

Porównanie działania klozapiny i haloperidolu na grupy tiolowe osocza osób zdrowych

The comparison of clozapine and haloperidol effects on plasma thiol groups in healthy subjects

¹ Pracownia Badań Biologicznych w Psychiatrii, I Katedra Psychiatrii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

² Klinika Zaburzeń Afektywnych i Psychotycznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

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 oraz Dr. Bogdanowi Kontkowi za pomoc techniczną.

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, and Dr. Bogdan Kontek for technical assistance.

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

Analizowano zróżnicowane działanie leków przeciwpsychotycznych: haloperidolu i klozapiny na biomarkery stresu oksydacyjnego. Dotychczas nie rozstrzygnięto, w jaki sposób klozapina i haloperidol oddziałują na grupy tiolowe (-SH) osocza ludzkiego. Celem badania było ustalenie wpływu haloperidolu i klozapiny w dawkach rekomendowanych do leczenia ostrego epizodu schizofrenii na wolne tiolowe w ludzkim osoczu w modelu *in vitro*. **Material i metody:** Krew do badań pobrano od 10 zdrowych ochotników płci męskiej (w wieku 24-26 lat) na roztwór ACD. Substancję aktywną leków rozpuszczono w 0,01% dimetylosulfotlenku do stężeń końcowych (haloperidol 4 ng/ml i 20 ng/ml; klozapina 350 ng/ml i 420 ng/ml) i inkubowano z osoczem 24 godziny w temperaturze 37°C. Do każdego doświadczenia wykonano próby kontrolne (bez leku). Oznaczenia poziomu wolnych tioli wykonano metodą Ellmana (Rice-Evans, 1991). Do analizy wyników zastosowano sparowany test t-Studenta (StatSoft Inc., Statistica v. 6.0). **Wyniki:** Ustalono, że po 24-godzinnej inkubacji z osoczem haloperidol w stężeniu 4 ng/ml i 20 ng/ml oraz klozapina w stężeniu 350 ng/ml i 420 ng/ml spowodowały nieistotne statystycznie, w porównaniu z próbami kontrolnymi (bez leku), zmiany poziomu wolnych tioli ($p > 0,05$). **Wniosek:** Klozapina i haloperidol w stężeniach odpowiadających dawkom rekomendowanym do leczenia ostrego epizodu schizofrenii nie powodują istotnych zmian stężenia wolnych tioli w osoczu.

Słowa kluczowe: klozapina, haloperidol, wolne tiolowe, stres oksydacyjny, schizofrenia

Summary

Differentiated effects of antipsychotics: haloperidol and clozapine on oxidative stress biomarkers were analysed. It has not been determined yet in what way clozapine and haloperidol affect human plasma thiol groups (-SH). The study was aimed at establishing the effects of haloperidol and clozapine, in doses recommended for treatment of acute episode of schizophrenia, on free thiols in human plasma under *in vitro* conditions. **Material and methods:** Blood for the study was collected from 10 healthy male volunteers (aged 24-26 years) for ACD solution. Active substance of the drugs was dissolved in 0.01% dimethyl sulfoxide to the final concentrations (haloperidol 4 ng/ml and 20 ng/ml; clozapine 350 ng/ml and 420 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 (acc. to Rice-Evans, 1991). The results were analysed using the paired Student t-test (StatSoft Inc., Statistica v. 6.0). **Results:** After 24 hours' incubation with plasma, haloperidol in concentrations 4 ng/ml and

20 ng/ml and clozapine in concentrations 350 ng/ml and 420 ng/ml caused statistically insignificant, as compared to control samples (without the drug), modifications in the level of free thiols ($p > 0.05$). **Conclusions:** Clozapine and haloperidol in concentrations corresponding to doses recommended for treatment of acute episode of schizophrenia, do not induce significant changes in the concentration of free thiols in plasma.

Key words: clozapine, haloperidol, free thiols, oxidative stress, schizophrenia

WSTĘP

U chorych na schizofrenię dochodzi do obniżenia obrony antyoksydacyjnej, spadku stężenia glutationu (GSH) i niskocząsteczkowych tioli oraz zmian aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Badania z użyciem biomarkerów stresu oksydacyjnego wykazały, że u osób ze schizofrenią występuje stres oksydacyjny, który powoduje uszkodzenie biomolekuł lipidów oraz białek płytek krwi i osocza⁽¹⁻⁷⁾. Opisano wpływ prooksydacyjny leków przeciwpsychotycznych, przeważnie pierwszej generacji (LPIG), oraz brak takiego wpływu lub nawet działanie antyoksydacyjne leków przeciwpsychotycznych drugiej generacji (LPIIG)⁽⁸⁻¹¹⁾. Na podstawie wyników badań prowadzonych na modelu zwierzęcym oraz obserwacji pacjentów leczonych haloperidolem stwierdzono, że stres oksydacyjny jest zaangażowany w toksyczność tego leku^(12,13). Sagara ustalił, że haloperidol indukuje sześciokrotny wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (ROS)⁽¹⁴⁾. Wykazał, że toksyczności indukowanej przez haloperidol w neuronach korowych szczura i w mysiej linii komórek hipokampa HT-22 towarzyszą zmiany mitochondrialnego potencjału błonowego (MMP), gromadzenie ROS, spadek stężenia GSH w komórce i wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} , który bezpośrednio poprzedza śmierć komórki. Udowodnił, że obniżenie stężenia wewnątrzkomórkowego GSH potęguje toksyczność haloperidolu, oraz zasugerował, że podanie egzogennych antyoksydantów może chronić komórki przed toksycznością tego leku⁽¹⁴⁾. W badaniach innych autorów, prowadzonych na zwierzętach, po podaniu haloperidolu również stwierdzono spadek GSH⁽¹⁵⁾. Zmniejszenie stężenia wewnątrzkomórkowego GSH w przebiegu stosowania haloperidolu potwierdzili również Pai i wsp., prowadząc badania *in vivo*⁽¹³⁾.

