

Anna Dietrich-Muszalska

## Generowanie reaktywnych form tlenu (ROS) przez płytki krwi osób chorych na schizofrenię po stymulacji czynnikiem aktywującym płytki (PAF)

Production of reactive oxygen species by blood platelets in patients with schizophrenia after stimulation with platelet activating factor

Klinika Psychiatryczna Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jolanta Rabe-Jabłońska  
Correspondence to: dr med. A. Dietrich-Muszalska, Klinika Psychiatryczna Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,  
ul. Czechosłowacka 8/10, 92-216 Łódź, tel.: 042 678 36 08, 0691 881 787, faks: (048) 042 675 74 03, e-mail: tzn\_lodz@post.pl  
*Składam podziękowania Pani Prof. dr hab. Barbarze Wachowicz, kierownikowi Katedry Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego za umożliwienie wykonania oznaczeń biochemicznych.*

*I am grateful to Professor Barbara Wachowicz, head of the Dept. Of General Biochemistry of the Medical University in Łódź, who allowed me to perform biochemical assays. The study was funded by Medical University in Łódź; grant numbers: 502-11-692 / 503-1040-2. Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi, numer badań 502-11-692 / 503-1040-2.*

### Streszczenie

W płytkach krwi pacjentów chorych na schizofrenię typu paranoidealnego (wg DSM-IV), w okresie zaostrzenia objawów psychotycznych, i u zdrowych ochotników oznaczono generowanie reaktywnych form tlenu (*reactive oxygen species*, ROS) oraz peroksydację lipidów. Pomiar chemiluminescencji emitowanej przez płytki krwi (stymulowane PAF i niestymulowane) wykonano w automatycznym analizatorze luminescencji Berthold LB 950, według metody opisanej przez Króla i wsp. (1990). Pomiar peroksydacji lipidów w płytkach krwi wykonano, oznaczając stężenie związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) wg metody opisanej przez Rice-Evansa. Ustalono, że u chorych na schizofrenię występuje istotnie wyższe generowanie reaktywnych form tlenu oraz istotnie zwiększone stężenie TBARS niż u osób zdrowych. U chorych na schizofrenię różnica w chemiluminescencji emitowanej przez płytki, po stymulacji PAF, w odniesieniu do chemiluminescencji płytek w grupie osób zdrowych była istotnie różna ( $p=0,03$ ). Wyniki tego badania wskazują, że u osób ze schizofrenią, w okresie zaostrzenia objawów psychotycznych, w płytkach krwi występuje zwiększone generowanie ROS, prowadzące do stresu oksydacyjnego, oraz zmieniona reaktywność w odpowiedzi na stymulację PAF. Zmieniona reaktywność płytek krwi po stymulacji PAF u osób chorych na schizofrenię może wynikać zarówno ze zmian aktywności płytkowego receptora PAF (desensytyzacja), jak i receptora NMDA (pobudzenie) oraz zaburzenia aktywacji płytek krwi na drodze wtórnych przemian związanych ze stresem oksydacyjnym.

**Słowa kluczowe:** schizofrenia, czynnik aktywujący płytki krwi (PAF), reaktywne formy tlenu (ROS), stres oksydacyjny

### Summary

Generation of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation in blood platelets were determined in patients with paranoid schizophrenia (acc. to DSM-IV) during exacerbation of psychotic symptoms and in healthy volunteers. Measurements of chemiluminescence emitted by blood platelets (PAF-stimulated and non-stimulated) were performed in an automatic luminescence analyzer (Berthold LB 950)

according to the method described by Król et al. (1990). Measurements of lipid peroxidation in blood platelets was performed by measuring the concentration of thobarbituric acid-reactive substances (TBARS) according to the method described by Rice-Evans. Our results suggest, that persons with schizophrenia exhibit a significantly higher production of reactive oxygen species and a significantly higher level of TBARS than in healthy persons. There was a significant difference between PAF-stimulated platelet chemiluminescence in patients with schizophrenia as compared with healthy persons ( $p=0.03$ ). The results of this study suggest, that persons with schizophrenia during exacerbation of psychotic symptoms experience an increased production of reactive oxygen species, leading to greater oxidative stress and an altered response to PAF stimulation. In patients with schizophrenia, altered platelet response to PAF stimulation may be due to the changes of the platelet PAF receptor activity (desensitization), to an altered NMDA receptor (stimulation) and to a disturbed platelet activation mediated by secondary events associated with oxidative stress.

