Anna Dietrich-Muszalska[1,2], Justyna Kopka[1], Bogdan Kontek[3], Anna Kwiatkowska[1]

Wpływ stężeń terapeutycznych zyprazydonu na poziom wolnych tioli i związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym w osoczu – badania *in vitro*

The effects of therapeutic concentrations of ziprasidone on free thiols and thiobarbituric acid reactive substances levels in human plasma – *in vitro* studies

[1] Pracownia Badań Biologicznych w Psychiatrii, I Katedra Psychiatrii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
[2] Klinika Zaburzeń Afektywnych i Psychotycznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
[3] Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki
Correspondence to: Dr hab. n. med. Anna Dietrich-Muszalska – kierownik Pracowni Badań Biologicznych w Psychiatrii I Katedry Psychiatrii 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
Podziękowania
Autorzy składają podziękowanie Prof. Pawłowi Nowakowi, Kierownikowi Katedry Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego, za możliwość przeprowadzenia badań laboratoryjnych.
Acknowledgements
The Authors are grateful to Prof. Paweł Nowak, head of the Department of General Biochemistry, University of Lodz, who allowed them to perform laboratory tests.
Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi, numer badań: 502-03/1-155-02/502-14-106, 502-03-1-155-02/502-14-109
The study was supported by internal grant of the Medical University of Lodz, Poland, No. 502-03/1-155-02/502-14-106 and 502-03-1-155-02/502-14-109

Streszczenie

Leki przeciwpsychotyczne pierwszej i drugiej generacji mogą wywierać przeciwstawne działanie na procesy redoks: pro- lub antyoksydacyjne. Ustalenie wpływu leków przeciwpsychotycznych na biomarkery stresu oksydacyjnego ma duże znaczenie kliniczne, ponieważ leki te są stosowane w zaburzeniach psychicznych, w których występuje stres oksydacyjny. Działanie zyprazydonu na procesy redoks nie jest dostatecznie poznane. Celem badania było ustalenie wpływu zyprazydonu w dawkach rekomendowanych do leczenia ostrego epizodu schizofrenii na wolne tiole w ludzkim osoczu oraz na związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w modelu *in vitro*. **Materiał i metody:** Krew do badań pobrano od 10 zdrowych ochotników płci męskiej (w wieku 24-26 lat) na roztwór ACD. Substancję aktywną zyprazydonu rozpuszczono w 0,01% dimetylosulfotlenku do stężeń końcowych (139 ng/ml i 250 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 związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym – metodą spektrofotometryczną (wg Rice'a-Evansa, 1991). Do analizy wyników zastosowano sparowany test t-Studenta (StatSoft Inc., Statistica v. 6.0). **Wyniki:** W odniesieniu do prób kontrolnych zyprazydon w stężeniu 139 ng/ml oraz 250 ng/ml po 24 godzinach inkubacji z osoczem spowodował nieistotny statystycznie wzrost poziomu wolnych tioli w osoczu ($p>0,05$) oraz w stężeniu 250 ng/ml wzrost stężenia TBARS o 27,6% ($p=3,9\times10^{-4}$). **Wniosek:** Zyprazydon w stężeniach odpowiadających dawkom rekomendowanym do leczenia ostrego epizodu schizofrenii nie powoduje istotnego wzrostu poziomu wolnych tioli w osoczu, jednocześnie istotnie zwiększając peroksydację lipidów osocza.

Słowa kluczowe: zyprazydon, leki przeciwpsychotyczne, wolne tiole, peroksydacja lipidów, schizofrenia

Summary

The first and second generation antipsychotics may induce opposing effects on redox. Establishing the effects of antipsychotics on oxidative stress biomarkers is very important in clinical respect, because these drugs are used for the treatment of mental disorders in which oxidative stress occurs. Effects of ziprasidone on redox processes are not sufficiently known as yet. The study was aimed at establishing the effects of ziprasidone in doses recommended for

treatment of acute episode of schizophrenia on human plasma free thiols and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in *in vitro* model. **Material and methods:** Blood for the study was collected from 10 healthy male volunteers (aged 24-26 years) for ACD solution. Active substance of ziprasidone was dissolved in 0.01% dimethyl sulfoxide to the final concentrations (139 ng/ml and 250 ng/ml) and incubated with plasma for 24 hours at 37°C. Control samples were performed for each experiment (without the drug). The free thiols level was measured using the Ellman method, whereas the levels of thiobarbituric acid-reactive substances by spectrophotometric method (acc. to Rice-Evans, 1991). The results were analysed using the paired Student t-test (StatSoft Inc., Statistica v. 6.0). **Results:** In relation to control samples, ziprasidone in concentrations 139 ng/ml and 250 ng/ml after 24 hours' incubation with plasma caused a statistically insignificant increase in the free thiols level in plasma ($p>0.05$), whereas in concentration 250 ng/ml – an increase in TBARS concentration by 27.6% ($p=3.9\times10^{-4}$). **Conclusions:** Ziprasidone in concentrations corresponding to doses used for treatment of acute episode of schizophrenia does not induce any significant increase in the free thiols level in plasma, simultaneously significantly increasing plasma lipid peroxidation.

