antioxidative enzyme levels in the brain<sup>(6,7)</sup>. Some authors have shown that the increase of antioxidative enzymes activity was a compensation mechanism for the increased oxidative stress caused by antipsychotics<sup>(8)</sup>. Parikh *et al.*<sup>(7)</sup> have proven that long-term haloperidol treatment (FGA) caused a significant decrease in activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) with a concomitant significant increase of hydroxyalkenes (HAE) concentration, a marker of lipid peroxidation. However, treatment with second generation antipsychotics (SGA) – risperidone, clozapine and olanzapine effects neither antioxidative enzymes activity nor HAE concentration<sup>(7)</sup>. Similarly, Kropp *et al.*<sup>(9)</sup> have not noticed any increase of lipid peroxidation during a 3-week treatment with quetiapine, clozapine, risperidone and amisulpride. These results showed that haloperidol, as opposed to the mentioned SGAs, induced oxidative stress and decrease of antioxidative enzymes activity<sup>(6,8,10)</sup>. Not all SGAs, however, have a positive effect of decreased lipid peroxidation. In our previous works<sup>(10,11)</sup> we have shown that ziprasidone, just like haloperidol (FGA), increased plasma lipid peroxidation *in vitro*.

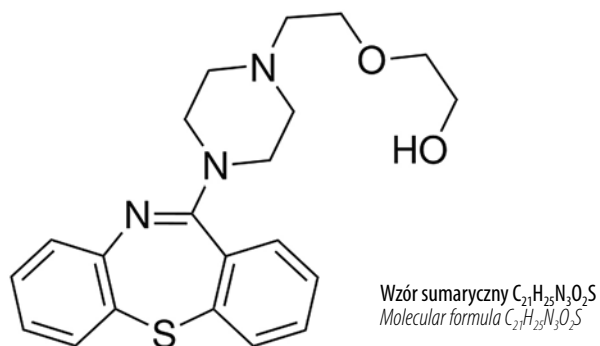
Few studies proved the effect of antipsychotics in schizophrenic patients on both plasma lipid peroxidation and antioxidation enzymes. However, the actual change of antioxidative enzymes activity and lipid peroxidation markers, induced by FGAs and SGAs, becomes unknown. The effect of quetiapine on various pro- and antioxidative markers has also not been fully established yet.

Quetiapine [2-(2-(4-dibenzo[b,f][1,4]thiazepine-11-yl-1-piperazinyle)etoxy)ethanol], an SGA, is a dibenzothiazepine derivative, structurally akin to dibenzazepine, in which a single nitrogen atom has been replaced with an atom of sulfur<sup>(12)</sup>.

peroksydacji lipidów, indukowana przez różne LPIG lub LPIIG, jest wciąż nieznaną. Nie jest też dostatecznie poznane działanie kwetiapiny na różne markery zaangażowane w procesy pro- i antyoksydacyjne.

Kwetiapina [2-(2-(4-dibenzo[b,f][1,4]tiazepina-11-yl-1-piperazynyl)etoksy)etanol], zaliczana do LPIIG, jest pochodną dibenzotiazepiny, strukturalnie zbliżoną do dibenzozepiny, w której jeden atom azotu został zastąpiony atomem siarki<sup>(12)</sup>.

Kwetiapina jest selektywnym monoaminergicznym antagonistą o wysokim powinowactwie do receptorów serotoninowych typu 2. (5HT<sub>2</sub>) i dopaminowych typu 2. (D<sub>2</sub>). Wykazuje działanie antagonistyczne do receptorów serotoninowych 5-HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>1D</sub> oraz 5HT<sub>2A</sub>, 5HT<sub>2C</sub>, a także dopaminowych D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub>, histaminowych H<sub>1</sub> i α-adrenergicznych (α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub>)<sup>(12)</sup>. Podobnie jak klozapina, kwetiapina wykazuje wyższe powinowactwo do receptorów 5-HT<sub>2</sub> niż do receptorów D<sub>2</sub>. Mechanizm działania kwetiapiny nie jest dostatecznie wyjaśniony. Wiadomo jednak, że jej działanie terapeutyczne w schizofrenii jest mediowane poprzez antagonistyczne działanie zarówno na receptory dopaminowe D<sub>2</sub>, jak i serotoninowe 5HT<sub>2</sub>. Kwetiapina, wykazując właściwości przeciwpsychotyczne, ma również potencjalnie korzystny wpływ na objawy depresyjne, dlatego jest zalecana do leczenia zarówno chorych na schizofrenię, jak i pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową<sup>(12,13)</sup>. Stosowanie kwetiapiny wiąże się z niskim ryzykiem wystąpienia późnej dyskinezy czy objawów pozapiramidowych, a także deficytów poznawczych<sup>(14,15)</sup>. Okres półtrwania kwetiapiny w osoczu wynosi około 7 godzin, a jej maksymalne stężenie w osoczu jest osiągane po podaniu *per os* po 1–2 godzinach. Podawanie w czasie posiłku nie wpływa w istotny sposób na jej biodostępność<sup>(12)</sup>. Kwetiapina w około 83% wiąże się z białkami osocza. Kwetiapina i jej główny metabolit – norkwetiapina wykazują kinetykę liniową w zakresie dawek terapeutycznych 50–800 mg/dobę<sup>(12)</sup>. Po podaniu doustnym dobrze się wchłania i jest w znacznym stopniu metabolizowana w wątrobie. Kwetiapina jest metabolizowana do sulfotlenku, 7-hydroksy, *N*-dealkyl, *O*-dealkyl, i metabolitów 7-hydroksy-*N*-dealkyl przez cytochrom P450 (CYP) 3A4 i CYP3A5 z niewielkim udziałem CYP2D6<sup>(12)</sup>. Metabolity 7-hydroksy- i 7-hydroksy-*N*-dealkyl- są aktywne farmakologicznie i gromadzą się w osoczu w stężeniu mniejszym niż 10% samej kwetiapiny. Okres półtrwania czynnego metabolitu norkwetiapiny wynosi około 12 godzin. Maksymalne stężenie molowe (w stanie stacjonarnym) norkwetiapiny stanowi 35% stężenia molowego kwetiapiny. Głównym izoenzymem odpowiedzialnym za metabolizm kwetiapiny, w którym pośredniczy układ enzymatyczny cytochromu P450 (CYP), jest CYP3A4. Stwierdzono, że kwetiapina i kilka jej metabolitów (w tym norkwetiapina) są słabymi inhibitorami aktywności izoenzymów 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 i 3A4 cytochromu P450 w warunkach *in vitro*. Hamowanie CYP w warunkach *in vitro* stwierdzano u ludzi tylko przy stężeniach 5–50 razy większych niż stężenia obserwowane