**Key words:** schizophrenia, platelet activating factor (PAF), reactive oxygen species (ROS), oxidative stress

## WSTĘP

Przyczyny schizofrenii nie są w pełni poznane. Psychoza ta charakteryzuje się różnymi obrazami klinicznymi i przebiegiem najczęściej przewlekłym, nawracającym. Poszukiwania czynników etiopatogenetycznych i biochemicznych markerów obwodowych odzwierciedlających specyficzne zaburzenia występujące w tej chorobie mają istotne znaczenie kliniczne dla jej lepszej diagnozy, oceny przebiegu i rokowania. Coraz więcej dowodów wskazuje, że stres oksydacyjny może być zaangażowany w patofizjologię schizofrenii, a dysfunkcja neuronów może wynikać m.in. z uszkodzeń błony komórkowej wywołanych przez peroksydację, zwłaszcza zestryfikowanych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (*essential polyunsaturated fatty acids*, EPUFAs)<sup>(1,2)</sup>. Uszkodzenie peroksydacyjne neuronów może wiązać się zarówno ze wzrostem w tkankach poziomu reaktywnych form tlenu (ROS), takich jak anionorodnik ( $O_2^{\cdot-}$ ), rodnik hydroksylowy ( $OH\cdot$ ), tlenek azotu ( $NO\cdot$ ) i innych, jak i zaburzeń systemu obrony antyoksydacyjnej organizmu<sup>(1,3,4)</sup>. Uszkodzenia te mogą wpływać na funkcję neuronów, tj. na transport błonowy, utratę wytwarzania energii w mitochondriach, ekspresję genów, i w ten sposób na zależną od fosfolipidów transdukcję sygnału przy udziale receptorów, co może wyjaśniać występujące w schizofrenii zaburzenia neuroprzebieżności<sup>(1,3)</sup>. Hipotezy dotyczące etiopatogenezy schizofrenii, na których opierają się współczesne metody leczenia tej choroby, dotyczą zaburzeń funkcji różnych układów neuroprzebieżności w mózgu. Najczęściej są to koncepcje zaburzeń wieloprzebieżnikowych, polegające na różnych interakcjach w zakresie przewodzenia impulsów nerwowych<sup>(5-7)</sup>. W piśmiennictwie w kontekście stresu oksydacyjnego zwraca się uwagę na dużą rolę przebieżności glutaminianergicznego i jego interakcji z układem dopaminergicznym<sup>(8,9)</sup>. Układ glutaminianergiczny i receptor glutaminianergiczny NMDA (N-metylo-D-asparaginian), najwrażliwszy receptor

## INTRODUCTION

Causes of schizophrenia are still poorly understood. This psychosis being characterized by very variable clinical symptoms and its course is usually chronic and with relapses. Search for etiopathogenetic factors and biochemical peripheral markers reflecting specific metabolic alterations associated with this disease, has a fundamental clinical significance for a more reliable diagnosis, assessment of clinical course and prognosis. An increasing body of evidence indicates, that oxidative stress may be involved in pathophysiology of this disease, while neuronal dysfunction may be a result of peroxidation-mediated membrane damage, particularly of estrified essential polyunsaturated fatty acids (EPUFAs)<sup>(1,2)</sup>. Oxidative damage of neurons may be associated with both increased level of ROS in tissues (e.g. anion radical  $O_2^{\cdot-}$ , hydroxyl radical  $OH\cdot$  and nitrogen oxide  $NO\cdot$ ) and disruption of host's system of anti-oxidative defense<sup>(1,3,4)</sup>. These alterations may influence neuronal function, i.e. membrane transport, decreased mitochondrial energy production, gene expression and thereby – on receptor-mediated, phospholipid-dependent signal transduction. This may explain disturbed neurotransmission seen in schizophrenia<sup>(1,3)</sup>. Hypotheses concerning etiopathogenesis of schizophrenia, being a basis for contemporary methods of treatment of the disease, are related to dysfunction of several neurotransmitter systems in the brain. Most often, these hypotheses assume the existence of multi-system disorders, relying on various interactions in the field of transmission of neural stimuli<sup>(5-7)</sup>. In the context of oxidative stress, authors emphasize an important role of glutaminergic transmission and its interactions with dopaminergic system<sup>(8,9)</sup>. The glutaminergic system and glutaminergic receptor NMDA (N-methyl-D-aspartate), the receptor most sensitive for oxidative damage, play an important role in many processes contributing to schizophrenia, including nerve cell differentiation, growth of