Key words: ziprasidone, antipsychotics, free thiols, lipid peroxidation, schizophrenia

WSTĘP

U chorych na schizofrenię opisano różne zmiany biomarkerów świadczące o stresie oksydacyjnym – zarówno zwiększony poziom reaktywnych form tlenu (ROS), jak i obniżoną aktywność lub obniżone stężenie biomarkerów obrony antyoksydacyjnej. W badaniach własnych u chorych na schizofrenię wykazano ogólnoustrojowy stres oksydacyjny[1,2]. Z kolei w elementach morfotycznych krwi i w osoczu stwierdzono oksydacyjne uszkodzenia białek i lipidów[3,4], zaobserwowano także uszkodzenia oksydacyjne i nitracyjne w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz w badaniach autopsyjnych mózgu[5,6]. W naszych poprzednich badaniach stwierdziliśmy u chorych na schizofrenię zmniejszenie ilości niskocząsteczkowych tioli, takich jak glutation (GSH), cysteina (CSH), cysteinyloglicyna (CGSH), co świadczy o istotnym zmniejszeniu obrony antyoksydacyjnej, w której GSH i tiole odgrywają ważną rolę[4]. Wpływ leków przeciwpsychotycznych (LPP), zarówno pierwszej, jak i drugiej generacji, na redoks nie jest dostatecznie ustalony. Kilku autorów w badaniach prowadzonych na modelu zwierzęcym wykazało zwiększoną peroksydację lipidów błon komórkowych i indukowanie stresu oksydacyjnego w czasie podawania leków przeciwpsychotycznych, zwłaszcza pierwszej generacji[7-9]. Z kolei w innych badaniach prowadzonych w modelu *in vitro* na liniach komórkowych stwierdzono, że leki przeciwpsychotyczne drugiej generacji (LPIIG): klozapina, olanzapina, kwetiapina czy risperidon chronią komórki przed apoptozą spowodowaną stresem oksydacyjnym, wywołanym doświadczalnie przez różne czynniki[10-12]. W badaniach własnych prowadzonych w modelu *in vitro* na ludzkim osoczu pobranym od osób zdrowych nie odnotowano działania prooksydacyjnego olanzapiny i risperidonu, zaobserwowano także tendencję do spadku peroksydacji lipidów po 24-godzinnej inkubacji klozapiny i kwetiapiny w odniesieniu do prób kontrolnych – bez leku[1,13]. Wyniki prowadzonych badań wskazują na zróżnicowany wpływ leków przeciwpsychotycznych pierwszej

INTRODUCTION

In schizophrenic patients various modifications within biomarkers have been described, pointing to oxidative stress – both an increased level of reactive oxygen species (ROS) and a decreased concentration of antioxidative defence biomarkers. Our own studies on schizophrenic patients indicate a systemic oxidative stress[1,2]. On the other hand, in morphotic elements of blood and plasma the oxidative damage to proteins and lipids were found[3,4], besides oxidative and nitrative damage were found in cerebrospinal fluid and in the postmortem brain[5,6]. In our previous studies on schizophrenic patients we found a decrease in the amount of low-molecular thiols such as glutathione (GSH), cysteine (CSH) and cysteinylglycine (CGSH), which points to a significant decrease in antioxidative defence where GSH and thiols play an important role[4]. The effects of the first and second generation antipsychotics on redox have not been precisely established yet. In the studies carried out on animals, several authors indicated an increased peroxidation of cellular membrane lipids and induction of oxidative stress during the administration of antipsychotics, especially those of the first generation[7-9].

Instead, other studies conducted *in vitro* on cell lines indicate that the second generation antipsychotics (SGAs): clozapine, olanzapine, quetiapine or risperidone protect cells from apoptosis caused by oxidative stress induced experimentally by various factors[10-12].

Our own studies conducted *in vitro* on human plasma obtained from healthy subjects did not show pro-oxidative effects of olanzapine and risperidone, besides a tendency to a decrease in lipid peroxidation was observed after 24 hours' incubation of clozapine and quetiapine in relation to control samples – without the drug[1,13]. The results of the studies point to differentiated effects of the first and second generation antipsychotics on lipid peroxidation markers and activity of antioxidative enzymes in schizophrenic patients, probably resulting from complex mecha-

i drugiej generacji na markery peroksydacji lipidów i aktywność enzymów antyoksydacyjnych u chorych na schizofrenię, wynikający prawdopodobnie ze złożonych mechanizmów ich komórkowego i molekularnego działania. Ustalenie wpływu różnych LPP na procesy redoks ma istotne znaczenie kliniczne i poznawcze, ponieważ leki przeciwpsychotyczne są stosowane w leczeniu zaburzeń psychicznych, w których występuje stres oksydacyjny. Dotychczas zarówno w badaniach klinicznych, jak i przedklinicznych nie ustalono działania zyprazydonu na procesy redoks.

Zyprazydon (*ziprasidonum – 5-[2-(4-[1,2-benzisothiazol-3-yl]-1-piperazinyl)etyl]-6-chloro-1,3-dihydro-2H-indol-2-one*) to lek przeciwpsychotyczny drugiej generacji o działaniu antagonistycznym zarówno w stosunku do receptorów serotoninergicznych 2_A ($5HT_{2A}$), jak i receptorów dopaminergicznych typu 2 (D_2). Działa także na receptory serotoninergiczne $5HT_{2C}$, $5HT_{1D}$ i $5HT_{1A}$, przy czym jego powinowactwo do miejsc wiążących tych receptorów jest równe lub większe od powinowactwa do receptora typu D_2. Ponadto hamuje neuronalny wychwyt zwrotny noradrenaliny i serotoniny oraz wykazuje umiarkowane powinowactwo do receptorów histaminowych typu H_1 i receptorów typu $alfa_1$. Powinowactwo do receptorów muskarynowych typu M_1 w przypadku zyprazydonu nie ma istotnego znaczenia[14]. Zyprazydon wykazuje właściwości przeciwpsychotyczne, ma także potencjalnie korzystny wpływ na objawy afektywne, w tym występujące również w przebiegu schizofrenii. Stosowanie tego leku wiąże się z niskim ryzykiem wystąpienia późnej dyskinezy czy objawów pozapiramidowych, a także deficytów poznawczych czy nadmiernej sedacji lub uspokojenia[15,16]. Zyprazydon stosowany doustnie podlega przemianom metabolicznym i jest przekształcany w trzech szlakach metabolicznych do czterech głównych metabolitów występujących we krwi, takich jak sulfotlenek benzoizotiazolopiperazyny (BITP), sulfon BITP, sulfotlenek zyprazydonu i S-metylodihydrozyprazydon[17]. S-metylodihydrozyprazydon jest jedynym aktywnym metabolitem, z niższym powinowactwem do receptorów D_2 niż substancja czynna leku[17]. Badania *in vivo* wskazują, że konwersja do S-metylodihydrozyprazydonu jest główną drogą przemiany zyprazydonu. W surowicy niezmieniony zyprazydon stanowi około 44% całkowitej ilości związków pochodzących z substancji czynnej, wiąże się z białkami osocza w ponad 99%. Średni okres półtrwania leku po podaniu doustnym wynosi 6,6 godziny, a stałe stężenie osiągane jest zwykle w ciągu 1-3 dni. Biodostępność zyprazydonu może zwiększać się nawet o 100% w obecności pokarmu[14]. U pacjentów po posiłku zyprazydon wykazuje kinetykę liniową w zakresie dawek terapeutycznych 80-160 mg/dobę[18,19]. W badaniach Micelego i wsp. u zdrowych ochotników płci męskiej po wielokrotnym doustnym podaniu zyprazydonu (po posiłku) w dawkach terapeutycznych 40, 80 i 120 mg/dobę stężenie leku w osoczu wynosiło odpowiednio 44,6±48,1,