Masa molowa 383,51 g/mol  
Gram-atomic weight 383.51 g/mol

Rys. 1. Kwetiapina – wzór chemiczny i sumaryczny oraz masa molowa

Fig. 1. Quetiapine – chemical and molecular formula

Quetiapine is a selective monoaminergic antagonist with strong affinity to serotonin type 2 (5HT<sub>2</sub>) and dopamine type 2 (D<sub>2</sub>) receptors. It displays antagonistic effect on serotonin receptors: 5-HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>1D</sub>, 5HT<sub>2A</sub>, 5HT<sub>2C</sub>, and also on dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub>, histamine H<sub>1</sub> and α-adrenergic (α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub>) receptors<sup>(12)</sup>. Like clozapine, it has higher affinity to 5HT<sub>2</sub> than to D<sub>2</sub> receptors. Its mechanism of action is not fully clear. We know, however, that its therapeutic effect in schizophrenia is mediated by its antagonism to both D<sub>2</sub> and 5HT<sub>2</sub> receptors. Aside of its antipsychotic properties quetiapine has also positive influence on depressive symptoms, that is why it is also recommended for treatment of bipolar disorder<sup>(12,13)</sup>. Use of quetiapine is related with relatively low risk of tardive dyskinesia, acute extrapyramidal symptoms and cognitive deficits<sup>(14,15)</sup>. Half time of quetiapine in plasma is about 7 hours and it reaches maximum concentration after *per os* administration in 1–2 hours. Its bioavailability is not altered by food<sup>(12)</sup>. Quetiapine is bound with plasma proteins in about 83%. Quetiapine and its main metabolite – norkwetiapine show linear kinetics in the range of therapeutic doses between 50 and 800 mg/day<sup>(12)</sup>. After oral administration it absorbs well and is mainly metabolized in the liver. Quetiapine is metabolized to sulfoxide, 7-hydroxy, *N*-dealkyl, *O*-dealkyl, and metabolites 7-hydroxy-*N*-dealkyl by the P450 (CYP) cytochrome 3A4 and CYP3A5 with a minor contribution of CYP2D6<sup>(12)</sup>. Metabolites: 7-hydroxy- and 7-hydroxy-*N*-dealkyl- are pharmacologically active and are found in plasma at concentrations lower than 10% that of quetiapine. Half time of norkwetiapine is about 12 hours. Its maximum concentration (in a stationary state) reaches 35% of the molar concentration of quetiapine. Main isoenzyme responsible for the metabolism of quetiapine, mediated by CYP P450, is CYP3A4. It has been shown that quetiapine and some of its metabolites (including norkwetiapine) are weak inhibitors of cytochrome P450 isoenzymes 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A4 under *in vitro* conditions. Inhibiting effect on the CYP 450

w zakresie dawek 300–800 mg/dobę. Badania przesiewowe nie wykazały istotnych różnic w farmakokinetyce leku u palaczy tytoniu i u osób niepalących. Nie zaobserwowano istotnych klinicznie różnic w farmakokinetyce leku u pacjentów w różnym wieku i różnej płci<sup>(13)</sup>.