mózgu na uszkodzenia oksydacyjne, odgrywają istotną rolę w wielu procesach zaangażowanych w schizofrenii, między innymi w różnicowaniu komórek nerwowych, wzroście neuronów i rozwoju sieci połączeń między nimi. Nadmierna aktywność glutaminianergiczna może również prowadzić do apoptozy i zniszczenia neuronów<sup>(9,10)</sup>. Na zaburzenia tych procesów może wpływać uszkodzenie oksydacyjne błony komórkowej neuronu powstające, jak przypuszczają niektórzy autorzy, w wyniku nadmiernego generowania wolnych rodników i ROS<sup>(1,4,10)</sup>. W schizofrenii może odgrywać rolę ekscytacyjność glutaminianu<sup>(10)</sup>, a glutaminian i jego pochodne mogą wywierać szkodliwe działanie w synapsach nerwowych poprzez indukowanie powstania wolnych rodników, m.in. podczas różnych reakcji enzymatycznych wynikających z nadmiernej stymulacji przez nadmiar glutaminianu receptorów postsynaptycznych: NMDA i AMPA (kwas  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy)<sup>(10)</sup>. Wpływ toksyczny glutaminianu w połączeniu z wolnymi rodnikami może być dodatkowo nasilony przez uszkodzenie drogi wychwytywania wolnych rodników na poziomie presynaptycznym oraz w wyniku złe funkcjonującego systemu antyoksydacyjnego<sup>(11)</sup>. Sugeruje się, że zmieniona funkcja układu glutaminianergicznego i adrenergicznego w schizofrenii przyczynia się do wzrostu produkcji tlenku azotu (NO)<sup>(12,13)</sup>. Tlenek azotu w warunkach fizjologicznych odgrywa rolę między innymi w modulowaniu synaptycznym, przy współdziałaniu glutaminianu, ale może również wywierać efekt uszkażdający w wyniku reakcji z anionorodnikiem przez utworzenie nadtlenoazotynu (ONOO<sup>-</sup>), który jest silnym utleniaczem i źródłem rodnika hydroksylowego<sup>(12)</sup>. W funkcji receptora NMDA jest włączony również czynnik aktywujący płytki (*platelet activating factor*, PAF), który pobudza neuroprzeżywalność wywołane przez receptor NMDA<sup>(14,15)</sup>. PAF (1-O-alkil-2-acetylo-sn-glicerylo-3-fosfocholina) pobudza płytki krwi poprzez działanie na specyficzne receptory znajdujące się na powierzchni błony komórkowej, odpowiadające na PAF, powodując zmiany prowadzące do ich aktywacji<sup>(5,16)</sup>. Obecnie sugeruje się, że zmiany w metabolizmie PAF mogą odgrywać rolę w etiologii schizofrenii w związku z występowaniem wyższego stężenia PAF u osób chorujących na tę psychozę<sup>(17,18)</sup>. Bell i wsp. (1997) zasugerowali, że gen acetylohydrolazy PAF (PAFAH) może być genem kandydującym, biorącym udział w rozwoju schizofrenii, ze względu na jego lokalizację chromosomalną i rolę PAF w aktywacji przewodzenia w obrębie receptora NMDA oraz rozwoju sieci neuronów<sup>(19,20)</sup>. Sugeruje się też, że u osób chorych na schizofrenię płytkowy receptor NMDA jest nadwrażliwy<sup>(21,22)</sup>. Ponieważ zmiany stężenia czynnika aktywującego płytki krwi PAF mogą wywierać wpływ na funkcje płytek krwi poprzez działanie na określone receptory płytkowe (PAF lub płytkowe receptory NMDA) w tym badaniu podjęto między innymi próbę oceny generowania ROS w płytkach stymulowanych PAF.