nisms of their cellular and molecular effects. Establishing the effects of various antipsychotics on redox processes is important in clinical and cognitive respect, because antipsychotics are used for the treatment of mental disorders where oxidative stress occurs. So far neither clinical nor preclinical studies established the effects of ziprasidone on redox processes.

Ziprasidone (*ziprasidonum* – 5-[2-(4-[1,2-benzisothiazol-3-yl]-1-piperazinyl)etyl]-6-chloro-1,3-dihydro-2H-indol-2-one) is the second generation antipsychotic exhibiting antagonistic effects both in relation to serotoninergic receptors 2_A ($5HT_{2A}$) and dopamine type 2 receptors (D_2). It also acts on serotoninergic receptors $5HT_{2C}$, $5HT_{1D}$ and $5HT_{1A}$, its affinity to those receptors binding sites being equal to or higher than the affinity to D_2 receptor. Besides it inhibits selective noradrenaline and serotonin reuptake and exhibits moderate affinity to histamine H_1 receptors and $alpha_1$ receptors. Affinity to muscarinic M_1 receptors in the case of ziprasidone is not the aim of our study[14]. Ziprasidone exhibits antipsychotic properties and has potentially advantageous impact on affective symptoms, including also those occurring in the course of schizophrenia. The use of this drug is also associated with a low risk of the occurrence of tardive dyskinesia or extrapyramidal symptoms as well as cognitive deficits or excessive sedation[15,16]. Orally administered ziprasidone is subject to metabolic modifications and is converted in three metabolic pathways to four main metabolites occurring in blood, i.e.: benzisothiazol-3-yl-piperazine (BITP), BITP-sulfone, ziprasidone sulfoxide and S-methyl-dihydro-ziprasidone[17]. S-methyl-dihydro-ziprasidone is the only active metabolite, with a lower affinity to receptors D_2 than the drug's active substance[17]. *In vivo* studies indicate that conversion to S-methyl-dihydro-ziprasidone is the main pathway to the conversion of ziprasidone. In serum the unchanged ziprasidone constitutes approx. 44% of the total amount of compounds derived from the active substance; it binds with plasma proteins in over 99%. The drug's mean half-life after oral administration reaches 6.6 hours, whereas the constant concentration is usually achieved within 1-3 days. Bioavailability of ziprasidone may be increased even by 100% in the presence of food[14]. In patients after the meal ziprasidone exhibits linear kinetics within therapeutic doses of 80-160 mg/24 hours[18,19]. In the studies carried out by Micele et al. in healthy male volunteers after multiple oral administration of ziprasidone (after a meal) in therapeutic doses of 40, 80 and 120 mg/24 hours the drug concentration in plasma reached respectively 44.6±48.1, 118.6±80.1 and 139.4±81.2 ng/ml[19]. Screening tests did not show any significant differences in the drug's pharmacokinetics between tobacco smokers and non-smokers. No clinically significant differences were observed in the drug's pharmacokinetics in patients of different age and different gender[14].

118,6±80,1 i 139,4±81,2 ng/ml[19]. 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[14].

CEL BADANIA

Celem badania jest porównanie wpływu zyprazydonu 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 świeże osocze wyizolowane z krwi pobranej na antykoagulant ACD (kwas cytrynowy/cytrynian sodu/dekstroza; 5:1 v/v). Krew pobrano od 10 zdrowych mężczyzn (studentów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi) w wieku 24-26 lat (średnio 25±0,6 roku). Do oceny stanu zdrowia psychicznego zastosowano M.I.N.I. – Mini-International Neuropsychiatric Interview[20]. 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 zaburzeń psychicznych i chorób somatycznych), niewykazujące cech zespołu metabolicznego (w tym zaburzeń gospodarki lipidowej i węglowodanowej), z prawidłowym BMI, stosujące dietę zrównoważoną, które nie suplementowały antyoksydantów pochodzenia roślinnego lub farmaceutycznego oraz preparatów zawierających wielonienasycone kwasy tłuszczowe, nigdy nie używały narkotyków, nie palą papierosów oraz nie piły alkoholu w czasie ostatnich kilku dni przed pobraniem krwi. Wykluczono możliwość występowania we krwi badanych ochotników leków lub ich metabolitów, przyjmując kryterium nieużywania żadnych leków, w tym również doraźnie, w czasie ostatniej doby lub w czasie odpowiednio dłuższym.
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 (2×9 ml) wirowano przez 20 minut przy 2500 obr./min w wirówce SIGMA 3K30, w temperaturze 20°C w celu otrzymania osocza. Do 0,5 ml osocza dodawano kolejno substancję czynną badanych leków,

AIM OF THE STUDY

The study is aimed at a comparison of the effects of ziprasidone on the level of free thiols and human plasma lipid peroxidation measured by thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) levels under *in vitro* conditions.