Obecnie uważa się, że stres oksydacyjny jest ważnym czynnikiem toksyczności wywieranej przez leki przeciwpsychotyczne, które indukują generowanie reaktywnych form tlenu i powodują objawy dyskinetyczne oraz inne objawy z kręgu tzw. zaburzeń ruchowych (*movement disorders*). Jednak w przypadku klozapiny, LPIIG, który zazwyczaj nie powoduje takich objawów, nie opisywano takiego działania⁽¹⁴⁾. W badaniach prowadzonych na modelu *in vitro* na liniach komórkowych stwierdzono, że klozapina chroni komórki przed apoptozą spowodowaną stresem oksydacyjnym wywołanym doświadczalnie przez różne czynniki⁽¹⁶⁾. W badaniach własnych prowadzonych na modelu *in vitro* po inkubacji klozapiny z osoczem zdrowych ochotników w porównaniu z próbami kontrolnymi wykazano

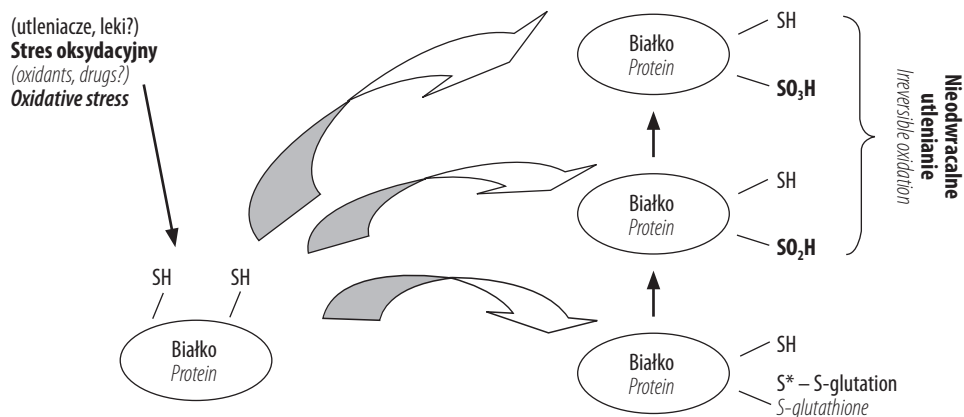
INTRODUCTION

S chizophrenic patients exhibit a decrease in antioxidative defence, decrease in the concentration of glutathione (GSH) and low-molecular thiols, and changes in the activity of antioxidative enzymes. Studies with the use of oxidative stress biomarkers indicate that schizophrenic patients experience oxidative stress which causes damage to biomolecules of lipids and proteins of platelets and plasma⁽¹⁻⁷⁾. Pro-oxidative effects of antipsychotics, mostly of the first generation (FGA), and the lack of such effects or even antioxidative effects of the second generation antipsychotics (SGA) were described⁽⁸⁻¹¹⁾. The results of the studies carried out on animal model and observation of patients treated with haloperidol indicate that oxidative stress is involved in the toxicity of this drug^(12,13). According to Sagara, haloperidol induced a six-fold increase in the level of reactive oxygen species (ROS)⁽¹⁴⁾. He indicated that the toxicity, induced by haloperidol in cortical rat neurons and in the mouse hippocampal cell lines HT-22, is accompanied by modifications in mitochondrial membrane potential (MMP), accumulation of ROS, decrease in cellular concentration of GSH and increase in intracellular level of Ca^{2+} ions, which directly preceded the cell's death. He proved that a decrease in intracellular concentration of GSH enhanced the toxicity of haloperidol, and suggested that administration of exogenous antioxidants might protect cells against the toxicity of this drug⁽¹⁴⁾. In studies carried out by other authors, conducted on animals, GSH was also decreased after administration of haloperidol⁽¹⁵⁾. A decreased concentration of intracellular concentration of GSH in the course of the use of haloperidol was also confirmed by Pai et al. in *in vivo* studies⁽¹³⁾.

According to presently prevailing opinions, oxidative stress is an important factor of toxicity exhibited by antipsychotics which induce generation of reactive oxygen species and cause dyskinetic symptoms and other symptoms of the type of the so called movement disorders. However, in the case of the SGA clozapine which usually does not cause such symptoms, those effects have not been described⁽¹⁴⁾. *In vitro* studies of cellular lines indicate that clozapine protects cells from apoptosis caused by oxidative stress induced experimentally by various factors⁽¹⁶⁾. Our own *in vitro* studies conducted after incubation of clozapine with healthy volunteers' plasma, as compared to control samples, showed a tendency to lipid peroxidation decrease (measured by TBARS level)⁽¹⁷⁾. At the same time in the experiment car-

tendencję do spadku peroksydacji lipidów (mierzoną stężeniem TBARS)⁽¹⁷⁾. Jednocześnie w doświadczeniu prowadzonym w tych samych warunkach po zastosowaniu haloperidolu zaobserwowano wyraźny wzrost peroksydacji lipidów (TBARS)⁽¹⁸⁾. Wyniki tych badań świadczą o przeciwnym działaniu obu leków na stres oksydacyjny, mierzony za pomocą stężenia TBARS – markera peroksydacji lipidów⁽¹⁹⁾. Wiedza na temat wpływu zarówno LPIG, jak i LPIIG na procesy oksydacyjne jest dość ograniczona, zwłaszcza w zakresie ich oddziaływania na markery obrony antyoksydacyjnej, a więc enzymy antyoksydacyjne czy niskocząsteczkowe antyoksydanty, w tym tiole. Dotychczas zarówno w badaniach klinicznych, jak i przedklinicznych nie ustalono, jaki wpływ wywiera klozapina (LPIIG) i haloperidol (LPIG) na grupy tiolowe osocza ludzkiego. Związki tiolowe odgrywają istotną rolę w ochronie komórki przed stresem oksydacyjnym i elektrofilowymi ksenobiotykami, również lekami⁽²⁰⁾. Najważniejsze niebiałkowe tiole, takie jak GSH oraz cysteina i homocysteina, pełnią ważne funkcje biologiczne, między innymi GSH powoduje detoksykację elektrofilowych ksenobiotyków oraz uczestniczy w wielu ważnych procesach komórkowych, odpowiadając za utrzymanie prawidłowej struktury i funkcji białek. Z kolei cysteina (tiolowy aminokwas) jest nie tylko czynnikiem redukującym, ale też substratem w biosyntezie białek i GSH, a reszty tego aminokwasu zlokalizowane na powierzchni białek (np. albumin osocza) pełnią funkcje antyoksydacyjne. W przypadku tioli białkowych grupy -SH reszt cysteinowych mogą występować jako wolne tiole, disulfidy oraz tworzyć disulfidy mieszane z tiolami niskocząsteczkowymi. Utlenianie grup tiolowych (-SH) reszt cysteiny w białkach może skutkować powstaniem rodników tylowych, S-nitrozotioili czy kwasów sulfenowych^(20,21). Proces ten jest odwracalny i ma znaczenie regulacyjne, stanowi też etap pośredni na drodze powstawania mieszanych disiarczków. Zmiana stosunku tioli/disiarczki, czyli zmiana potencjału redoks tioli w komórce lub osoczu wywiera znaczący wpływ na strukturę i funkcję białek⁽²²⁾. Wpływ na zmiany tego potencjału jest związany z tworzeniem mieszanych

