

Anna Dietrich-Muszalska^{1,2}, Anna Kwiatkowska¹,
Justyna Kopka¹, Joanna Rywaniak³,
Jolanta Rabe-Jabłońska²

Ocena wpływu amisulprydu na grupy tiolowe osocza w modelu *in vitro*

The assessment of amisulpride effects *in vitro* on plasma thiol groups

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. Pawel 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

W badaniach klinicznych wykazano, że amisulpryd – lek przeciwpsychotyczny drugiej generacji – nie powoduje wzrostu peroksydacji lipidów osocza. Nie wiadomo, w jaki sposób lek ten wpływa na aktywność kluczowych enzymów obrony antyoksydacyjnej oraz niskocząsteczkowe antyoksydanty, w tym grupy tiolowe osocza. Celem badania było ustalenie wpływu amisulprydu w dawkach rekomendowanych do leczenia ostrego epizodu schizofrenii na wolne tiole w ludzkim osoczu w modelu *in vitro* oraz peroksydację lipidów, mierzoną za pomocą oznaczenia stężenia TBARS. **Materiał i metody:** Krew do badań pobrano od 10 zdrowych ochotników płci męskiej (w wieku 24-26 lat) na roztwór ACD. Substancję aktywną amisulprydu rozpuszczono w 0,01% dimetylosulfotenu do stężeń końcowych (278 ng/ml i 578 ng/ml) i inkubowano z osoczem 24 godziny w temperaturze 37°C. Do każdego doświadczenia wykonano próby kontrolne. Oznaczenia poziomu wolnych tioli przeprowadzono metodą Ellmana, a stężenia związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym – metodą spektrofotometryczną (Rice-Evans, 1991). Do analizy wyników zastosowano sparowany test t-Studenta (StatSoft Inc., Statistica v. 6.0). **Wyniki:** Amisulpryd po 24-godzinnej inkubacji z osoczem w porównaniu z próbami kontrolnymi (bez leku) spowodował wzrost poziomu wolnych tioli w osoczu – istotny statystycznie dla stężenia 578 ng/ml ($p < 0,03$). W stężeniu tym po 24-godzinnej inkubacji z osoczem lek spowodował również istotny spadek peroksydacji lipidów ($p < 0,003$). **Wnioski:** Amisulpryd w stężeniu 578 ng/ml, odpowiadającym dawkom leku stosowanym w leczeniu ostrego epizodu schizofrenii, wywiera działania antyoksydacyjne, powodując istotny spadek peroksydacji lipidów osocza oraz zwiększając stężenie wolnych tioli w osoczu.

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

Summary

Clinical studies indicate that amisulpride – the second generation antipsychotic – does not cause any increase in plasma lipid peroxidation. We do not know in what way this medicinal drug affects the activity of the key enzymes of antioxidative protection and low-molecular antioxidants, including the plasma thiol groups. The study was aimed at establishing the effects of amisulpride, in doses recommended for treatment of acute episode of schizophrenia, on free thiols in human plasma under *in vitro* conditions and lipid peroxidation measured by the level of TBARS. **Material and methods:** Blood for the study was collected from 10 healthy male volunteers (aged 24-26 years) for ACD solution. Active substance of amisulpride was dissolved in 0.01% dimethyl sulfoxide to the final concentrations (278 ng/ml and 578 ng/ml) and incubated with plasma for 24 hours at 37°C. Control samples were performed for each experiment. 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:** Amisulpride after 24 hours' incubation with plasma, as compared to control samples (without drug), caused an increase in the level of free thiols in plasma – statistically significant for concentration 578 ng/ml ($p < 0.03$). At this concentration after 24 hours' incubation with plasma the drug caused also a significant decrease in lipid peroxidation ($p < 0.003$). **Conclusions:** Amisulpride in concentration 578 ng/ml, corresponding to doses used for treatment of acute episode of schizophrenia, induces antioxidative effects, causing a significant decrease in plasma lipid peroxidation and increasing the concentration of free thiols in plasma.