MATERIAL AND METHODS

The research material consisted of fresh blood plasma was obtained from blood samples mixed with anticoagulant ACD (citric acid/sodium citrate/dextrose; 5:1 v/v). Blood samples were obtained from 10 healthy male subjects (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[20]. They underwent internal, neurological examinations and laboratory tests, along with structured medical interviews concerning past diseases, dietary habits, used drugs, antioxidants of vegetable and pharmaceutical origin, and used psychoactive substances. The study involved people of Polish origin who lived in similar socioeconomic conditions, they were healthy (without mental disorders and somatic diseases), without features of metabolic syndrome (including disorders in lipid and carbohydrate metabolism), with normal BMI; they used a balanced diet and did not take any antioxidants of vegetable or pharmaceutical origin or preparations containing polyunsaturated fatty acids. They never used any narcotics, they do not smoke cigarettes and did not drink alcohol for the last few days before blood sampling. Any possible presence of drugs or their metabolites in the examined volunteers' blood was excluded, as it was assumed that no drugs would be used, not even temporarily, during the last 24 hours or a longer time.
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 they expressed their written consent for participation in it.

ISOLATION OF BLOOD PLASMA AND INCUBATION OF PLASMA WITH THE DRUG

The collected blood (2×9 ml) was centrifuged for 20 minutes at 20°C and 2500 rpm (SIGMA 3K30 centrifuge) to obtain plasma. Active substance of the tested drug, dissolved in 0.01% dimethyl sulfoxide – DMSO, was added consecutively to 0.5 ml of blood plasma. The final concentrations of ziprasidone – 139 ng/ml and 250 ng/ml were used for the study, corresponding to stable concentration of the drug achieved after multiple use of the dose used for the treatment of acute episode of schizophrenia. The active substance of the tested drug was supplied from Pfizer (USA). The tested samples of plasma with the drug dis-

rozpuszczoną w 0,01% dimetylosulfotlenku – DMSO. Do badań zastosowano stężenia końcowe zyprazydonu 139 ng/ml i 250 ng/ml, odpowiadające stabilnemu stężeniu leku, osiąganemu po wielokrotnym przyjęciu dawki stosowanej w leczeniu ostrego epizodu schizofrenii. Substancję czynną badanego leku otrzymano z firmy Pfizer (USA). Badane próby osocza z lekami rozpuszczonymi w DMSO inkubowano 24 godziny w temperaturze pokojowej. Do każdego doświadczenia wykonano próby kontrolne, które stanowiło osocze z DMSO, bez leku. W próbach badanego osocza i w próbach kontrolnych po inkubacji z badanymi stężeniami zyprazydonu oznaczono spektrofotometrycznie stężenie związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) metodą opisaną przez Rice'a-Evansa[21] oraz stężenie wolnych tioli metodą Ellmana[21,22].

OZNACZANIE STĘŻENIA GRUP TIOLOWYCH W OSOCZU

Całkowitą zawartość tioli (grup sulfhydrylowych -SH) w osoczu inkubowanym 24 godziny z zyprazydonem i dla prób kontrolnych bez leku oznaczono metodą Ellmana 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 absorbancji przy λ=412 nm[21]. Stężenie tioli obliczono, stosując wartość molowego współczynnika absorbancji dla dianionu TNB (ε=13 600 $M^{-1}\times cm^{-1}$). 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[23]. 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 zyprazydonu) 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 absorbancję supernatantu oznaczano na spektrokolorymetrze SEMCO przy długości fali 535 nm w kuwecie o grubości warstwy 1 cm. Ilość TBARS obliczano na podstawie wartości absorbancji, z wykorzystaniem molowego współczynnika absorbancji ($\varepsilon=1{,}56\times10^5$ $M^{-1}\times cm^{-1}$). Oznaczenia stężenia TBARS wykonano w dwukrotnych powtórzeniach. Stężenie TBARS wyrażono w μmol/l.

solved in DMSO were incubated for 24 hours at room temperature. For each experiment the control samples were made, consisting of plasma with DMSO (without the drug). The plasma samples and control samples after incubation with the ziprasidone concentrations were tested spectrophotometrically for the level of thiobarbituric acid-reactive substances, using the Rice-Evans method[21], whereas free thiols level was determined using the Ellman method[21,22].

EVALUATION OF THIOL GROUPS CONCENTRATION IN PLASMA

The total content of thiols (sulfhydryl groups -SH), in plasma samples incubated for 24 hours with ziprasidone and in control samples without the tested drug, were measured according to Ellman method, where reaction of 5.5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) with thiol groups leads to formation of coloured dianion of 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) with maximal absorbance at λ=412 nm[21]. The total thiols concentration was calculated based on the value of molar extinction coefficient for TNB dianion (ε=13 600 $M^{-1}\times cm^{-1}$). The obtained results were expressed as thiols concentration per milligram of protein (nmol/mg). The protein concentration in plasma was determined using Bradford method, and the bovine serum albumin solution was used as a standard[23]. The thiols concentration measurements were made in duplicate.

DETERMINATION OF THE LEVEL OF THIOBARBITURIC ACID-REACTIVE SUBSTANCES

The amount of 0.5 ml of control plasma (no drug) and the tested plasma (samples with appropriate final concentrations of ziprasidone) 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 for 15 minutes (2500 rpm, SIGMA 3K30 centrifuge) to obtain a transparent and clear supernatant. Light absorption of the supernatant was measured using 1 cm thick cuvette at λ=535 nm (SEMCO spectrophotometer). TBARS content was calculated basing on absorbance value, using the molar extinction coefficient ($\varepsilon=1.56\times10^5$ $M^{-1}\times cm^{-1}$). The measurements of TBARS level were made in duplicate. The TBARS level was expressed in μmol/l.