ried out under the same conditions after the use of haloperidol a distinct increase in lipid peroxidation was observed (TBARS)⁽¹⁸⁾. The results of these studies point to opposing effects of both drugs on oxidative stress measured by the level of TBARS – lipid peroxidation marker⁽¹⁹⁾. The knowledge of the impact of both FGAs and SGAs on oxidative processes is rather limited, especially within their effects on antioxidative defence markers, i.e. antioxidative enzymes or low-molecular antioxidants, including thiols. So far neither clinical nor preclinical studies established the effects of clozapine (SGA) and haloperidol (FGA) on human plasma thiol groups. Thiol compounds play a significant role in the cell protection against oxidative stress and electrophilic xenobiotics, also drugs⁽²⁰⁾. The most important non-protein thiols, such as GSH and cysteine and homocysteine, fulfil important biological functions, among other GSH causes detoxication of electrophilic xenobiotics and participates in many important cellular processes, accounting for the maintenance of correct structure and function of proteins. On the other hand, cysteine (thiol amino acid) is not only a reducing factor but also a substrate in biosynthesis of protein and GSH, whereas the residues of this amino acid, located on the surface of the proteins (e.g. plasma albumins), fulfil antioxidative functions. In the case of protein thiols, the -SH groups of cysteine residues may occur as free thiols, disulfides, and form disulfides mixed with low-molecular thiols. Oxidation of thiol groups (-SH) of cysteine residues in proteins may give rise to thiol radicals, S-nitrosothiols or sulfenic acids^(20,21). This process is reversible and bears regulatory importance, besides it constitutes an indirect stage in the formation of mixed disulfides. A modification in the thiols/disulfides ratio, i.e. modification of thiols redox potential in the cell or plasma, significantly affects proteins structure and function⁽²²⁾. The impact on modifications in this potential is connected with the formation of mixed disulfides in result of the proteins S-thiolation reaction (fig. 1). However, under a shortage of glutathione in result of oxidative stress, the cells are exposed to irreversible further oxida-



Rys. 1. S-tiolacja jako mechanizm chroniący reszty cysteiny w białkach przed nieodwracalnym utlenianiem grup -SH do -SO₂H i -SO₃H
 Fig. 1. S-thiolation as a mechanism protecting cysteine residues in proteins from irreversible oxidation of -SH groups to -SO₂H and -SO₃H

disiarczków w wyniku reakcji S-tiacji białek (rys. 1). Jednak w sytuacji niedoboru glutationu w wyniku stresu oksydacyjnego w komórkach pojawia się niebezpieczeństwo nieodwracalnego dalszego utleniania grup -SH do kwasów sulfinowych (R-SO₂H) i sulfonowych (R-SO₃H), co prowadzi do utraty wszystkich biologicznych funkcji białek, zależnych od nukleofilowych właściwości grup -SH (rys. 1). Tak więc gromadzenie mieszanych grup disiarczków białka w warunkach oksydacyjnych należy do markerów stresu oksydacyjnego i jednocześnie wskazuje na mechanizm obrony przed nieodwracalnym utlenianiem grup -SH. Jednak tworzenie disiarczków w procesie S-tiacji białek jest możliwe tylko wtedy, gdy występuje odpowiednie stężenie GSH lub innych tioli. Zarówno regulacyjne, jak i antyoksydacyjne znaczenie procesu S-tiacji białek ściśle wiąże się z odwracalnością tych reakcji, czyli z procesem detiacji, w który są zaangażowane tiolotransferazy, glutaredoksyny i tioredoksyny⁽²²⁾. W osoczu ze względu na o wiele niższe niż w komórce stężenie glutationu istotne znaczenie dla procesów S-tiacji mają głównie grupy tiolowe (-SH) białek, zwłaszcza albumin.

CEL BADANIA

Celem badania jest porównanie wpływu wywieranego przez klozapinę i haloperidol na poziom wolnych tioli (grup -SH) osocza 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⁽²³⁾. 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), z prawidłowym BMI, niewykazujące cech zespołu metabolicznego (w tym zaburzeń gospodarki lipidowej i węglowodanowej), stosujące dietę zrównoważoną, które nie używały substancji psychoaktywnych (narkotyków, alkoholu, nikotyny), nie suplementowały antyoksydantów pochodzenia roślinnego lub farmaceutycznego oraz preparatów zawierających wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Wykluczono możliwość występowania we krwi badanych ochotników leków lub ich metabolitów, przyjmując kryterium nieużywania żadnych leków, w tym

tion of -SH groups to sulfinic acids (R-SO₂H) and sulfonic acids (R-SO₃H), which leads to the loss of all biological functions of proteins, dependent on nucleophilic properties of -SH groups (fig. 1).

So accumulation of mixed groups of protein disulfides under oxidative conditions belongs to oxidative stress markers and simultaneously points to the mechanism of defence against irreversible oxidation of -SH groups. However, the formation of disulfides in the process of S-thiolation of proteins is possible only with an appropriate concentration of GSH or other thiols. Both regulatory and antioxidative significance of the process of proteins S-thiolation is strictly connected with reversibility of these reactions, i.e. dethiolation process, which involves thioltransferases, glutaredoxins and thioredoxins⁽²²⁾. In plasma, owing to much lower glutathione concentration than that in the cell, particularly important for S-thiolation processes are mainly thiol (-SH) groups of proteins, especially albumins.

AIM OF THE STUDY

The study is aimed at the comparison of the effects of clozapine and haloperidol on the level of free thiols (-SH groups) in plasma under *in vitro* conditions.

MATERIAL AND METHODS

The research material consisted of fresh blood plasma 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⁽²³⁾. 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 correct BMI; they used a balanced diet and did not use psychoactive substances (narcotics, alcohol, tobacco), any antioxidants of vegetable or pharmaceutical origin and preparations containing polyunsaturated fatty acids. Any possible presence of medicinal 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.