neurons and development of a network of connections between the neurons. Excessive glutaminergic activity may also lead to apoptosis and destruction of neurons<sup>(9,10)</sup>. Disruption of these processes may be influenced by oxidative damage of neuronal cell membrane, resulting from excessive generation of free radicals and ROS, as some authors suppose<sup>(1,4,10)</sup>. Excitotoxicity of glutamate may play a role in schizophrenia<sup>(10)</sup>, while glutamate itself and its derivatives may exert a deleterious effect in neural synapses by inducing production of free radicals during various enzymatic reactions, resulting of excessive stimulation of postsynaptic receptors (NMDA and AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-izoxazolopropionic acid) by excess of glutamate<sup>(10)</sup>. Toxic influence of glutamate combined with free radicals may be further enhanced by disruption of free radical scavenging mechanisms at presynaptic level, as well as due to ill-functioning antioxidative system<sup>(11)</sup>. Authors suggest, that altered function of glutaminergic and adrenergic systems in schizophrenia contribute to an increased production of nitrogen oxide (NO)<sup>(12,13)</sup>. In physiological conditions, nitrogen oxide together with glutamate play a role in synaptic modulation, but it may also exert an deleterious effect by reacting with superoxide anion radicals to produce peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), a particularly strong oxidant and a source of hydroxyl radical<sup>(12)</sup>. Functions of the NMDA receptor are mediated by platelet activating factor (PAF), which enhances neurotransmission resulting of NMDA stimulation<sup>(14,15)</sup>. PAF (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholin) stimulates blood platelets by acting on specific receptors located on the surface of cell membrane, which respond to PAF by inducing alterations leading to their activation<sup>(5,16)</sup>. Current findings (e.g. higher PAF levels in patients with schizophrenia) indicate that altered PAF metabolism may play a role in the aetiology of this disorder<sup>(17,18)</sup>. Bell et al. (1997) suggested, that the PAF acetylhydrolase (PAFAH) gene may be a candidate gene, participating in the development of schizophrenia, due to its chromosomal location and the role of PAF in activation of transmission mediated by the NMDA receptor and in the development of neuronal network<sup>(19,20)</sup>. It is also suggested that in patients with schizophrenia platelet receptor NMDA is overly sensitive<sup>(21,22)</sup>. As alterations of serum PAF level may influence the function of blood platelets by acting on specific platelet receptors (PAF receptors or platelet NMDA receptor), in this study we tried to assess production of ROS in PAF-stimulated platelets.

## AIM OF PAPER

The aim of this paper was to determine, if blood platelets of persons with schizophrenia do generate more reactive oxygen species (ROS) as measured by chemiluminescence, to assess lipid peroxidation as measured by the

**CEL PRACY**

Celem pracy było ustalenie, czy w płytkach krwi osób chorych na schizofrenię występuje zwiększone generowanie reaktywnych form tlenu (ROS), mierzone za pomocą chemiluminescencji, oraz peroksydacja lipidów, mierzona przez oznaczenia stężenia TBARS, a także ocena zmian w reaktywności płytek krwi osób chorych na schizofrenię, stymulowanych czynnikiem aktywującym płytki (PAF).

**MATERIAŁ I METODY*****BADANE GRUPY OSÓB***

Krew do badania pobrano od 38 pacjentów (20 mężczyzn i 18 kobiet) w wieku 18-36 lat (średnio  $31 \pm 4,8$  lata), z rozpoznaną schizofrenią typu paranoidalnego wg DSM-IV, w okresie zaostrzenia objawów psychiatrycznych, oraz od 38 zdrowych ochotników (studentów i pracowników Uniwersytetu Medycznego w Łodzi), odpowiednio dobranych pod względem wieku i płci.

Średni czas choroby u pacjentów ze schizofrenią wynosił 4 lata, wszyscy byli leczeni lekami przeciwpsychotycznymi drugiej generacji (LPIIG), takimi jak risperidon, kwetiapina, olanzapina. Badaniem objęto chorych hospitalizowanych w I i II Klinice Psychiatrycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Wszyscy badani wyrazili pisemną zgodę na uczestnictwo w badaniu, zgodnie z protokołem zaakceptowanym przez Komisję Bioetyczną UM w Łodzi (RNN/899/2000).

***KRYTERIA DOBORU  
BADANYCH OSÓB***

Przyjęto następujące kryteria wykluczające z udziału w badaniu:

- występowanie jakichkolwiek chorób somatycznych (zwłaszcza chorób układu krążenia, zaburzeń gospodarki lipidowej i cukrzycy), otyłości, niedożywienia i urazów czaszkowo-mózgowych oraz skłonności do alergii (atopii);
- występowanie chorób psychicznych u badanych i w ich rodzinach;
- stosowanie leków przeciwplatek (w ciągu ostatnich dwóch tygodni poprzedzających pobranie krwi) oraz innych leków wpływających na zmiany reaktywności płytek krwi;
- przyjmowanie psychoaktywnych substancji uzależniających (nadużywanie alkoholu, palenie papierosów i używanie innych substancji psychoaktywnych);
- brak diety zrównoważonej, suplementacja antyoksydantami;

Dodatkowo u osób ze schizofrenią:

- przyjmowanie innych leków psychotropowych;

TBARS level and to evaluate alterations of platelet reactivity upon stimulation with PAF.

**MATERIAL AND METHOD*****SUBJECTS***

Blood samples for subsequent analyses were obtained from 38 patients (20 males, 18 females) aged from 18 to 36 y. (mean age  $31 \pm 4.8$  y) with a diagnosis of schizophrenia of the paranoid type according to the DSM-IV criteria in the period of exacerbation of psychotic symptoms, and from 38 healthy volunteers (students and employees of the Medical University in Łódź) well matched for age and gender.