## CEL BADANIA

Celem badania jest porównanie wpływu kwetiapiny na poziom wolnych tioli i peroksydację lipidów ludzkiego osocza, mierzoną za pomocą oznaczenia stężenia związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w warunkach *in vitro*.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło osocze wyizolowane ze świeżej krwi pobranej na antykoagulant ACD (kwas cytrynowy/cytrynian sodu/dekstroza; 5:1 v/v). Krew pobrano od 10 zdrowych ochotników (studentów i pracowników 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<sup>(16)</sup>. 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, zdrowe (bez zaburzeń psychicznych i chorób somatycznych), niewykazujące cech zespołu metabolicznego (w tym zaburzeń gospodarki lipidowej i węglowodanowej), z prawidłową masą ciała (BMI w zakresie normy), stosujące dietę zrównoważoną, które nie suplementowały antyoksydantów pochodzenia roślinnego lub farmaceutycznego oraz preparatów zawierających wielonienasycone kwasy tłuszczowe, nigdy nie używały narkotyków, nie pały papierosów oraz nie piły alkoholu w czasie ostatnich 7 dni przed pobraniem krwi.

Przyjmując kryterium nieużywania żadnych leków w czasie ostatniej doby lub w czasie odpowiednio dłuższym, wykluczono możliwość występowania we krwi badanych ochotników leków i ich metabolitów.

Na badania wyraziła zgodę Komisja Etyczna Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – numer RNN/899/2000. Ochotnicy uzyskali informację na temat celu i metod badawczych oraz wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu.

### IZOLOWANIE OSOCZA I INKUBACJA OSOCZA Z LEKIEM

Pobraną krew ( $2 \times 10$  ml) wirowano w celu otrzymania osocza przez 20 minut w wirówce SIGMA 3K30 (2500 obr./min; temperatura 20°C). Do każdej próbki 0,5 ml osocza dodawano kolejno substancję czynną

*in vitro* in human plasma has been found only at concentrations exceeding by 5–50 times those observed when the medication was administered at doses between 300 and 800 mg/day. Screening studies did not reveal any significant differences in drug's pharmacokinetics between smokers and non-smokers, also no such differences were found with regard to sex and age<sup>(13)</sup>.

## AIM OF THE STUDY

The aim of the study was to compare the effect of quetiapine on the level of free thiols and human plasma lipid peroxidation measured by the level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) *in vitro*.

## MATERIAL AND METHODS

Plasma was isolated from fresh human blood and put in anticoagulant ACD (citric acid/sodium citrate/dextrose; 5:1 v/v). Blood samples were obtained from 10 healthy volunteers (students and employees of the Medical University of Lodz) aged 24–26 years (mean  $25 \pm 0.6$  year). Volunteers were screened for mental health disorders (using the MINI – Mini International Neuropsychiatric Interview<sup>(16)</sup>) and other medical conditions using questionnaires addressing their medical history, eating habits, medications taken, use of vegetal and synthetic antioxidants and psychoactive substances. General medical and neurological checkups were made along with basic lab tests. We qualified persons of Polish origin, healthy (somatically and psychiatrically), with no symptoms of metabolic syndrome (including lipid and carbohydrate imbalance), with normal body mass (normal BMI), on balanced diet, with no supplemented antioxidants (neither vegetal nor synthetic) or polyunsaturated fatty acids, who never used drugs or tobacco and have not drunk alcohol within 7 days from the test.

They also have not taken any medications for the period long enough to exclude the possibility of their or their metabolites' presence in their blood.

The Committee for Research on Human Subjects of the Medical University of Lodz gave their consent No. RNN/899/2000. Volunteers obtained comprehensive information on the purpose and methods of the study and gave their written consent to participate.

### PLASMA ISOLATION AND INCUBATION WITH QUETIAPINE

Blood samples ( $2 \times 10$  ml) was centrifuged for 20 minutes in the SIGMA 3K30 centrifuge at 2500 rpm and temp. 20°C. To each 0.5 ml plasma sample we added quetiapine dissolved in a 0.01% solution of dimethylsulfoxide (DMSO). Final concentrations of quetiapine were 175 ng/ml, 275 ng/ml and 400 ng/ml, corresponding to the drug concentration *in vivo* on antipsychotic treatment

badanych leków, rozpuszczoną w 0,01% dimetylosulfotlenku – DMSO. Zastosowano stężenia końcowe kwetiapiny 175 ng/ml, 275 ng/ml i 400 ng/ml, odpowiadające stabilnemu stężeniu leku, osiąganemu po wielokrotnym przyjęciu dawki stosowanej w leczeniu ostrego epizodu schizofrenii. Substancję czynną badanego leku (fumaran kwetiapiny) otrzymano z firmy Celon Pharma (Polska). Badane próby osocza z lekami rozpuszczonymi w DMSO inkubowano 24 godziny w temperaturze pokojowej. Do każdego doświadczenia wykonano próby kontrolne, które stanowiły osocze z DMSO, bez leku. W próbach badanego osocza i w próbach kontrolnych, po inkubacji z badanymi stężeniami kwetiapiny, oznaczono spektrofotometrycznie stężenie związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) metodą opisaną przez Rice'a-Evansa<sup>(17)</sup> oraz stężenie wolnych tioli metodą Ellmana<sup>(18)</sup>.