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 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, rozpuszczoną w 0,01% dimetylosulfotenu – DMSO (stężenia końcowe, odpowiadające stabilnemu stężeniu leku osiąganemu po wielokrotnym podaniu dawek stosowanych w leczeniu ostrego epizodu schizofrenii: haloperidol 4 ng/ml i 20 ng/ml oraz klozapina 350 ng/ml i 420 ng/ml). Substancje czynne haloperidolu i klozapiny otrzymano odpowiednio z firmy Polfa i firmy Anpharm. 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 osocza po 24-godzinnej inkubacji z określonym stężeniem leku oraz w próbach kontrolnych oznaczano stężenie wolnych tioli metodą Ellmana^(24,25).

OZNACZANIE STĘŻENIA GRUP TIOLOWYCH W OSOCZU

Całkowitą zawartość tioli (grup sulfhydrylowych -SH) w osoczu inkubowanym 24 godziny z haloperidolem lub klozapiną oraz w próbach 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 absorpcji przy $\lambda=412\text{ nm}^{(25)}$. 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⁽²⁶⁾. Oznaczenia stężenia tioli wykonano w dwukrotnych powtórzeniach.

ANALIZA STATYSTYCZNA

Wyniki badań poddano analizie statystycznej: obliczono średnie arytmetyczne i błąd standardowy średniej. 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.

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 drugs, dissolved in 0.01% dimethyl sulfoxide – DMSO, was added consecutively to 0.5 ml of blood plasma (the final concentrations, corresponding to stable concentration of the drug achieved after multiple use of the doses used for the treatment of acute episode of schizophrenia: haloperidol 4 ng/ml and 20 ng/ml and clozapine 350 ng/ml and 420 ng/ml). The active substances of haloperidol and clozapine were supplied respectively from Polfa and Anpharm. The tested samples of plasma with the drugs dissolved 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). After 24 hours' incubation, in plasma samples with predefined drug concentration and control samples the level of free thiols was determined using the Ellman method^(24,25).

EVALUATION OF THIOL GROUPS CONCENTRATION IN PLASMA

The total contents of thiols (sulfhydryl groups -SH), in plasma samples incubated for 24 hours with haloperidol or clozapine 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 $\lambda=412\text{ nm}^{(25)}$. The total thiols concentration was calculated based on the value of molar extinction coefficient for TNB dianion ($\epsilon=13\ 600\ \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). 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⁽²⁶⁾. The thiols concentration measurements were made in duplicate.

STATISTICAL ANALYSIS

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

Haloperidol after 24 hours' incubation with blood plasma, as compared to the control samples, caused a statistical-

	Stężenie tioli (nmol/mg białka) <i>Concentration of thiols (nmol/mg of protein)</i>		CV%	p*
	Średnia <i>Mean value</i>	SEM		
Kontrola bez leku <i>Control without drug</i>	2,802	0,101	11,4	
Haloperidol 4 ng/ml <i>Haloperidol 4 ng/ml</i>	2,845	0,077	8,6	p>0,05
Haloperidol 20 ng/ml <i>Haloperidol 20 ng/ml</i>	2,902	0,088	9,6	p>0,05
Klozapina 350 ng/ml <i>Clozapine 350 ng/ml</i>	2,787	0,082	9,3	p>0,05
Klozapina 420 ng/ml <i>Clozapine 420 ng/ml</i>	2,866	0,116	12,8	p>0,05

* Porównanie z kontrolą sparowanym testem t-Studenta.
* Comparison with the control by paired Student t-test.

Tabela 1. Wpływ haloperidolu i klozapiny na stężenie wolnych tioli w osoczu (dla każdego leku n=10, dwukrotnie powtórzenia, czas inkubacji 24 godziny) – wartości bezwzględne

Table 1. Effects of haloperidol and clozapine on the concentration of free thiols in plasma (for each drug n=10, duplicated, incubation time 24 hours) – absolute values

WYNIKI

Haloperidol po 24-godzinnej inkubacji z osoczem w porównaniu z próbami kontrolnymi powodował nieistotny statystycznie wzrost stężenia tioli zarówno dla stężenia leku 4 ng/ml (o 2%), jak i 20 ng/ml (o 4%) (rys. 2, tabela 1). Podobnie w przypadku klozapiny po 24-godzinnej inkubacji z osoczem odnotowano nieistotny statystycznie, w odniesieniu do prób kontrolnych, spadek stężenia wolnych tioli – o 0,5% dla stężenia leku 350 ng/ml oraz jego wzrost – o 3% dla stężenia leku 420 ng/ml (rys. 2, tabela 1). Wyniki badań wskazują, że zarówno klozapina, jak i haloperidol w stężeniach odpowiadających dawkom leku rekomendowanym do leczenia schizofrenii nie wpływają istotnie na zmianę stężenia wolnych tioli w osoczu.

OMÓWIENIE

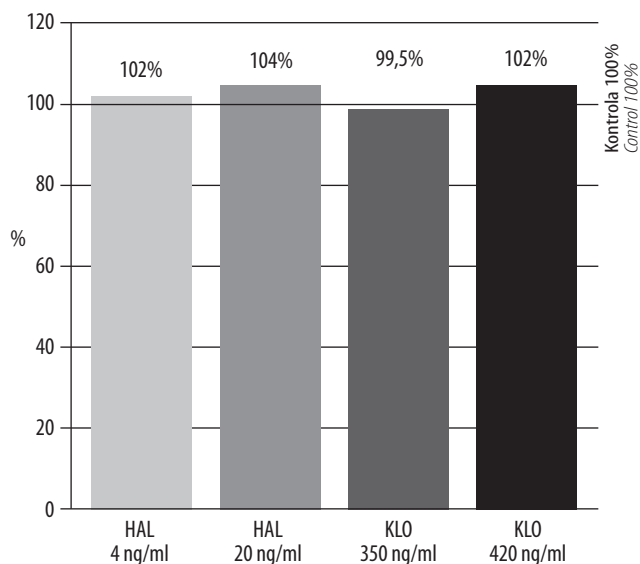
Stres oksydacyjny i wolne rodniki odgrywają rolę w patofizjologii szeregu zaburzeń neuropsychiatrycznych. Istnieje wiele szlaków prowadzących do nadmiernego wytwarzania wolnych rodników i reaktywnych form tlenu i wynikającego z tego stresu oksydacyjnego. Zmiany statusu antyoksydacyjnego w schizofrenii mogą być następstwem zwiększonego generowania reaktywnych form tlenu. Wyniki badań wskazują też, że leki przeciwpsychotyczne stosowane w leczeniu schizofrenii mogą wywierać zróżnicowany wpływ na procesy redoks, chociaż różnice te nie są dostatecznie wyjaśnione i wynikają prawdopodobnie ze złożonych mechanizmów komórkowego i molekularnego działania tych leków. W badaniach na zwierzętach stwierdzono, że podawanie leków przeciwpsychotycznych, przede wszystkim LPIG, powoduje: wzrost wytwarzania wolnych rodników poprzez blokowanie receptorów dopaminowych, wzrost obrotu i metabolizmu dopaminy, wzrost poziomu peroksydacji lipidów błony komórkowej oraz zmianę poziomu