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

WSTĘP

U chorych na schizofrenię występuje stres oksydacyjny, wyrażany w zmianach stężenia lub aktywności różnych biomarkerów zarówno obrony antyoksydacyjnej, jak i procesów prooksydacyjnych⁽¹⁻⁸⁾. W związku z tym istotne znaczenie ma ustalenie działania leków przeciwpsychotycznych stosowanych w leczeniu schizofrenii na markery redoks. Większość leków przeciwpsychotycznych drugiej generacji przeważnie była opisywana jako leki niewywierające działania prooksydacyjnego lub nawet wykazujące tendencję do działania antyoksydacyjnego⁽⁹⁻¹⁵⁾. W badaniach własnych w modelu *in vitro* ustalono, że niektóre leki przeciwpsychotyczne drugiej generacji w stężeniach odpowiadających dawkom leku rekomendowanym do leczenia ostrego epizodu schizofrenii nie działają prooksydacyjnie, a nawet powodują zależny od stężenia leku spadek peroksydacji lipidów osocza⁽⁹⁾. Podobnie w badaniach *in vitro* na liniach komórkowych stwierdzono neuroprotektoryjne działanie niektórych z tych leków⁽¹⁵⁾. Jednak nie prowadzono takich badań z amisulprydem, podobnie nie określano wpływu tego leku na grupy tiolowe osocza. W badaniach własnych stwierdzono, że amisulpryd hamuje peroksydację lipidów osocza – działanie to nasila się po inkubacji leku w osoczu wraz z kwercetyną lub resweratolem⁽¹⁶⁾. Uwzględniając rezultaty tych badań oraz wyniki wskazujące na istotną rolę grup tiolowych (w tym glutationu – GSH) w patogenezie schizofrenii, podjęliśmy badania nad wpływem amisulprydu na stężenie wolnych tioli w osoczu⁽¹⁷⁻²⁰⁾.

CEL BADANIA

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

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

INTRODUCTION

S chizophrenic patients experience oxidative stress expressed in changes of concentration or activity of various biomarkers both of antioxidative defence and pro-oxidative processes⁽¹⁻⁸⁾. Therefore, it is particularly important to establish the effects of antipsychotics used for treatment of schizophrenia on redox markers. Most of the second generation antipsychotics were usually described as drugs which do not induce pro-oxidative effects or even have a tendency to antioxidative effects⁽⁹⁻¹⁵⁾. In our own study in *in vitro* model we have established that certain second generation antipsychotics in concentrations corresponding to the doses of the drug recommended for treatment of acute episode of schizophrenia, which did not act pro-oxidatively or even cause a drug-concentration-dependent decrease in plasma lipid peroxidation⁽⁹⁾. Similarly, in *in vitro* studies of cellular lines the neuroprotective effects of some of these drugs were found⁽¹⁵⁾. However, no such studies have not been carried out with amisulpride, and no effects of this drug on plasma thiol groups were determined. In our own study we found that amisulpride inhibited plasma lipid peroxidation – these effects were enhanced after incubation of the drug in plasma with quercetin or resveratrol⁽¹⁶⁾. Taking into account the results of these studies and the outcomes pointing to a significant role of thiol groups (including glutathione – GSH) in pathogenesis of schizophrenia, we undertook studies of amisulpride effects on plasma concentration of free thiols⁽¹⁷⁻²⁰⁾.

AIM OF THE STUDY

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

MATERIAL AND METHODS

The research material consisted of fresh blood plasma obtained from blood samples was mixed with anticoagulant ACD (citric acid/sodium citrate/dextrose; 5:1 v/v). Blood samples were obtained from 10 healthy male subjects

od 10 zdrowych mężczyzn (studentów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi) w wieku 24-26 lat (średnio $25 \pm 0,6$ roku). Do oceny stanu zdrowia psychicznego zastosowano M.I.N.I. – Mini-International Neuropsychiatric Interview⁽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 używały substancji psychoaktywnych (narkotyków, alkoholu, nikotyny), nie suplementowały antyoksydantów pochodzenia roślinnego lub farmaceutycznego oraz preparatów zawierających wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Wykluczono możliwość występowania w 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 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 amisulprydu, rozpuszczoną w 0,01% dimetylosulfotlenku – DMSO (stężenia końcowe, odpowiadające stabilnemu stężeniu leku osiąganemu po wielokrotnym zastosowaniu dawek stosowanych w leczeniu schizofrenii: 278 ng/ml, 578 ng/ml). Substancję czynną badanego leku otrzymano z firmy Sanofi-Aventis. 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 badanego po 24-godzinnej inkubacji z określonym stężeniem leku oraz w próbach kontrolnych oznaczano spektrofotometrycznie stężenie związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) metodą opisaną przez Rice'a-Evansa⁽²¹⁾ oraz stężenie wolnych tioli metodą Ellmana⁽²²⁾.