### **OZNACZANIE STĘŻENIA GRUP TIOLOWYCH W OSOCZU**

Całkowitą zawartość tioli (grup sulfhydrylowych -SH) w osoczu – inkubowanym przez 24 godziny z kwetiapiną i dla prób kontrolnych bez leku – oznaczono metodą Ellmana<sup>(18)</sup> z wykorzystaniem kwasu 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowego) (DTNB), z którym tiole reagują, co prowadzi do powstania barwnego dianionu kwasu 5-tio-2-nitrobenzoesowego (TNB) o maksymalnej absorpcji przy  $\lambda = 412$  nm. Stężenie tioli obliczono, stosując wartość molowego współczynnika absorpcji dla dianionu TNB ( $\epsilon = 13\ 600\ \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). Uzyskane wyniki przedstawiono jako stężenie tioli w przeliczeniu na miligram białka (nmol/mg). Stężenie białka w osoczu określono metodą Bradforda, a jako wzorzec wykorzystano roztwór albuminy wołowej<sup>(19)</sup>. Oznaczenia stężenia tioli wykonano w dwukrotnych powtórzeniach.

### **OZNACZANIE STĘŻENIA ZWIĄZKÓW REAGUJĄCYCH Z KWASEM TIOBARBITUROWYM (TBARS)**

Do 0,5 ml osocza kontrolnego (bez leku) i osocza badanego (próby z odpowiednimi stężeniami końcowymi kwetiapiny) 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 minut (2500 obr./min, wirówka SIGMA 3K30) w celu otrzymania klarownego supernatantu. Po ochłodzeniu prób absorpcję supernatantu oznaczano na spektrokolorymetrze SEMCO przy długości fali 535 nm w kuwecie o grubości warstwy 1 cm. Ilość TBARS obliczano na podstawie wartości absorpcji, korzystając z molowego współczynnika absorpcji ( $\epsilon = 1,56 \times 10^5\ \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). Oznaczenia stężenia TBARS wykonano w dwukrotnych powtórzeniach. Stężenie TBARS wyrażono w  $\mu\text{mol/l}$ .

of acute schizophrenic episode after multiple drug administration in stable dose. Active form of medication (quetiapine fumarate) was obtained from Celon Pharma (Poland). Studied plasma samples were incubated with drugs dissolved in DMSO for 24 hours at room temperature. With each experiment a control one was carried out with only plasma and DMSO, no drug added. In both control and study samples after incubation with studied concentrations of quetiapine, we spectrophotometrically assessed the concentrations of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) by the Rice-Evans method<sup>(17)</sup> and of free thiols by the Ellman method<sup>(18)</sup>.

### **ASSESSMENT OF FREE THIOL CONCENTRATION**

Total content of thiols (sulfhydryl groups -SH) in plasma – incubated for 24 hours with and without studied drug – was assessed by Ellmann method<sup>(18)</sup> using 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), which after reacting with thiols produces colour 5-tio-2-nitrobenzoic acid (TNB) di-anion of maximum absorbance at  $\lambda = 412$  nm. Thiol concentration was calculated using the molar absorbance coefficient for TNB di-anion ( $\epsilon = 13\ 600\ \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). Results were presented as thiol concentration per milligram of protein (nmol/mg). Protein plasma concentration was assessed by the Bradford method. Bovine plasma was used as reference<sup>(19)</sup>. Thiol concentration assessments were carried out in double trials.

### **ASSESSMENT OF THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES (TBARS) CONCENTRATION**

To 0.5 ml of control (without drug) and studied (with drug) plasma samples we added 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. Samples were mixed and heated in a boiling water bath for 10 minutes. Then plasma samples were centrifuged for 15 minutes at 2500 rpm in the SIGMA 3K30 centrifuge to obtain clear supernatant. After cooling of the supernatant the absorbance was measured using the SEMCO spectrophotometer at 535 nm in a sample cell of a 1 cm thick layer. TBARS concentration was calculated based upon absorbance value, using the molar absorbance coefficient ( $\epsilon = 1,56 \times 10^5\ \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). TBARS concentration assessment was carried out in double trials. TBARS concentration was put in  $\mu\text{mol/l}$ .

### **STATISTICAL ANALYSIS**

We analysed the results using Statistica 6.0 by StatSoft. We calculated mean values and standard error of mean (SEM) for both thiol and TBARS concentrations incubated with quetiapine compared to the control. The significance

## ANALIZA STATYSTYCZNA

Wyniki badań poddano analizie statystycznej: obliczono średnie arytmetyczne i błąd standardowy średniej (SEM). Istotność różnic między badanymi próbkami z inkubowanym lekiem i próbkami kontrolnymi, zarówno dla wartości stężenia tioli, jak i stężenia TBARS, obliczono za pomocą testu *t*-Studenta dla prób zależnych (test sparowany). Do badań wykorzystano pakiet StatSoft Inc., Statistica v. 6.0.