ly insignificant increase in the concentration of thiols both for the concentration 4 ng/ml (by 2%) and 20 ng/ml (by 4%) (fig. 2, table 1). Similarly in the case of clozapine after 24 hours' incubation with plasma a statistically insignificant, as compared to control groups, decrease in the concentration of free thiols was noted – by 0.5% for the drug concentration 350 ng/ml, and an increase – by 3% for the drug concentration 420 ng/ml (fig. 2, table 1). The results of the studies indicate that neither clozapine nor haloperidol in concentrations corresponding to the doses of the drug recommended for treatment of schizophrenia significantly affect a change of the concentration of free thiols in plasma.

DISCUSSION

Oxidative stress and free radicals play a certain role in pathophysiology of a number of neuropsychiatric disorders. There are many pathways leading to excessive production of free radicals and reactive oxygen species resulting in oxidative stress. Modifications of antioxidative status in schizophrenia may result from an increased generation of reactive oxygen species. Furthermore, the results of the studies indicate that antipsychotics used for treatment of schizophrenia may have a different impact on redox processes, although these differences have not been explained sufficiently and probably result from complex mechanisms of cellular and molecular effects of these drugs. Studies on animals confirmed that administration of antipsychotics, especially FGAs, causes: an increase in the production of free radicals by inhibition of dopamine receptors, an increase in the turnover and metabolism of dopamine, increase in the level of cellular membrane lipid peroxidation and modification of the level of antioxidative enzymes in the brain^(12-14,27,28). Clinical studies of the effects of antipsychotics on antioxidative enzymes activity yielded divergent results⁽²⁹⁻³²⁾, which was probably associat-

enzymów antyoksydacyjnych w mózgu^(12-14,27,28). W badaniach klinicznych dotyczących wpływu leków przeciwpsychotycznych na aktywność enzymów antyoksydacyjnych uzyskiwano rozbieżne wyniki⁽²⁹⁻³²⁾, co prawdopodobnie wiązało się z różnymi kryteriami włączenia pacjentów do badań i wpływem zaburzeń psychotycznych na aktywność tych enzymów, wynikającą z występującego stresu oksydacyjnego. U chorych na schizofrenię wykazano istotne zmniejszenie stężenia grup tiolowych w płytkach krwi⁽²⁾ oraz istotne zmniejszenie stężenia niskocząsteczkowych tioli w białkach osocza, takich jak glutation, cysteina czy cysteinylglicyna⁽¹⁾. Zmniejszenie stężenia niskocząsteczkowych tioli u chorych na schizofrenię świadczy o istotnym obniżeniu obrony antyoksydacyjnej, w której GSH i tiole odgrywają ważną rolę. W piśmiennictwie nie ma badań, które rozstrzygałyby, jaki wpływ wywierają leki przeciwpsychotyczne (w tym haloperidol i klozapina) na stężenie grup -SH w osoczu. Huang i wsp. w opublikowanej w 2010 roku pracy stwierdzili, że po 4 tygodniach leczenia risperidonem występuje istotny spadek stężenia wolnych tioli w osoczu u chorych na schizofrenię, ale jednocześnie wskazali na możliwy udział różnych czynników zakłócających przebieg tego badania⁽³³⁾. Wydaje się, że na wyniki tego badania mogły mieć wpływ sama choroba i złożone mechanizmy związane ze stresem oksydacyjnym, występującym u chorych na schizofrenię. Z tego względu, nie umniejszając wagi badań klinicznych, podjęliśmy próbę przeprowadzenia doświadczeń w modelu *in vitro*, oceniających stężenie grup tiolowych u osób zdrowych po inkubacji osocza z lekiem. Wybraliśmy dwa leki przeciwpsychotyczne – haloperidol (LPIIG) oraz klozapinę (LPIIG), ze względu na opisane ich przeciwstawne działanie na peroksydację lipidów osocza. Wskazywano, że haloperidol zwiększa generowanie wolnych rodników i innych reaktywnych form tlenu i w związku z tym działa neurotoksycznie w różnych strukturach mózgu doświadczalnych zwierząt^(14,30). Parikh i wsp. w badaniach na zwierzętach stwierdzili, że przewlekłe leczenie haloperidolem istotnie zmniejsza aktywność zarówno dysmutazy ponadtlenkowej, jak i katalazy, a jednocześnie znacząco zwiększa poziom hydroksyalkenów – markera peroksydacji lipidów w mózgu⁽³⁰⁾. Z neurotoksycznością haloperidolu wynikającą z działania oksydacyjnego wiązano pojawianie się u pacjentów leczonych tym lekiem objawów późnej dyskinezy, objawów pozapiramidowych czy, szerzej ujmując, zaburzeń ruchowych (*movement disorders*)^(9,34). W badaniach klinicznych wskazywano też na zmiany peroksydacji lipidów, mierzonej za pomocą oznaczenia stężenia związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), zarówno u chorych na schizofrenię bez włączonych leków przeciwpsychotycznych, jak i po leczeniu niektórymi z tych leków, w tym haloperidolem^(6,7,35,36). Podobnie w naszym badaniu eksperymentalnym (w modelu *in vitro*) haloperidol w stężeniach odpowiadających dawkom leku stosowanym w leczeniu chorych na schizofrenię wywierał wpływ prooksydacyjny, powodując istotny wzrost peroksydacji lipidów, po 24-godzinnej inkubacji z osoczem uzyskanym od zdrowych



Rys. 2. Stężenie wolnych tioli w osoczu po 24-godzinnej inkubacji osocza z klozapiną – KLO (350 ng/ml, 420 ng/ml) i haloperidolem – HAL (4 ng/ml, 20 ng/ml) wyrażone w % (kontrola = 100%)