STATISTICAL ANALYSIS

The results obtained from the study were subjected to statistical analysis: arithmetic means and standard deviation of the mean (SEM) were calculated. The significance of differences between the tested samples with incubated

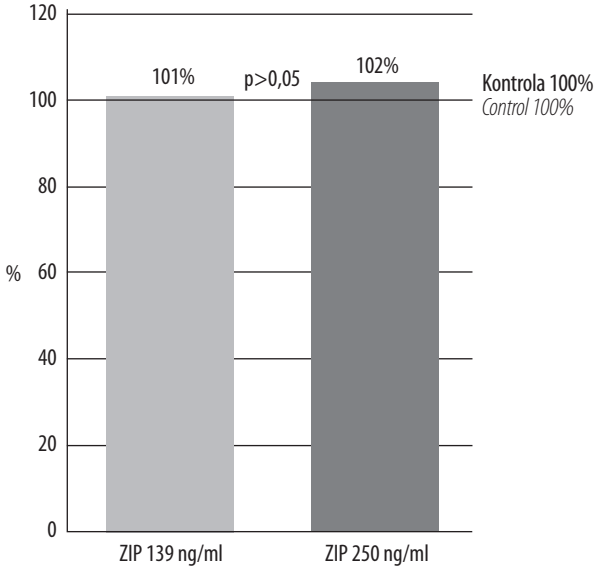
Stężenie zyprazydonu *Concentration of ziprasidone*	**Marker** *Marker*		**Kontrola (bez leku)** *Control (without drug)*	**Zyprazydon (lek)** *Ziprasidone (drug)*	**p**
			n=10	**n=10**	
139 ng/ml	Tiole [nmol/mg białka] *Thiols [nmol/mg of protein]*	Średnia *Mean value*	2,802	2,821	p>0,05
		SEM	0,101	0,095	
250 ng/ml	Tiole [nmol/mg białka] *Thiols [nmol/mg of protein]*	Średnia *Mean value*	2,802	2,850	p>0,05
		SEM	0,101	0,086	
	TBARS [µmol/l] *TBARS [µmol/l]*	Średnia *Mean value*	1,618	2,064	$p=3,9\times10^{-4}$
		SEM	0,056	0,110	
TBARS dla stężenia zyprazydonu 139 ng/ml p<0,001 (praca w druku). *TBARS for ziprasidone concentration 139 ng/ml p<0.001 (the study in print).*					

Tabela 1. Wpływ zyprazydonu (250 ng/ml) na stężenie wolnych tioli i związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w osoczu (n=10, dwukrotne powtórzenia). Czas inkubacji 24 godziny

Table 1. Effects of ziprasidone (250 ng/ml) on free thiols level and thiobarbituric acid- reactive substances (TBARS) in plasma (n=10, duplicate). Incubation time – 24 hours

ANALIZA STATYSTYCZNA

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



Rys. 1. Wzrost stężenia wolnych tioli w osoczu po 24-godzinnej inkubacji osocza z zyprazydonem (139 ng/ml, 250 ng/ml), wyrażony w % (kontrola = 100%)

Fig. 1. An increase in free thiols level in plasma after 24 hours' incubation of plasma with ziprasidone (139 ng/ml, 250 ng/ml), expressed in % (control = 100%)

drug and control samples both for the values of thiols concentration and TBARS concentration was determined using the paired Student t-test for dependent variables. Package StatSoft Inc., Statistica v. 6.0 for statistical analysis was used.

RESULTS

Ziprasidone after 24 hours' incubation with blood plasma, as compared to the control samples, caused a statistically insignificant increase in the level of thiols for the drug concentrations of both 139 ng/ml and 250 ng/ml (fig. 1, table 1). Ziprasidone in for the first time tested concentration of 250 ng/ml after incubation with plasma (24 hours), as compared to control groups, caused a significant increase in the level of TBARS – by 27.6% ($p=3.9\times10^{-4}$) (fig. 2), similarly as in the earlier tested concentration of 139 ng/ml (table 1, in print). The results of the study indicate that ziprasidone in concentrations 139 ng/ml and 250 ng/ml, corresponding to the drug doses 80-160 mg (used *per os*), does not significantly contribute to a change in the free thiols level in plasma, but causes a significant increase in the level of TBARS, showing its properties of increasing lipid peroxidation.

DISCUSSION

Current results of the studies do not allow to establish unambiguously the effects of antipsychotics on various oxidative stress biomarkers, including changes in the lipid peroxidation level and free thiols level in plasma.

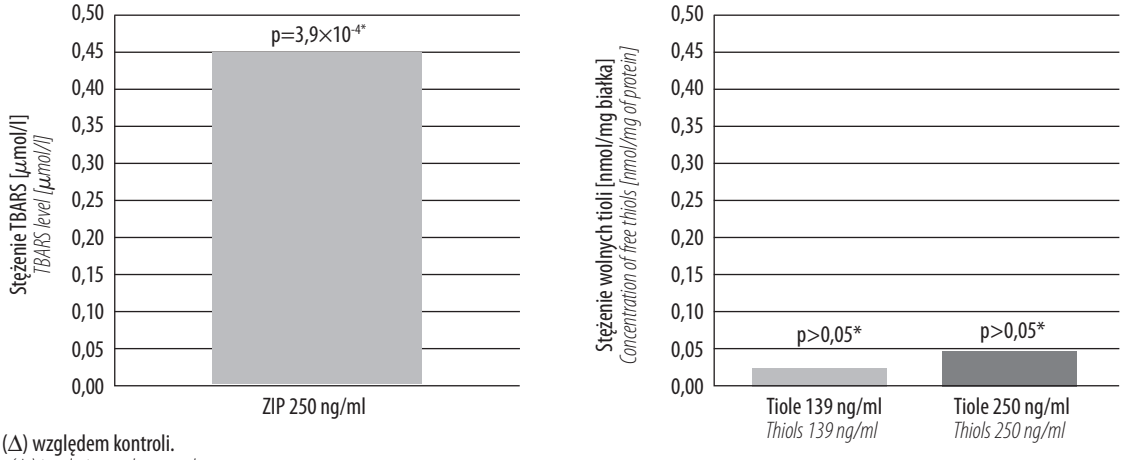
Our own study on schizophrenic patients showed an increase in the oxidative stress biomarkers concentration in plasma and a significant decrease in the level of thiol groups in platelets (by approx. 50% in relation to healthy subjects)[3,24]. At the same time a significant decrease was noted in the concentration of low-molecular thiols