## WYNIKI

Kwetiapina w stężeniu końcowym 400 ng/ml, po 24-godzinnej inkubacji z osoczem, w porównaniu z próbkami kontrolnymi, spowodowała istotny statystycznie wzrost stężenia tioli oraz spadek stężenia TBARS (rys. 2, tabela 1).

Kwetiapina w stężeniu 400 ng/ml, po inkubacji z osoczem (24 h), w odniesieniu do prób kontrolnych, spowodowała znaczący spadek stężenia TBARS – o 22,2% ( $p < 0,04$ ) oraz wzrost stężenia wolnych tioli w osoczu o 9% ( $p < 0,002$ ) (tabela 1).

Wyniki tych badań wykazują, że kwetiapina w stężeniu 400 ng/ml, odpowiadającym dużym dawkom leku (~750–800 mg) stosowanym *per os* w leczeniu osób chorych na schizofrenię lub chorobę afektywną dwubiegunową (CHAD), wpływa istotnie na wzrost stężenia wolnych tioli w osoczu, jednocześnie zmniejszając peroksydację lipidów osocza oznaczaną za pomocą stężenia TBARS.

## OMÓWIENIE

Koncepcję zaburzeń fosfolipidów i patologii błon komórkowych w schizofrenii Horrobina<sup>(20)</sup> wspierają wyniki badań wykazujące, że zarówno w tkankach obwodowych, jak i w mózgu u osób z tą chorobą występują zaburzenia fosfolipidów błony komórkowej i mniejsze stężenie niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, a zwłaszcza kwasu arachidonowego i dokozaheksaenowego<sup>(21,22)</sup>. Obecnie uważa się, że u osób chorych na schizofrenię kilka mechanizmów może prowadzić do defektów fosfolipidów w błonie komórkowej, takich jak ich wzmożona degradacja, niskie stężenie (spożycie) niezbędnych kwasów tłuszczowych i ich zmniejszone włączanie do fosfolipidów oraz peroksydacja wywołana wolnymi rodnikami<sup>(21–23)</sup>. Opisywane zaburzenia fosfolipidów błony komórkowej w schizofrenii wydaje się potwierdzać występowanie u tych chorych wzrost markerów peroksydacji lipidów w osoczu, w tym nadtlenków lipidowych<sup>(11,23)</sup>. Sugerowano, że peroksydacja lipidów może być jednym z głównych mechanizmów obserwowanej redukcji niezbędnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w schizofrenii<sup>(24)</sup>.

Wpływ różnych LPP na peroksydację lipidów nie jest w pełni poznany. W kilku badaniach, prowadzonych na modelu zwierzęcym, stwierdzono, że LPIIG, takie jak risperidon, klozapina, olanzapina i kwetiapina, nie powodują zmian poziomu enzymów antyoksydacyjnych i peroksydacji

of differences for TBARS levels drug-treated samples vs. control was calculated using the paired Students *t*-test.

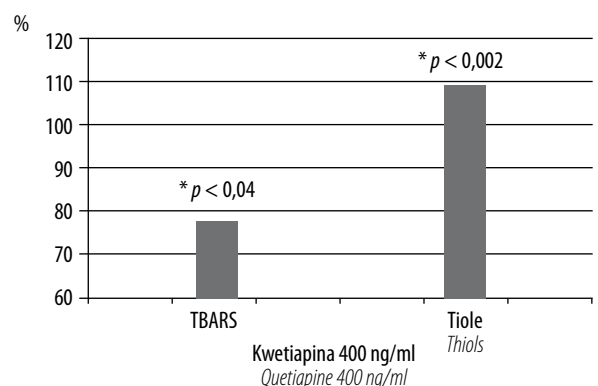
## RESULTS

Quetiapine at final concentration of 400 ng/mol after 24 hours incubation with plasma caused significant increase of thiol concentration (+9%,  $p < 0.002$ ) and decrease of TBARS concentration (-22%,  $p < 0.04$ ) compared to the control sample (fig. 2, table 1).

This proves that quetiapine at 400 ng/ml, which corresponds to high doses (~750–800 mg) used *per os* in treatment of schizophrenia or bipolar disorder, causes significant increase of free thiol plasma concentration and decreases plasma lipid peroxidation measured by the level of TBARS.