Fig. 2. Concentration of free thiols in plasma after 24 hours' incubation of plasma with clozapine – KLO (350 ng/ml, 420 ng/ml) and haloperidol – HAL (4 ng/ml, 20 ng/ml) expressed in % (control = 100%)

ed with different criteria of including the patients to the studies and with the effects of psychotic disorders on activity of these enzymes, resulting from oxidative stress. Schizophrenic patients exhibit a significant decrease in the concentration of thiol groups in platelets⁽²⁾ and a significant decrease in the concentration of low-molecular thiols in plasma proteins, such as glutathione, cysteine or cysteinylglycine⁽¹⁾. A decrease in the concentration of low-molecular thiols in schizophrenic patients points to a significant decrease in antioxidative defence, where GSH and thiols play an important role. Literature does not contain any studies which would specify the effects of antipsychotics (including haloperidol and clozapine) on the concentration of -SH groups in plasma. Huang et al. in their study published in 2010 confirmed that 4 weeks' treatment with risperidone causes a significant decrease in the concentration of free thiols in plasma of schizophrenic patients; at the same time they pointed to a possible contribution of various factors disturbing the course of this study⁽³³⁾. It seems that the results of this study could be affected by the disease itself and by complex mechanisms associated with oxidative stress occurring in schizophrenic patients. Therefore, without diminishing the importance of clinical studies, we tried to carry out *in vitro* experiments assessing the concentration of thiol groups in healthy subjects after incubation of plasma with the drug. We chose two antipsychotics – haloperidol (FGA) and clozapine (SGA), owing to their described opposite effects on plasma lipid peroxidation. Haloperidol was shown to in-

ochotników⁽¹⁸⁾. Jednak w obecnym badaniu haloperidol nie wpływał istotnie na stężenie grup -SH w osoczu. Haloperidol, jak większość leków LPIG, działa głównie jako antagonist receptoru D₂⁽³⁷⁾. Wykazano, że wysokie stężenia antagonistów receptora D₂ wywierają neurotoksyczny wpływ w różnych strukturach mózgu^(14,38). Opisywano, że powstający z haloperidolu metabolit – jon pirydynowy haloperidolu (HP⁺) poważnie wpływa na transport dopaminy, poprzez blokowanie receptorów dopaminy⁽¹⁴⁾. Wykazano także, że HP⁺ jest silnym inhibitorem pierwszego kompleksu mitochondrialnego i może zakłócać transport elektronów zarówno na poziomie pierwszego kompleksu mitochondrialnego, jak i drugiego⁽¹⁴⁾. Sugerowano, że wzrost obrotu metabolicznego dopaminy, który z kolei może skutkować zwiększoną produkcją toksycznych metabolitów, może przyczynić się do neurotoksyczności haloperidolu^(14,39). Ponieważ enzymatyczny metabolizm dopaminy generuje nadtlenek wodoru, zwiększony obrót dopaminy mógłby prowadzić również do nadmiernej produkcji nadtlenu wodoru⁽³⁹⁾, a następnie w wyniku katalicznego działania metali przejściowych, takich jak żelazo, do wytwarzania z nadtlenu wodoru silnie neurotoksycznego rodnika hydroksylowego⁽²⁰⁾. Kolejny mechanizm wolnorodnikowy neurotoksycznych uszkodzeń mógłby być związany z generowaniem nadmiernej ilości tlenku azotu (NO) i neurotoksycznego nadtlenoazotynu oraz ich interakcji z GSH i innymi związkami tiolowymi. Opisywano, że leczenie haloperidolem może zwiększać wytwarzanie tlenku azotu⁽⁴⁰⁾. Wiadomo, że po ekspozycji na tlenek azotu GSH reaguje z NO[•], tworząc hydroksyloaminę i utleniony glutation (GSSG), oraz z kationem nitrozonowym (NO⁺), tworząc S-nitrozoglutation⁽⁴¹⁾. Powstający z NO nadtlenoazotyn także reaguje z GSH w procesie jedno- lub dwuelektronowego utlenienia, zależnie od fizjologicznego pH i stężenia GSH⁽²²⁾. Ponieważ reakcja NO z wolnymi tiolami konkuruje o ten sam substrat, tj. GSH (z rozkładem nadtlenu wodoru przez peroksydazę glutationową), nadmierne wytwarzanie NO może prowadzić do istotnego zmniejszenia poziomu GSH. U chorych na schizofrenię opisano obniżony poziom GSH^(1,42,43) oraz podwyższony poziom tlenku azotu w niektórych strukturach mózgu w badaniach autopsyjnych⁽⁴⁴⁾. W badaniach własnych wykazano u tych chorych znaczny wzrost stężenia neurotoksycznego nadtlenoazotynu, powstającego z NO i anionorodnika ponadtlenukowego^(1,2). W warunkach fizjologicznych NO i jego metabolity reagują z różnymi tiolami (tj. GSH), tworząc stabilne S-nitrozotiole⁽²⁰⁾. Tak więc reakcja S-tiolacji odgrywa istotną rolę jako mechanizm ochronny w przebiegu stresu oksydacyjnego, związanego z powstawaniem nie tylko reaktywnych form tlenu, ale również reaktywnych form azotu, a odpowiednie stężenie wolnych tioli (w tym GSH) ma istotne znaczenie antyoksydacyjne. Mechanizm ten może również odgrywać istotną rolę w działaniu prooksydacyjnym leków. W obecnym prezentowanym badaniu działanie klozapiny na wolne tiole (grupy -SH) osocza osób zdrowych, podobnie jak w przypadku haloperidolu, nie miało istotnego znaczenia.