OZNACZANIE STĘŻENIA GRUP TIOLOWYCH W OSOCZU

Całkowitą zawartość tioli (grup sulfhydrylowych -SH) w osoczu inkubowanym 24 godziny z amisulprydem i dla

(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 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 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 medicinal 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 amisulpride, 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 schizophrenia: 278 ng/ml, 578 ng/ml). The active substance of the tested drug was supplied by Sanofi-Aventis company. 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, plasma samples with predefined drug concentration and control samples were tested spectrophotometrically for the level of thiobarbituric acid-reactive substances, using the Rice-Evans method⁽²¹⁾, whereas the level of free thiols was determined using the Ellman method⁽²²⁾.

EVALUATION OF THIOL GROUPS CONCENTRATION IN PLASMA

The total content of thiols (sulfhydryl groups -SH), in plasma samples incubated for 24 hours with amisulpride and in con-

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 absorpcji przy $\lambda=412\text{ nm}^{(21)}$. 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⁽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 badanego leku) dodano 0,5 ml 15% kwasu trichlorooctowego (TCA) w 0,25 M HCl i 0,5 ml 0,37% kwasu tiobarbiturowego (TBA) w 0,25 M HCl. Próby mieszano i ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej przez 10 minut. Następnie próbki osocza odwirowywano przez 15 minut (2500 obr./min, wirówka SIGMA 3K30) w celu otrzymania klarownego supernatantu. Po ochłodzeniu prób absorpcję supernatantu oznaczano na spektrokolorymetrze SEMCO przy długości fali 535 nm w kuwecie o grubości warstwy 1 cm. Ilość TBARS obliczano na podstawie wartości absorpcji, z wykorzystaniem molowego współczynnika absorpcji ($\epsilon=1,56\times 10^5\text{ M}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$). Oznaczenia stężenia TBARS wykonano po 24-godzinnej inkubacji osocza z amisulpridem, w dwukrotnych powtórzeniach. Stężenie TBARS wyrażono w $\mu\text{mol/l}$.

ANALIZA STATYSTYCZNA

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

WYNIKI

Amisulpryd po 24-godzinnej inkubacji z osoczem w porównaniu z próbkami kontrolnymi powoduje wzrost stężenia wolnych tioli – istotny statystycznie dla stężenia 578 ng/ml ($p<0,03$) oraz nieistotny dla stężenia 278 ng/ml (rys. 1, tabela 1). Amisulpryd w badanym po raz pierwszy stężeniu 278 ng/ml po 24-godzinnej inkubacji z osoczem, w porównaniu z próbkami kontrolnymi, nie wywiera istotnego wpływu na zmianę stężenia TBARS w osoczu ($p>0,05$),

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 $\lambda=412\text{ nm}^{(21)}$. 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⁽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 predefined final concentrations of the tested drug) were added to 0.5 ml 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 $\lambda=535\text{ nm}$ (SEMCO spectrophotometer). TBARS content was calculated basing on absorbance value, using the molar extinction coefficient ($\epsilon=1,56\times 10^5\text{ M}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$). The level of TBARS was determined after 24 hours' incubation of plasma with amisulpride. The measurements were made in duplicate. The concentration of TBARS was expressed in $\mu\text{mol/l}$.