WYNIKI

Zyprazydon po 24-godzinnej inkubacji z osoczem w porównaniu z próbami kontrolnymi spowodował nieistotny statystycznie wzrost stężenia tioli zarówno dla stężenia leku 139 ng/ml, jak i 250 ng/ml (rys. 1, tabela 1). Zyprazydon w badanym po raz pierwszy stężeniu 250 ng/ml po inkubacji z osoczem (24 h) w odniesieniu do prób kontrolnych spowodował znaczący wzrost stężenia TBARS – o 27,6% ($p= 3,9\times10^{-4}$) (rys. 2), podobnie jak w badanym wcześniej stężeniu 139 ng/ml (tabela 1, praca w druku). Wyniki badań wskazują, że zyprazydon w stężeniach 139 ng/ml oraz 250 ng/ml, odpowiadających dawkom leku 80-160 mg (stosowanym *per os*), nie wpływa istotnie na zmianę stężenia wolnych tioli w osoczu, natomiast powoduje istotny wzrost stężenia TBARS, wykazując właściwości zwiększające peroksydację lipidów.

OMÓWIENIE

Obecne wyniki badań nie pozwalają jednoznacznie ustalić wpływu leków przeciwpsychotycznych na różne biomarkery stresu oksydacyjnego, w tym zmiany poziomu peroksydacji lipidów oraz stężenie wolnych tioli w osoczu.
W badaniach własnych u chorych na schizofrenię stwierdzono wzrost stężenia biomarkerów stresu oksydacyjnego w osoczu oraz wykazano istotne zmniejszenie stężenia grup tiolowych w płytkach krwi (o około 50% w odniesieniu do osób zdrowych)[3,24]. Jednocześnie odnotowano istotne zmniejszenie stężenia niskocząsteczkowych tioli w białkach osocza, takich jak glutation (GSH), cysteina (CSH) czy cysteinyloglicyna (CGSH)[4]. Wynik ten jest zgodny ze stwierdzanymi, również przez innych autorów, niedoborami glutationu u chorych na schizofrenię i w konsekwencji podejmowaną u tych chorych suplementacją N-acetylocysteiną – prekursorem glutationu[25-28]. in plasma proteins, such as glutathione (GSH), cysteine (CSH) or cysteinylglycine (CGSH)[4]. This result conforms with glutathione deficits, found also by other authors, in schizophrenic patients and consequently undertaken supplementation with N-acetylcysteine – precursor of glutathione[25-28]. A decrease in low-molecular thiols in schizophrenic patients shows a significant decrease in oxidative defence, where GSH and thiols play an important role. Changes in the level of free thiols in plasma may result from S-thiolation of proteins which results from oxidative stress and constitutes an important antioxidative mechanism of protecting SH groups in protein molecules from irreversible oxidation. Recently, Huang et al. noticed in schizophrenic patients, after 4 weeks of treatment with risperidone, a significant decrease in the level of free thiols in plasma, but also noted the difficulties with conducting such studies *in vivo*, because of possible effects of the factors distorting the results[29]. In our *in vitro* study we demonstrated for the first time that ziprasidone in concentrations of 139 ng/ml and 250 ng/ml corresponding to the drug doses 80-160 mg (used *per os*) does not significantly affect the change in free thiols level in plasma, but affects lipid peroxidation measured by TBARS levels. Thiobarbituric acid-reactive substances are a well-known marker of lipid peroxidation playing a significant role in toxic effects of many chemical compounds[30]. Changes in the level of TBARS (or MDA) and antioxidative markers were described in studies on animal model among other in the case of the effects of such drugs as chlorpromazine, haloperidol, risperidone, olanzapine or clozapine[7-9,31-33]. Results of the studies carried out in schizophrenic patients indicate that antipsychotics affect the level of TBARS[1,3,34-38]. It was reported that the level of TBARS was higher in patients after the use of FGAs, but such changes were not observed in the patients treated with the SGAs[39]. In our earlier studies *in vitro* the SGAs (risperidone, olanzapine



* Różnica (Δ) względem kontroli.
** Difference (Δ) in relation to the control.*

Rys. 2. Porównanie stężenia TBARS oraz wolnych tioli w ludzkim osoczu po 24-godzinnej inkubacji z zyprazydonem
Fig. 2. Comparison of the levels of TBARS and free thiols in human plasma after 24 hours' incubation with ziprasidone