## DISCUSSION

Horrobin's concept of phospholipid imbalance and cellular membrane pathology in schizophrenia<sup>(20)</sup> is supported by studies showing imbalance of cell membrane phospholipids and lower concentration of necessary polyunsaturated fatty lipids, especially arachidonic and dokozaheksaenoic acids, both in peripheral tissues and the brain of schizophrenic patients<sup>(21,22)</sup>. Presently it is assumed that couple of mechanisms can be responsible for cell membrane phospholipid abnormalities, like their increased degradation, low intake (consumption) of necessary polyunsaturated fatty acids and their decreased incorporation in phospholipids and free-radical-mediated peroxidation<sup>(21–23)</sup>. The described disturbances of cell membrane in schizophrenic



Rys. 2. Wpływ kwetiapiny (400 ng/ml) na stężenie wolnych tioli i związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w osoczu ( $n = 10$ , dwukrotne powtórzenia). Czas inkubacji osocza z kwetiapią: 24 godziny. Wartości wyrażono w procentach w odniesieniu do kontroli (bez leku) przyjętej jako 100%

Fig. 2. Effect of quetiapine (400 ng/ml) on a concentration of free thiols and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in plasma ( $n = 10$ , repeating twice). Incubation time of plasma with quetiapine: 24 hours. Values are expressed as percentages in relation to the control (without drug) as 100%

| Stężenie kwetiapiny<br>Concentration of quetiapine | Marker  |                 | Kontrola (bez leku)<br>Control (without drug) | Kwetiapina (lek)<br>Quetiapine (drug) | p         |
|--|---|-----------------|---|---------------------------------------|-----------|
|  |   |                 | n = 10  | n = 10                                |           |
| 400 ng/ml  | Tiole [nmol/mg białka]<br>Thiols [nmol/mg of protein] | Średnia<br>Mean | 8,492   | 9,264                                 | p < 0,002 |
|  |   | SEM             | 0,357   | 0,341                                 |           |
|  | TBARS [μmol/l]  | Średnia<br>Mean | 2,44  | 1,89                                  | p < 0,04  |
|  |   | SEM             | 0,3   | 0,23                                  |           |

Tabela 1. Wpływ kwetiapiny (400 ng/ml) na stężenie tioli i TBARS w osoczu po 24-godzinnej inkubacji: średnie wartości bezwzględne  
Table 1. Effect of quetiapine (400 ng/ml) on a concentration of thiols and TBARS in plasma after 24-hour incubation: mean absolute values

lipidów (wzrostu TBARS lub hydroksyalkenów)<sup>(25)</sup>. Wskazywano też, że LPIIG – kwetiapina, klozapina i risperidon – chronią hodowane w kulturze komórki PC12<sup>(26, 27)</sup>. W naszych poprzednich badaniach wykazaliśmy właściwości antyoksydacyjne kwetiapiny (zmniejszenie poziomu TBARS przy zastosowaniu stężenia kwetiapiny w osoczu 175 ng/ml i 275 ng/ml)<sup>(28)</sup>. W obecnym badaniu potwierdziliśmy, że kwetiapina w stężeniu 400 ng/ml (odpowiadającym dużym dawkom leku rekomendowanym do leczenia ostrego epizodu schizofrenii i epizodu manii w CHAD) istotnie zmniejsza peroksydację lipidów osocza. Podobne protekcyjne właściwości kwetiapiny wykazali Xu i wsp. (2008)<sup>(26)</sup>, stwierdzając, że lek ten chroni hodowane komórki przed cytotoksycznością, związaną ze stresem oksydacyjnym, wywołaną β-amyloidem. Autorzy tego opracowania wykazali, że kwetiapina blokuje agregację β-amyloidu indukowaną przez rodnik hydroksylowy oraz zmiata rodnik hydroksylowy wytwarzany w reakcji Fentona. Wyniki tego doświadczenia wskazują na mechanizm działania antyoksydacyjnego kwetiapiny, który może być udziałem jej działania ochronnego w zaburzeniach psychicznych, szczególnie w tych, które są związane z występowaniem stresu oksydacyjnego. Mechanizm działania antyoksydacyjnego kwetiapiny może wyjaśniać wpływ tego leku na poprawę deficytów poznawczych u chorych na schizofrenię<sup>(29,30)</sup>.

U chorych na schizofrenię wykazano istotne zmniejszenie stężenia grup tiolowych w płytkach krwi oraz istotne zmniejszenie stężenia niskocząsteczkowych tioli w białkach osocza, takich jak glutation, cysteina czy cysteinylglycyna<sup>(31,32)</sup>. Zmniejszenie stężenia niskocząsteczkowych tioli u chorych na schizofrenię świadczy o istotnym zmniejszeniu obrony antyoksydacyjnej, w której GSH i tiole odgrywają ważną rolę. W piśmiennictwie nie ma badań, które rozstrzygałyby, jaki wpływ wywierają leki przeciwpsychotyczne (w tym kwetiapina) na stężenie grup -SH w osoczu. Huang i wsp.<sup>(33)</sup> stwierdzili, że u osób chorych na schizofrenię po 4 tygodniach leczenia risperidonem występuje istotny spadek stężenia wolnych tioli w osoczu, wskazując jednocześnie na możliwe czynniki zakłócające przeprowadzone badanie kliniczne, w tym możliwy wpływ innych otrzymywanych przez pacjentów leków. W naszym obecnym badaniu, przeprowadzonym w modelu *in vitro*, oceniliśmy stężenie tioli u osób zdrowych po inkubacji