STATISTICAL ANALYSIS

The obtained results of the studies 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

Amisulpride after 24 hours' incubation with blood plasma, as compared to the control samples, caused an increase in the concentration of free thiols – statistically significant for concentration 578 ng/ml ($p<0,03$) and nonsignificant for concentration 278 ng/ml (fig. 1, table 1). Amisulpride in the concentration, tested for the first time, of 278 ng/ml after 24 hours' incubation with blood plasma, as compared to control samples, does not signifi-

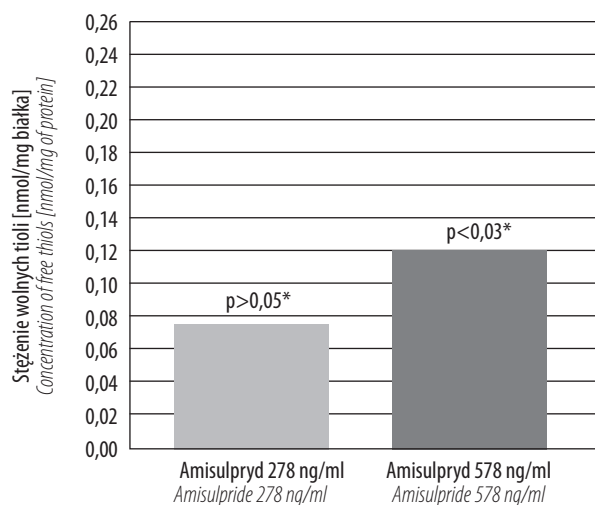
Stężenie amisulprydu <i>Concentration of amisulpride</i>	Marker		Kontrola (bez leku) <i>Control (without drug)</i>	Amisulpryd <i>Amisulpride</i>	p
			n=10	n=10	
278 ng/ml	Tiolo [nmol/mg białka] <i>Thiols [nmol/mg of protein]</i>	Średnia <i>Mean value</i>	2,8024	2,8773	p>0,05
		SEM	0,1012	0,0753	
	Tiolo [μmol/l] <i>Thiols [μmol/l]</i>	Średnia <i>Mean value</i>	0,1299	0,1332	p>0,05
		SEM	0,0047	0,0037	
578 ng/ml	Tiolo [nmol/mg białka] <i>Thiols [nmol/mg of protein]</i>	Średnia <i>Mean value</i>	2,8024	2,9227	p<0,03
		SEM	0,1012	0,0728	
	Tiolo [μmol/l] <i>Thiols [μmol/l]</i>	Średnia <i>Mean value</i>	0,1299	0,1355	p<0,03
		SEM	0,0047	0,0035	

Tabela 1. Wpływ amisulprydu (278 ng/ml) na stężenie wolnych tioli i związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w osoczu (n=10, w dwukrotnych powtórzeniach). Czas inkubacji 24 godziny

Table 1. Effects of amisulpride (278 ng/ml) on the concentration of free thiols and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in plasma (n=10, in duplicate). Incubation time – 24 hours

natomiast w stężeniu 578 ng/ml powoduje (podobnie jak w poprzednio prowadzonych badaniach) istotny spadek stężenia TBARS (p<0,003) (rys. 2).

Podsumowując wyniki doświadczeń, można stwierdzić, że amisulpryd nie wywiera działania prooksydacyjnego, a nawet w wyższych stężeniach odpowiadających dawkom leku stosowanym w leczeniu ostrego epizodu schizofrenii wykazuje działanie antyoksydacyjne, zarówno zmniejszające peroksydację lipidów, jak i zwiększające poziom wolnych tioli w osoczu.



* Względem kontroli, sparowany test t-Studenta.

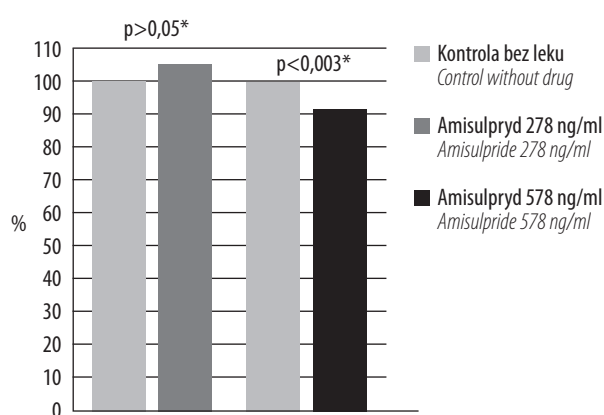
* In relation to control, paired Student t-test.