Zmniejszenie niskocząsteczkowych tioli u chorych na schizofrenię świadczy o istotnym obniżeniu obrony antyoksydacyjnej, w której GSH i tiole odgrywają ważną rolę. Zmiany stężenia wolnych tioli w osoczu mogą wynikać z S-tiolacji białek będącej następstwem stresu oksydacyjnego i stanowiącej ważny mechanizm antyoksydacyjny osłaniania grup SH w cząsteczkach białek przed nieodwracalnym utlenianiem. Ostatnio Huang i wsp. zauważyli, że po 4 tygodniach leczenia risperidonem u chorych na schizofrenię wystąpił istotny spadek stężenia wolnych tioli w osoczu, ale zwrócili też uwagę na trudności z prowadzeniem tego typu badań *in vivo* ze względu na możliwy wpływ czynników zakłócających wyniki[29]. W naszym badaniu *in vitro* po raz pierwszy wykazaliśmy, że zyprazydon w stężeniach 139 ng/ml oraz 250 ng/ml odpowiadających dawkom leku 80-160 mg (stosowanym *per os*) nie wpływa istotnie na zmianę stężenia wolnych tioli w osoczu, natomiast wywiera wpływ na peroksydację lipidów, mierzoną za pomocą oznaczenia stężenia TBARS. Związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym są znanym markerem peroksydacji lipidów, odgrywającej istotną rolę w toksycznym działaniu wielu związków chemicznych[30]. Opisywano zmiany stężenia TBARS (lub MDA) oraz markerów antyoksydacyjnych w badaniach na modelu zwierzęcym między innymi w przypadku działania takich leków, jak chlorpromazyna, haloperidol, risperidon, olanzapina czy klozapina[7-9,31-33]. Z wyników badań prowadzonych u chorych na schizofrenię wynika, iż leki przeciwpsychotyczne wpływają na stężenie TBARS[1,3,34-38]. Zauważono, że stężenie TBARS było wyższe u pacjentów po zastosowanym leczeniu LPIG, ale nie zaobserwowano takich zmian u chorych, którzy otrzymywali LPIIG[39]. W naszych wcześniejszych badaniach prowadzonych w modelu *in vitro* LPIIG (risperidon, olanzapina czy kwetiapina) w stężeniach odpowiadających dawkom rekomendowanym do leczenia ostrego epizodu schizofrenii nie powodowały istotnego wzrostu peroksydacji lipidów osocza w odniesieniu do prób kontrolnych – bez leku[1,13]. Natomiast stwierdziliśmy, podobnie jak autorzy prowadzący badania na modelu zwierzęcym[39], że haloperidol w doświadczeniach eksperymentalnych prowadzonych *in vitro* w ludzkim osoczu istotnie zwiększa peroksydację lipidów[13]. Z kolei Zhang i wsp. wykazali, że u chorych na schizofrenię po leczeniu klozapiną lub risperidonem nie występują znaczące różnice w stężeniu dialdehydu malonowego (MDA)[38]. Podobnie Kropp i wsp. zaobserwowali brak istotnego wzrostu stężenia TBARS po 3-tygodniowym leczeniu pacjentów chorych na schizofrenię takimi LPIIG, jak: amisulpryd, risperidon, olanzapina, kwetiapina i klozapina (średnie dawki dzienne wynosiły odpowiednio: 337 mg, 4,7 mg, 13,9 mg, 363,4 mg i 447,2 mg)[40]. Również w badaniach na zwierzętach Pillai i wsp. wykazali antyoksydacyjne działanie niektórych LPIIG, które zmniejszały peroksydację lipidów[9]. Jednak w obecnie omawianym badaniu zyprazydon – lek przeciwpsychotyczny drugiej generacji – w stężeniu 250 ng/ml po or quetiapine) in concentrations corresponding to doses recommended for treatment of acute episode of schizophrenia did not cause a significant increase in plasma lipid peroxidation in relation to control samples – without the drug[1,13]. Instead, we have found, similarly to the authors conducting the studies in animal model[39], that haloperidol in experimental studies *in vitro* in human plasma significantly increases lipid peroxidation[13]. On the other hand Zhang et al. indicated that schizophrenic patients after treatment with clozapine or risperidone did not exhibit any significant differences in the concentration of malonyldialdehyde (MDA)[38]. Similarly, Kropp et al. observed a lack of significant increase in the level of TBARS after 3-weeks treatment of schizophrenic patients with such SGAs as: amisulpride, risperidone, olanzapine, quetiapine and clozapine (the mean daily doses reached respectively: 337 mg, 4.7 mg, 13.9 mg, 363.4 mg and 447.2 mg)[40]. Also in studies on animals Pillai et al. demonstrated antioxidative effects of certain SGAs which decreased lipid peroxidation[9]. However, in the present study ziprasidone – the second generation antipsychotic – in concentration 250 ng/ml after 24 hours' incubation with plasma significantly increased lipid peroxidation. We obtained similar results, implying the drug's pro-oxidative effects, in an earlier experiment with ziprasidone concentration 139 ng/ml (the study in print). Our results of *in vitro* studies indicate that ziprasidone in concentrations corresponding to doses recommended for treatment of acute episode of schizophrenia, causes a significant increase in the level of TBARS – lipid peroxidation marker.

In the light of the findings showing that oxidative stress is involved in etiopathogenesis of schizophrenia, the study aimed at determination of antipsychotics effects on oxidative stress biomarkers are very important clinically, because antipsychotics in schizophrenic patients are used chronically, usually for many years, often in high doses, especially in recurrent acute episodes of the disease.

It seems that determination of the effects of various antipsychotics, both of the first and second generation, on oxidative stress occurring in the course of schizophrenia may improve the outcomes and contribute to searching for a therapy involving the complex aspects of pro- and antioxidative imbalance found in patients with schizophrenia.

CONCLUSIONS

Ziprasidone does not cause a significant increase in the level of thiols in human plasma, but it contributes to an increase in plasma lipid peroxidation, thereby exhibiting pro-oxidative effects.

24-godzinnej inkubacji z osoczem istotnie zwiększał peroksydację lipidów. Podobne wyniki wskazujące na działanie prooksydacyjne leku uzyskaliśmy we wcześniej wykonanym doświadczeniu ze stężeniem zyprazydonu 139 ng/ml (praca w druku). Nasze wyniki badań, prowadzone w układzie *in vitro*, wskazują, że zyprazydon w stężeniach odpowiadających dawkom rekomendowanym do leczenia ostrego epizodu schizofrenii powoduje istotny wzrost stężenia TBARS – markera peroksydacji lipidów.

W świetle ustaleń, że stres oksydacyjny jest zaangażowany w etiopatogenezę schizofrenii, badania zmierzające do określenia wpływu LPP na biomarkery stresu oksydacyjnego mają duże znaczenie kliniczne, gdyż LPP u chorych na schizofrenię stosowane są przewlekle, zazwyczaj przez wiele latach, często w znacznych dawkach, szczególnie w nawracających ostrych epizodach choroby.

Wydaje się, że ustalenie wpływu różnych leków przeciwpsychotycznych, zarówno pierwszej, jak i drugiej generacji, na stres oksydacyjny występujący w przebiegu schizofrenii może poprawić wyniki leczenia oraz przyczynić się do poszukiwania terapii uwzględniającej złożone aspekty zaburzeń równowagi pro- i antyoksydacyjnej stwierdzanych u chorych na schizofrenię.