patients seem to be supported by an increased plasma lipid peroxidation markers in these patients, including lipid peroxides<sup>(11,23)</sup>. It has been suggested that lipid peroxidation may be one of the main mechanisms of observed reduction of polyunsaturated fatty acids in schizophrenia<sup>(24)</sup>. The effect of various antipsychotics on lipid peroxidation is not fully known. In several studies on animal models it has been shown that SGA like risperidone, clozapine, olanzapine and quetiapine do not cause any changes in antioxidation enzymes and in lipid peroxidation (increase of TBARS or hydroxyalkenes)<sup>(25)</sup>. SGAs – quetiapine, clozapine and risperidone – protect the cultured PC12 cells<sup>(26,27)</sup>. In our previous studies we have confirmed the antioxidative properties of quetiapine (decrease of TBARS at 175 ng/ml and 275 ng/ml of plasma quetiapine)<sup>(28)</sup>. In our present study we have proven that quetiapine at 400 ng/ml (corresponding with high doses recommended for use in mania and acute episodes of schizophrenia) significantly reduces plasma lipid peroxidation. Similar antioxidative properties of quetiapine were shown by Xu *et al.* (2008)<sup>(26)</sup> who proved that quetiapine protects cultured cells from β-amyloid induced cytotoxicity mediated by oxidative stress. They observed that quetiapine blocked the aggregation of β-amyloid induced by hydroxyl radical and scavenged hydroxyl radical produced in the Fenton's reaction. Results of this experiment point at the antioxidative mechanism of quetiapine, which may be part of its protective action in mental disorders, especially those related with oxidative stress. It may explain the mechanism of quetiapine's benevolent effect on cognitive function improvement in schizophrenic patients<sup>(29,30)</sup>.

In these patients a significant decrease of platelet thiol groups and also significant decrease of low particle thiols in plasma protein (such as glutathione – GSH, cysteine or cysteinylglycine) were found<sup>(31,32)</sup>. Decrease of low particle thiols in schizophrenic patients denotes a significant decrease of antioxidation defence, in which both thiols and GSH play important role. There is no evidence in the literature on the effect of antipsychotics (including quetiapine) on plasma -SH group concentration.

According to Huang *et al.*<sup>(33)</sup> after 4 weeks of treatment with risperidone there is a significant decrease of plasma free thiol concentration in schizophrenic patients.

otrzymanego od nich osocza z kwetiapiną (400 ng/ml), wykazując istotne zwiększenie stężenia wolnych tioli pod wpływem działania tego leku. Podjęcie badań w układzie *in vitro* pozwoliło nam wykluczyć możliwy wpływ innych niż kwetiapina leków.

Ustalenie wpływu wywieranego przez leki przeciwpsychotyczne na stężenie tioli ma istotne znaczenie poznawcze i kliniczne z tego względu, że tiole są ważnym markerem obrony antyoksydacyjnej, odpowiadającym, między innymi, za utrzymanie właściwej struktury i funkcji białek, regulację aktywności enzymów oraz kontrolę aktywności czynników transkrypcyjnych, czyli tych procesów, które mogą uczestniczyć w patogenezie zaburzeń psychicznych, w tym schizofrenii.

## WNIOSEK

Kwetiapina w stężeniach rekomendowanych do leczenia ostrego epizodu schizofrenii wywiera w osoczu działanie antyoksydacyjne, powodując zarówno istotny spadek peroksydacji lipidów, jak i wzrost stężenia wolnych tioli.

## PIŚMIENNICTWO: BIBLIOGRAPHY:

1. Dietrich-Muszalska A., Kontek B.: Lipid peroxidation in patients with schizophrenia. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2010; 64: 469–475.
2. McCreddie R.G., MacDonald E., Wiles D. i wsp.: The Nithsdale Schizophrenia Surveys. XIV: Plasma lipid peroxide and serum vitamin E levels in patients with and without tardive dyskinesia, and in normal subjects. *Br. J. Psychiatry* 1995; 167: 610–617.
3. Reddy R.D., Yao J.K.: Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 1996; 55: 33–43.
4. Dietrich-Muszalska A., Olas B., Rabe-Jablonska J.: Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. *Platelets* 2005; 16: 386–391.
5. 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.
6. Sagara Y.: Induction of reactive oxygen species in neurons by haloperidol. *J. Neurochem.* 1998; 71: 1002–1012.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Dietrich-Muszalska A., Kopka J., Kwiatkowska A.: The effects of ziprasidone, clozapine and haloperidol on lipid peroxidation in human plasma (in vitro): comparison. *Neurochem. Res.* 2013; 38: 1490–1495.
11. Dietrich-Muszalska A., Kopka J., Kontek B., Kwiatkowska A.: Wpływ stężeń terapeutycznych zyprazydonu na poziom wolnych tioli i związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym w osoczu – badania *in vitro*. *Psychiatr. Psychol. Klin.* 2012; 12: 237–246.

The authors discuss possible interfering factors including other medications taken by studied patients. In our present study we have assessed the *in vitro* concentration of thiols in plasma samples incubated with quetiapine at 400 ng/ml, obtained from healthy individuals, which helped exclude the influence of other medications.