Rys. 1. Wzrost stężenia wolnych tioli w osoczu po 24-godzinnej inkubacji osocza z amisulprydem (278 ng/ml, 578 ng/ml)

Fig. 1. An increase in the concentration of free thiols in plasma after 24 hours' incubation of blood plasma with amisulpride (278 ng/ml, 578 ng/ml)

cantly contribute to the change in TBARS concentration in plasma (p>0.05), whereas in concentration 578 ng/ml it causes (as in the previous studies) a significant decrease in the level of TBARS (p<0.003) (fig. 2).

Summing up the results of the tests we may state that amisulpride does not induce pro-oxidative effects, or even, in higher concentrations corresponding to doses of the drug used in the treatment of acute episode of schizophrenia, it exhibits antioxidative effects, both decreasing lipid peroxidation and increasing the level of free thiols in plasma.



p – różnica względem kontroli (wartości bezwzględne), sparowany test t-Studenta.

p – difference in relation to the control (absolute values), paired Student t-test.

Rys. 2. Porównanie stężenia TBARS w badanym osoczu po 24-godzinnej inkubacji z amisulprydem (278 ng/ml, 578 ng/ml), wyrażony w % (kontrola = 100%)

Fig. 2. Comparison of TBARS level in plasma after 24 hours' incubation with amisulpride (278 ng/ml, 578 ng/ml), expressed in % (control = 100%)

OMÓWIENIE

Amisulpryd – pochodna benzamidu – jest lekiem stosowanym w leczeniu chorych na schizofrenię, u których opisywany jest stres oksydacyjny i związana z tym peroksydacja lipidów oraz oksydacyjne i nitracyjne uszkodzenia białek i DNA, a także różne zmiany w zakresie biomarkerów obrony antyoksydacyjnej (enzymów antyoksydacyjnych czy niskocząsteczkowych antyoksydantów, w tym również tioli)^(18,19,24,25). Niektórzy autorzy stwierdzili też, że u chorych na schizofrenię występuje obniżone stężenie antyoksydantów osocza, takich jak albumina, bilirubina i kwas moczowy^(26,27). Ponadto u osób chorych na schizofrenię ujawniono obniżone poziomy GSH, kwasu askorbinowego i witaminy E^(28,29). Zmiany biomarkerów stresu oksydacyjnego, głównie aktywności enzymów antyoksydacyjnych, stężenia tlenu azotu i peroksydacji lipidów, odnotowano także w zaburzeniach afektywnych, głównie chorobie afektywnej dwubiegunowej, jednak wyniki tych badań były sprzeczne⁽³⁰⁾. Z kolei u pacjentów z dużą depresją (*major depression*) wykazano obniżone stężenie antyoksydantów, zmniejszoną aktywność peroksydazy glutationowej⁽³¹⁾ oraz obserwowano zmiany stężenia kwasów tłuszczowych serii omega-3 w osoczu^(32,33).

Niemniej z przeprowadzonych badań nie wynika, jaki wpływ wywierają różne leki, w tym leki przeciwpsychotyczne, na stres oksydacyjny oraz związane z tym zmiany peroksydacji lipidów, białek i DNA. Nie ma też dostatecznej wiedzy na temat wpływu stosowanych w różnych zaburzeniach psychicznych leków na uwarunkowaną genetycznie zdolność organizmu do obrony antyoksydacyjnej w zakresie takich biomarkerów, jak enzymy antyoksydacyjne czy niskocząsteczkowe antyoksydanty, w tym również tiole. Grupy tiolowe białek pochodzące od cysteiny mogą występować w organizmie jako wolne tiole oraz disulfidy i mieszane disulfidy w połączeniu z niskocząsteczkowymi tiolami: glutationem, cysteiną, homocysteiną i gammaglutamylcysteiną⁽³⁴⁾. Utlenianie i redukcja tioli oraz białkowych disulfidów jest dynamicznym, odwracalnym procesem zachodzącym w warunkach fizjologicznych. Zredukowany stan grup tiolowych występujących w białkach odgrywa ważną rolę w utrzymywaniu prawidłowej struktury i funkcji białka. Jednak nieodwracalne utlenienie tioli w przebiegu stresu oksydacyjnego jest niebezpiecznym procesem, ponieważ oznacza utratę wszystkich biologicznych funkcji zależnych od właściwości grup tiolowych w cząsteczkach białek⁽³⁵⁾.