crease generation of free radicals and other reactive oxygen species, therefore it acts neurotoxically in different structures of experimental animals' brain^(14,30). Parikh et al. in experiments on animals found out that chronic treatment with haloperidol significantly decreased the activity of both superoxide dismutase and catalase, simultaneously significantly increasing the level of hydroxyl alkenes – marker of lipid peroxidation in brain⁽³⁰⁾. Haloperidol neurotoxicity resulting from oxidative effects in patients treated with this drug was associated with the occurrence of symptoms of tardive dyskinesia, extrapyramidal symptoms, or, to put it more comprehensively, movement disorders^(9,34). In clinical studies some modifications of lipid peroxidation, measured by determination of the level of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), were also indicated, both in schizophrenic patients without included antipsychotics and after treatment with some of these drugs, including haloperidol^(6,7,35,36). Similarly, in our experiment (*in vitro*), haloperidol in concentrations corresponding to doses of this drug used for treatment of schizophrenia induced pro-oxidative effects, causing a significant increase in lipid peroxidation after 24 hours' incubation with plasma obtained from healthy volunteers⁽¹⁸⁾. However, in the present study haloperidol did not significantly affect the concentration of -SH groups in plasma. Haloperidol, as most of the FGAs, acts mainly as antagonist of receptor D₂⁽³⁷⁾. It has been indicated that high concentrations of receptor D₂ antagonists exhibit neurotoxic effects in various structures of the brain^(14,38). According to the description, the metabolite arising from haloperidol, i.e. haloperidol pyridine ion (HP⁺), largely affects dopamine transport through inhibition of dopamine receptors⁽¹⁴⁾. Furthermore, it has been demonstrated that HP⁺ is a strong inhibitor of the first mitochondrial complex and may disturb electron transport at the level of both the first and the second mitochondrial complex⁽¹⁴⁾. An increase in dopamine metabolic turnover, which in turn may result in an increased production of toxic metabolites, was implied to possibly contribute to neurotoxicity of haloperidol^(14,39). As enzymatic metabolism of dopamine generates hydrogen peroxide, increased dopamine turnover could also lead to excessive production of hydrogen peroxide⁽³⁹⁾, and then, in result of catalytic effects of transition metals, such as iron, to the generation, from hydrogen peroxide, of a strongly neurotoxic hydroxyl radical⁽²⁰⁾. A consecutive free-radical mechanism of neurotoxic damages could be associated with generation of an excessive amount of nitric oxide (NO) and neurotoxic peroxy nitrite and their interaction with GSH and other thiol compounds. According to some descriptions, the treatment with haloperidol may increase the generation of nitric oxide⁽⁴⁰⁾. Admittedly, after exposure to nitric oxygen GSH reacts with NO[•], forming hydroxylamine and oxidized glutathione (GSSG), and with nitrosyl cation (NO⁺), forming S-nitrosoglutathione⁽⁴¹⁾. Pernitrite arising from NO also reacts with GSH in the process of mono- or dielectron oxidation, depending on physiological pH and concentration of GSH⁽²²⁾. As NO's reaction with free thiols

Klozapina – LPIIG o właściwościach antagonistycznych zarówno w stosunku do receptorów D_2 , jak i $5-HT_{2A}$ (z przewagą działania wobec receptorów $5-HT_{2A}$ w stosunku do D_2), której działanie jest związane z brakiem występowania lub znacznie rzadszym występowaniem objawów pozapiramidowych niż w przypadku stosowania LPIG^(37,45), nie wykazywała działania prooksydacyjnego. W naszych poprzednich badaniach (*in vitro*) klozapina po 24-godzinnej inkubacji z osoczem osób zdrowych istotnie zmniejszała stężenie TBARS w porównaniu z próbami kontrolnymi (bez leku), a nawet wykazywała hamujący wpływ na peroksydację lipidów^(17,46). Podobnie w badaniach klinicznych Kropp i wsp.⁽⁴⁷⁾ po trzech tygodniach leczenia chorych na schizofrenię klozapiną nie wykazali wzrostu peroksydacji lipidów w porównaniu ze stanem wyjściowym.

Grupy tiolowe osocza stanowią ważny element obrony przed stresem oksydacyjnym, którego prawidłowy stan odpowiada między innymi za utrzymanie właściwej struktury i funkcji białek, regulację aktywności enzymów oraz kontrolę aktywności czynników transkrypcyjnych^(20,22), dlatego istotne znaczenie ma poznanie wpływu leków przeciwpsychotycznych, zwłaszcza o działaniu prooksydacyjnym, na ten element obrony antyoksydacyjnej. W obecnym badaniu stwierdzono, że zarówno haloperidol, jak i klozapina (w dawkach rekomendowanych do leczenia ostrego epizodu schizofrenii) nie wpływają istotnie na stężenie wolnych tioli w osoczu, tym samym wykazano, że mechanizm obrony antyoksydacyjnej związany z grupami -SH osocza nie odgrywa większej roli ochronnej przed zwiększonym utlenianiem lipidów wywoływanym przez haloperidol.

WNIOSKI

Klozapina i haloperidol w stężeniach odpowiadającym dawkom rekomendowanych do leczenia ostrego epizodu schizofrenii nie różnią się istotnie pod względem wywieranego wpływu na stężenie grup -SH osocza. Haloperidol podobnie jak klozapina nie wpływa istotnie na zmianę stężenia wolnych tioli w ludzkim osoczu, choć w przeciwieństwie do klozapiny zwiększa istotnie utlenianie lipidów osocza.

PIŚMIENNICTWO

BIBLIOGRAPHY:

1. 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.
2. Dietrich-Muszalska A., Olas B.: Modifications of blood platelet proteins of patients with schizophrenia. *Platelets* 2009; 20: 90-96.
3. Dietrich-Muszalska A., Olas B.: Isoprostanes as indicators of oxidative stress in schizophrenia. *World J. Biol. Psychiatry* 2009; 10: 27-33.
4. Khan M.M., Evans D.R., Gunna V. i wsp.: Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophr. Res.* 2002; 58: 1-10.

competes for the same substrate, i.e. GSH (with decomposition of hydrogen peroxide by glutathione peroxidase), excessive production of NO may lead to a significant decrease in the level of GSH. In schizophrenia patients a decreased level of GSH^(1,42,43) was described along with an increased level of nitric oxide in certain structures of the postmortem brain⁽⁴⁴⁾. Our own studies indicated in these patients a considerable increase in the concentration of neurotoxic pernitrite arising from NO and superoxide anion radical^(1,2). In physiological conditions, NO and its metabolites react with various thiols (i.e. GSH), forming stable S-nitrosothiols⁽²⁰⁾. So S-thiolation reaction plays a significant role as a protective mechanism in the course of oxidative stress, connected with the formation not only of reactive oxygen species but also reactive nitrogen species, and an appropriate concentration of free thiols (including GSH) bears a significant antioxidative importance. This mechanism may also play an important role in pro-oxidative effects of drugs. In the currently presented study, the effects of clozapine on free thiols (-SH groups) in healthy subjects' plasma, similarly as in the case of haloperidol, did not have any significant importance. Clozapine – SGA of antagonistic properties both in relation to receptors D_2 and $5-HT_{2A}$ (with the predominance of the effects towards receptors $5-HT_{2A}$ in relation to D_2), the effects of which are connected with the lack or rare occurrence of extrapyramidal symptoms, as compared to the use of FGAs^(37,45), did not exhibit any pro-oxidative effects. In our previous (*in vitro*) studies, clozapine after 24 hours' incubation with healthy subjects' plasma significantly decreased the level of TBARS, as compared to control samples (without the drug), or even inhibited lipid peroxidation^(17,46). Similarly in clinical studies Kropp et al.⁽⁴⁷⁾ after three weeks' treatment of schizophrenic patients with clozapine did not show any increase in lipid peroxidation, as compared to the baseline.