Establishing the effect of antipsychotics on thiol concentration has a significant cognitive and clinical value. Thiols are an important marker of antioxidation defence, responsible for keeping the structure of protein, enzymatic activity and transcription processes. All these may play an important role in the pathogenesis of schizophrenia.

## CONCLUSION

Quetiapine at concentrations corresponding to doses recommended for treatment of acute schizophrenic episodes has an antioxidative effect in plasma, causing both significant decrease of lipid peroxidation and increase of free thiol concentration.

12. Schatzberg A.F., Nemeroff C.B. (red.): *The American Psychiatric Publishing Textbook of Psychopharmacology*. Wyd. 3, American Psychiatric Publishing, Inc., Arlington 2004.
13. Arvanitis L.A., Rak I.W.: Efficacy, safety, and tolerability of Seroquel (quetiapine) in elderly subjects with psychotic disorders. Presented at a Meeting of the American Psychiatric Association, Toronto, Canada, 1998.
14. Keefe R.S.E., Sweeney J.A., Gu H. i wsp.: Effects of olanzapine, quetiapine, and risperidone on neurocognitive function in early psychosis: a randomized, double-blind 52-week comparison. *Am. J. Psychiatry* 2007; 164: 1061–1071.
15. Kivircik Akdede B.B., Alptekin K., Kitiş A. i wsp.: Effects of quetiapine on cognitive functions in schizophrenia. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2005; 29: 233–238.
16. 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.
17. Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R.: *Techniques in Free Radical Research*. Vol. 22 serii: Burdon R.H., van Knippenberg P.H. (red.): *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier, Amsterdam 1991: 51–100.
18. Ellman G., Lysko H.: A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal. Biochem.* 1979; 93: 98–102.
19. Bradford M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248–254.
20. Horrobin D.F.: Schizophrenia as a membrane lipid disorder which is expressed throughout the body. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 1996; 55: 3–7.
21. Ripova D., Strunecka A., Nemcova V., Farska I.: Phospholipids and calcium alterations in platelets of schizophrenic patients. *Physiol. Res.* 1997; 46: 59–68.
22. Ross B.M.: Phospholipid and eicosanoid signaling disturbances in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2003; 69: 407–412.
23. Yao J.K., Reddy R.D., van Kammen D.P.: Oxidative damage and schizophrenia: an overview of the evidence and its therapeutic implications. *CNS Drugs* 2001; 15: 287–310.



24. Fenton W.S., Hibbeln J., Knable M.: Essential fatty acids, lipid membrane abnormalities and the diagnosis and treatment of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 2000; 47: 8–21.
25. Pillai A., Parikh V., Terry A.V., 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.
26. Wang H., Xu H., Dyck L.E., Li X.M.: Olanzapine and quetiapine protect PC12 cells from  $\beta$ -amyloid peptide<sub>25–35</sub>-induced oxidative stress and the ensuing apoptosis. *J. Neurosci. Res.* 2005; 81: 572–580.
27. Xu H., Wang H., Zhuang L. i wsp.: Demonstration of an anti-oxidative stress mechanism of quetiapine: implications for the treatment of Alzheimer's disease. *FEBS J.* 2008; 275: 3718–3728.
28. Dietrich-Muszalska A., Kontek B., Rabe-Jabłońska J.: Quetiapine, olanzapine and haloperidol affect human plasma lipid peroxidation in vitro. *Neuropsychobiology* 2011; 63: 197–201.
29. Purdon S.E., Malla A., Labelle A., Lit W.: Neuropsychological change in patients with schizophrenia after treatment with quetiapine or haloperidol. *J. Psychiatry Neurosci.* 2001; 26: 137–149.
30. Riedel M., Muller N., Spellman I. i wsp.: Efficacy of olanzapine versus quetiapine on cognitive dysfunctions in patients with an acute episode of schizophrenia. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2007; 257: 402–412.
31. Dietrich-Muszalska A., Olas B.: Modifications of blood platelet proteins of patients with schizophrenia. *Platelets* 2009; 20: 90–96.
32. Dietrich-Muszalska A., Olas B., Głowacki R., Bald E.: Oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and thiols from patients with schizophrenia. *Neuropsychobiology* 2009; 59: 1–7.
33. Huang T.L., Liou C.W., Lin T.K.: Serum thiobarbituric acid-reactive substances and free thiol levels in schizophrenia patients: effects of antipsychotic drugs. *Psychiatry Res.*

## Szanowni Autorzy

Uprzejmie przypominamy, że zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dn. 6 października 2004 roku w sprawie sposobów dopełnienia obowiązku doskonalenia zawodowego lekarzy i lekarzy dentyków publikacja artykułu w czasopiśmie „**Psychiatria i Psychologia Kliniczna**” – indeksowanego w Index Copernicus – umożliwia doliczenie 20 punktów edukacyjnych za każdy artykuł do ewidencji doskonalenia zawodowego. Podstawą weryfikacji jest notka bibliograficzna z artykułu.