W naszym badaniu wykazaliśmy, że w wyższym stężeniu (578 ng/ml) amisulpryd w sposób znamieny statystycznie zwiększa stężenie grup tiolowych w osoczu (o około 10%), jednocześnie istotnie zmniejszając poziom peroksydacji lipidów. Wzrost stężenia TBARS stwierdzano u osób chorych na schizofrenię zarówno przed włączeniem leczenia, jak i trakcie stosowania leków przeciwpsychotycznych^(1,2,4-6,8,25). Opisywano także wzrost stężenia

DISCUSSION

Amisulpride – derivative of benzamide – is a drug used in the treatment of schizophrenic patients with described oxidative stress and related lipid peroxidation as well as oxidative and nitrative damages of proteins and DNA, and also various modifications within antioxidative defence biomarkers (antioxidative enzymes or low-molecular antioxidants, including thiols)^(18,19,24,25). Some authors also found in schizophrenic patients a decreased concentration of plasma antioxidants, such as albumin, bilirubin and uric acid^(26,27). Furthermore, in schizophrenic patients the levels of GSH, ascorbic acid and vitamin E were found to be decreased^(28,29). Modifications in oxidative stress biomarkers, mainly activity of antioxidative enzymes, concentration of nitrogen oxide and lipid peroxidation, were also noted in affective disorders, mainly in bipolar disorder, however the results of these studies were contradictory⁽³⁰⁾. On the other hand, in patients with major depression a decreased concentration of antioxidants was found, along with a decreased activity of glutathione peroxidase⁽³¹⁾ and modifications in the concentration of omega-3 fatty acids in plasma^(32,33).

Nevertheless, the studies do not indicate what effects are induced by various drugs, including antipsychotics, on oxidative stress and related changes in peroxidation of lipids, proteins and DNA. Furthermore, there is no sufficient knowledge of the effects of drugs, used in various mental disorders, on the organism's genetically conditioned capability to antioxidative defence within such biomarkers as antioxidative enzymes or low-molecular antioxidants, including thiols. Protein thiol groups coming from cysteine may occur in the organism as free thiols and disulfides and mixed disulfides bounded with low-molecular thiols: glutathione, cysteine, homocysteine and gamma-glutamylcysteine⁽³⁴⁾. Oxidation and reduction of thiols and protein disulfides is a dynamic, reversible process occurring in physiological conditions. Reduced status of thiol groups in proteins plays an important role in the maintenance of the correct structure and function of protein. However, irreversible oxidation of thiols in the course of oxidative stress is a dangerous process, because it means a loss of all biological functions dependent on the properties of thiol groups in protein molecules⁽³⁵⁾.

We indicated in our study that in a higher concentration (578 ng/ml) amisulpride significantly increases the concentration of thiol groups in plasma (by about 10%), simultaneously significantly decreasing the level of lipid peroxidation. An increase in TBARS level was found in schizophrenic patients both before the treatment and during the use of antipsychotics^(1,2,4-6,8,25). In addition, an increase in the level of TBARS (or malondialdehyde – MDA) under the impact of certain antipsychotics in the studies on animal model was described^(11,14,15). Our results of the study carried out *in vitro* indicate that amisulpride,

TBARS (lub dialdehydu malonowego – MDA) pod wpływem niektórych leków przeciwpsychotycznych w badaniach na modelu zwierzęcym^(11,14,15). Nasze wyniki badań, prowadzonych w układzie *in vitro*, wskazują, że amisulpryd w stężeniach odpowiadających dawkom rekomendowanym do leczenia ostrego epizodu schizofrenii po 24-godzinnej inkubacji z osoczem powoduje istotny spadek stężenia TBARS – markera peroksydacji lipidów, co jest zgodne z klinicznymi obserwacjami Kroppa i wsp.⁽¹³⁾ Ponieważ u osób ze schizofrenią dochodzi do wzrostu peroksydacji lipidów i zmniejszenia puli grup tiolowych (SH) w osoczu⁽²⁴⁾, opisany profil działania amisulprydu wydaje się bardzo korzystny w kontekście zastosowania tego leku w leczeniu zaburzeń psychicznych, którym towarzyszy stres oksydacyjny.

WNIOSKI

Amisulpryd w dawkach rekomendowanych do leczenia ostrego epizodu schizofrenii wykazuje działanie antyoksydacyjne, powodując istotny wzrost stężenia wolnych tioli w osoczu i jednocześnie hamując peroksydację lipidów.