WNIOSKI

Zyprazydon nie powoduje istotnego wzrostu stężenia tioli w ludzkim osoczu, natomiast przyczynia się do wzrostu peroksydacji lipidów osocza, tym samym wykazując działanie prooksydacyjne.

PIŚMIENNICTWO
BIBLIOGRAPHY:

1. Dietrich-Muszalska A., Kontek B.: Lipid peroxidation in patients with schizophrenia. Psychiatry Clin. Neurosci. 2010; 64: 469-475.
2. Dietrich-Muszalska A., Olas B.: Isoprostanes as indicators of oxidative stress in schizophrenia. World J. Biol. Psychiatry 2009; 10: 27-33.
3. Dietrich-Muszalska A., Olas B., Rabe-Jablonska J.: Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. Platelets 2005; 16: 386-391.
4. 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.
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. 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.
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. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Dietrich-Muszalska A., Kontek B., Rabe-Jabłońska J.: Quetiapine, olanzapine and haloperidol affect human plasma lipid peroxidation in vitro. Neuropsychobiology 2011; 63: 197-201.
14. Schatzberg A.F., Nemeroff C.B. (red.): The American Psychiatric Publishing Textbook of Psychopharmacology. Wyd. 3, American Psychiatric Publishing, Inc., Arlington 2004.
15. Stip E., Zhornitsky S., Moteshafi H. i wsp.: Ziprasidone for psychotic disorders: a meta-analysis and systematic review of the relationship between pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical profile. Clin. Ther. 2011; 33: 1853-1867.
16. Taylor D., Paton C., Kerwin R.: The Maudsley 2003 Prescribing Guidelines. Wyd. 7, Martin Dunitz, Taylor & Francis Group, London, New York 2003.
17. Prakash C., Kamel A., Gummerus J., Wilner K.: Metabolism and excretion of a new antipsychotic drug, ziprasidone, in humans. Drug Metab. Dispos. 1997; 25: 863-872.
18. 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.
19. Miceli J.J., Wilner K.D., Hansen R.A. i wsp.: Single- and multiple-dose pharmacokinetics of ziprasidone under non-fasting conditions in healthy male volunteers. Br. J. Clin. Pharmacol. 2000; 49 supl. 1: 5S-13S.
20. 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 supl. 20: 22-33.
21. 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.
22. Ellman G., Lysko H.: A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. Anal. Biochem. 1979; 93: 98-102.
23. 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.
24. Dietrich-Muszalska A., Olas B.: Modifications of blood platelet proteins of patients with schizophrenia. Platelets 2009; 20: 90-96.
25. Berk M., Copolov D., Dean O. i wsp.: N-acetyl cysteine as a glutathione precursor for schizophrenia – a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Biol. Psychiatry 2008; 64: 361-368.
26. Do K.Q., Trabesinger A.H., Kirsten-Krüger M. i wsp.: Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. Eur. J. Neurosci. 2000; 12: 3721-3728.
27. Dodd S., Dean O., Copolov D.L. i wsp.: N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. Expert Opin. Biol. Ther. 2008; 8: 1955-1962.
28. Grima G., Benz B., Parpura V. i wsp.: Dopamine-induced oxidative stress in neurons with glutathione deficit: implication for schizophrenia. Schizophr. Res. 2003; 62: 213-224.
29. 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. 2010; 177: 18-21.
30. Karatas F., Karatepe M., Baysar A.: Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. Anal. Biochem. 2002; 311: 76-79.
31. Bindoli A., Rigobello M.P., Cavallini L. i wsp.: Decrease of serum malondialdehyde in patients treated with chlorpromazine. Clin. Chim. Acta 1987; 169: 329-332.
32. Castagné V., Rougemont M., Cuenod M., Do K.Q.: Low brain glutathione and ascorbic acid associated with dopamine uptake inhibition during rat's development induce long-term cognitive deficit: relevance to schizophrenia. Neurobiol. Dis. 2004; 15: 93-105.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Medina-Hernández V., Ramos-Loyo J., Luquin S. i wsp.: Increased lipid peroxidation and neuron specific enolase in treatment refractory schizophrenics. J. Psychiatr. Res. 2007; 41: 652-658.
38. 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.
39. Sagara Y.: Induction of reactive oxygen species in neurons by haloperidol. J. Neurochem. 1998; 71: 1002-1012.
40. 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.

Zasady prenumeraty kwartalnika „Psychiatria i Psychologia Kliniczna"

1. Prenumeratę można rozpocząć od dowolnego numeru pisma. Prenumerujący otrzyma zamówione numery kwartalnika pocztą na podany adres.
2. Pojedynczy egzemplarz kwartalnika kosztuje 25 zł. Przy zamówieniu rocznej prenumeraty (4 kolejne numery) koszt całorocznej prenumeraty wynosi 80 zł.
3. Istnieje możliwość zamówienia numerów archiwalnych (do wyczerpania nakładu). Cena numeru archiwalnego – 25 zł.
4. Zamówienie można złożyć:
   - Wypełniając załączony blankiet i dokonując wpłaty w banku lub na poczcie. Prosimy o podanie dokładnych danych imiennych i adresowych.
   - Dokonując przelewu z własnego konta bankowego (ROR) – wpłaty należy kierować na konto:
     Medical Communications Sp. z o.o., ul. Powsińska 34, 02-903 Warszawa
     Deutsche Bank PBC SA
     42 1910 1048 2215 9954 5473 0001
   - Drogą mailową: redakcja@psychiatria.com.pl.
   - Telefonicznie lub faksem: tel.: 22 651 97 83, faks: 22 842 53 63.
   - Wypełniając formularz prenumeraty zamieszczony na stronie:
     www.gazeta.psychiatria.com.pl/index.php/prenumerata-wersji-drukowanej
5. Zamawiający, którzy chcą otrzymać fakturę VAT, proszeni są o kontakt z redakcją.