Plasma thiol groups constitute an important element of defence against oxidative stress, whose correct status accounts, among other, for the maintenance of an appropriate structure and function of proteins, regulation of enzymes activity, and control of transcription factors activity^(20,22), therefore it is so important to know the effects of antipsychotics, especially those of pro-oxidative properties, on this element of antioxidative defence. This study confirms that neither haloperidol nor clozapine (in doses recommended for treatment of acute episode of schizophrenia) significantly affect the concentration of free thiols in plasma, thereby it has been indicated that the antioxidative defence mechanism associated with -SH groups does not play any important protective role against an increased lipid oxidation induced by haloperidol.

CONCLUSIONS

Clozapine and haloperidol in concentrations corresponding to doses recommended for treatment of acute episode of schizophrenia do not significantly differ in the effects on plasma -SH groups concentration. Haloperidol, similar-

5. Dietrich-Muszalska A., Olas B., Rabe-Jablonska J.: Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. *Platelets* 2005; 16: 386-391.
6. 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.
7. Arvindakshan M., Sitasawad S., Debsikdar V. i wsp.: Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. *Biol. Psychiatry* 2003; 53: 56-64.
8. Jeding I., Evans P.J., Akanmu D. i wsp.: Characterization of the potential antioxidant and pro-oxidant actions of some neuroleptic drugs. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 49: 359-365.
9. 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.
10. Dietrich-Muszalska A., Olas B.: Inhibitory effects of polyphenol compounds on lipid peroxidation caused by antipsychotics (haloperidol and amisulpride) in human plasma *in vitro*. *World J. Biol. Psychiatry* 2010; 11: 276-281.
11. Dietrich-Muszalska A., Kontek B., Rabe-Jabłońska J.: Quetiapine, olanzapine and haloperidol affect human plasma lipid peroxidation *in vitro*. *Neuropsychobiology* 2011; 63: 197-201.
12. Cadet J.L., Lohr J.B., Jeste D.V.: Free radicals and tardive dyskinesia. *Trends Neurosci.* 1986; 9: 107-108.
13. Pai B.N., Janakiramaiah N., Gangadhar B.N., Ravindranath V.: Depletion of glutathione and enhanced lipid peroxidation in the CSF of acute psychotics following haloperidol administration. *Biol. Psychiatry* 1994; 36: 489-491.
14. Sagara Y.: Induction of reactive oxygen species in neurons by haloperidol. *J. Neurochem.* 1998; 71: 1002-1012.
15. Shivakumar B.R., Ravindranath V.: Oxidative stress and thiol modification induced by chronic administration of haloperidol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993; 265: 1137-1141.
16. 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.
17. Dietrich-Muszalska A.: Wpływ różnych stężeń klozapiny na zmiany poziomu peroksydacji lipidów ludzkiego osocza w badaniach *in vitro*. *Psychiatr. Psychol. Klin.* 2005; 5: 18-25.
18. Dietrich-Muszalska A.: The impact of haloperidol on lipids peroxidation in human blood platelets and plasma at *in vitro* studies. *Psychiatr. Psychol. Klin.* 2004; 4: 150-156.
19. Karatas F., Karatepe M., Baysar A.: Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 2002; 311: 76-79.
20. Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. PWN, Warszawa 2009.
21. Włodek L., Iciek M.: S-tiolacja białek jako mechanizm antyoksydacyjny i regulacyjny. *Postępy Biochem.* 2003; 49: 77-84.
22. Włodek L. (red.): Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2003.
23. 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.
24. Ellman G., Lysko H.: A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal. Biochem.* 1979; 93: 98-102.
25. 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.
26. 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.
27. Mackay A.V.P., Iversen L.L., Rossor M. i wsp.: Increased brain dopamine and dopamine receptors in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 1982; 39: 991-997.
28. Mahadik S.P., Mukherjee S.: Free radical pathology and antioxidant defense in schizophrenia: a review. *Schizophr. Res.* 1996; 19: 1-17.
29. 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.
30. 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.
31. Zhang X.Y., Zhou D.F., Cao L.Y. i wsp.: The effect of risperidone treatment on superoxide dismutase in schizophrenia. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2003; 23: 128-131.
32. Zhang X.Y., Zhou D.F., Cao L.Y. i wsp.: Elevated blood superoxide dismutase in neuroleptic-free schizophrenia: association with positive symptoms. *Psychiatry Res.* 2003; 117: 85-88.
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.* 2010; 177: 18-21.
34. Lohr J.B., Lohr M.A., Wasli E. i wsp.: Self-perception of tardive dyskinesia and neuroleptic-induced parkinsonism: a study of clinical correlates. *Psychopharmacol. Bull.* 1987; 23: 211-214.
35. 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.
36. Dietrich-Muszalska A., Kontek B.: Lipid peroxidation in patients with schizophrenia. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2010; 64: 469-475.
37. Schatzberg A.F., Nemeroff C.B. (red.): The American Psychiatric Publishing Textbook of Psychopharmacology. Wyd. 3, American Psychiatric Publishing, Inc., Arlington 2004.
38. 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.
39. Dalla Libera A., Rigobello M.P., Bindoli A.: Inhibitory action of neuroleptic drugs and serotonin on dopamine autoxidation and lipid peroxidation. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 1995; 19: 291-298.
40. Krzaścik P., Kostowski W.: Nitric oxide donors antagonize N-nitro-L-arginine and haloperidol catalepsy: potential implication for the treatment of parkinsonism? *Pol. J. Pharmacol.* 1997; 49: 263-266.
41. Chiueh C.C., Rauhala P.: The redox pathway of S-nitrosoglutathione, glutathione and nitric oxide in cell to neuron communications. *Free Radic. Res.* 1999; 31: 641-650.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Taylor D., Paton C., Kerwin R.: The Maudsley 2003 Prescribing Guidelines. Wyd. 7, Martin Dunitz, Taylor & Francis Group, London, New York 2003.
46. Dietrich-Muszalska A., Rabe-Jabłońska J.: Porównanie wpływu działania leków przeciwpsychotycznych – I generacji (haloperidolu) i II generacji (klozapiny, olanzapiny i risperidonu) – na peroksydację lipidów osocza *in vitro*. *Psychiatr. Psychol. Klin.* 2007; 7: 210-218.
47. 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.