PIŚMIENNICTWO

BIBLIOGRAPHY:

- Arvindkshan 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.
- Dietrich-Muszalska A., Kontek B.: Lipid peroxidation in patients with schizophrenia. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2010; 64: 469-475.
- Dietrich-Muszalska A., Olas B.: Isoprostanes as indicators of oxidative stress in schizophrenia. *World J. Biol. Psychiatry* 2009; 10: 27-33.
- Dietrich-Muszalska A., Olas B., Rabe-Jablonska J.: Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. *Platelets* 2005; 16: 386-391.
- 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.
- 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.
- Yao J.K., Reddy R.D., van Kammen D.P.: Oxidative damage and schizophrenia: an overview of the evidence and its therapeutic implications. *CNS Drugs* 2001; 15: 287-310.
- Petronijević N.D., Mičić D.V., Durčić B. i wsp.: Substrate kinetics of erythrocyte membrane Na,K-ATPase and lipid peroxides in schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2003; 27: 431-440.
- Dietrich-Muszalska A., Kontek B., Rabe-Jabłońska J.: Quetiapine, olanzapine and haloperidol affect human plasma lipid peroxidation *in vitro*. *Neuropsychobiology* 2011; 63: 197-201.
- Dietrich-Muszalska A., Kopka J., Kontek B., Kwiatkowska A.: Wpływ stężeń terapeutycznych zyprazydonu na poziom wolnych tioli i związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym w osoczu – badania *in vitro*. *Psychiatr. Psychol. Klin.* 2012; 12: 237-246.
- 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.
- Dakhale G., Khanzode S., Khanzode S. i wsp.: Oxidative damage and schizophrenia: the potential benefit by atypical antipsychotics. *Neuropsychobiology* 2004; 49: 205-209.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dietrich-Muszalska A., Olas B., Glowacki R., Bald E.: Oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and thiols from patients with schizophrenia. *Neuropsychobiology* 2009; 59: 1-7.
- Dietrich-Muszalska A., Olas B.: Modifications of blood platelet proteins of patients with schizophrenia. *Platelets* 2009; 20: 90-96.
- 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.

CONCLUSIONS

Amisulpride in doses recommended for the treatment of acute episode of schizophrenia exhibits antioxidative effects, causing a significant increase in the concentration of free thiols in plasma, simultaneously inhibiting the lipid peroxidation.

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. 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.
25. 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.
26. Yao J.K., Reddy R., van Kammen D.P.: Reduced level of plasma antioxidant uric acid in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 1998; 80: 29-39.
27. Yao J.K., Reddy R., van Kammen D.P.: Abnormal age-related changes of plasma antioxidant proteins in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2000; 97: 137-151.
28. Raffa M., Atig F., Mhalla A. i wsp.: Decreased glutathione levels and impaired antioxidant enzyme activities in drug-naive first-episode schizophrenic patients. *BMC Psychiatry* 2011; 11: 124.
29. Surapaneni K.M.: Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in schizophrenic patients. *J. Clin. Diagn. Res.* 2007; 1: 39-44.
30. Andreatza A.C., Kauer-Sant'Anna M., Frey B.N. i wsp.: Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J. Affect. Disord.* 2008; 111: 135-144.
31. Maes M., Galecki P., Chang Y.S., Berk M.: A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2011; 35: 676-692.
32. Edwards R., Peet M., Shay J., Horrobin D.: Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients. *J. Affect. Disord.* 1998; 48: 149-155.
33. Peet M., Horrobin D.F.: A dose-ranging study of the effects of ethyl-eicosapentaenoate in patients with ongoing depression despite apparently adequate treatment with standard drugs. *Arch. Gen. Psychiatry* 2002; 59: 913-919.
34. Di Simplicio P., Franconi F., Frosali S., Di Giuseppe D.: Thiolation and nitrosation of cysteines in biological fluids and cells. *Amino Acids* 2003; 25: 323-339.
35. Włodek L., Iciek M.: S-tiolacja białek jako mechanizm antyoksydacyjny i regulacyjny. *Postępy Biochem.* 2003; 49: 77-84.