Mean duration of schizophrenia in the study group was 4 years and all patients have been treated using 2<sup>nd</sup> generation antipsychotic drugs, such as risperidone, quetiapine and olanzapine. The study included patients treated at the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> Department of Psychiatry of the Lodz Medical University. All patients expressed written informed consent to participate in the trial, according to the protocol approved by Bioethical Committee of the Medical University in Lodz (RNN/899/2000).

***INCLUSION AND EXCLUSION  
CRITERIA***

The following exclusion criteria have been adopted:

- coexistence of any somatic diseases (particularly cardiovascular diseases, disorders of lipid metabolism and diabetes), obesity, malnutrition, craniocerebral trauma and susceptibility to allergic reactions;
- a history of mental diseases in patients and their families;
- use of antiplatelet drugs during the two weeks preceding blood sampling and other preparations, which might alter platelet reactivity;
- use of psychoactive addictive substances (alcohol, tobacco, other psychoactive substances);
- lack of balanced diet, supplementation with antioxidants;

And additionally in persons with schizophrenia:

- use of other psychotropic drugs;
- presence of extrapyramidal symptoms, dystonia, akathisia, tardive dyskinesias and psychomotor agitation.

All patients had a similar socio-economic background.

***METHODS***

History concerning the above-mentioned inclusion criteria:

- 1) Medical history was obtained using a structured questionnaire, concerning mental status, physical condition, past diseases, nutritional habits and use of psychoactive substances;

- występowanie objawów pozapiramidowych, dystonii, akatyzji, późnej dyskinezy oraz pobudzenia psychoruchowego.

Wszyscy badani wywodzili się ze środowisk o podobnym statusie socjalnym.

### **METODY**

Wywiad dotyczący kryteriów ww. doboru do badania:

- 1) Przeprowadzono wywiady medyczne za pomocą ustrukturalizowanego kwestionariusza dotyczącego stanu zdrowia psychicznego i fizycznego, przebytych chorób oraz nawyków żywieniowych i używania substancji psychoaktywnych;
- 2) Badanie psychiatryczne MINI – Mini International Neuropsychiatric Interview<sup>(23)</sup>;
- 3) Badanie neurologiczne i stanu somatycznego;
- 4) Badania laboratoryjne: panel lipidowy (cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglicerydy), stężenie glukozy na czczo, morfologia krwi wraz z liczbą płytek krwi;
- 5) Obliczenie BMI wg wzoru ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ).

### **WARUNKI POBIERANIA KRWI**

Krew ( $18 \text{ cm}^3$ ) pobierano od osób chorych na schizofrenię i zdrowych ochotników, z żyły przedramiennej, zawsze w tych samych warunkach, rano, na czczo, między 8.00 a 8.30. Do oznaczeń ROS krew pobierano na 1% roztwór EDTA, a do oznaczeń TBARS na roztwór ACD (kwas cytrynowy; cytrynian; glukoza; 5:1, v/v). Czynniki aktywujące płytki (PAF), kwas tiobarbiturowy (TBA) i kwas trichlorooctowy (TCA) zakupiono w Sigma-Aldrich.

### **IZOLOWANIE PŁYTEK KRWI**

Osocze bogatopłytkowe (PRP) otrzymano poprzez wirowanie świeżo pobranej ludzkiej krwi  $250 \times g$  przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Płytki krwi uzyskano poprzez wirowanie  $500 \times g$  przez 10 minut w temperaturze pokojowej, osad płytek przemywano dwukrotnie buforem Tyrode'a zawierającym 10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM glukozy, pH 7,4. Liczbę płytek w zawieszynie buforu Tyrode'a obliczano spektrofotometrycznie, mierząc absorbancję przy  $\lambda=800 \text{ nm}$  w spektrofotometrze SEMCO<sup>(24)</sup>. Zawieszinę płytek krwi o stężeniu  $5 \times 10^8/\text{ml}$  inkubowano z PAF ( $10^{-9} \text{ M}$ ) przez 2 minuty w  $37^\circ\text{C}$ . W płytkach krwi stymulowanych PAF i niestymulowanych mierzono poziom ROS metodą chemiluminescencji. Preparatykę płytek krwi prowadzono w plastikowych probówkach.

- 2) Psychiatric examination, the MINI battery (Mini International Neuropsychiatric Interview)<sup>(23)</sup>;
- 3) Neurological and general physical examination;
- 4) Laboratory tests: lipid profile (total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides), fasting plasma glucose, blood count including platelets;
- 5) BMI according to standard formula ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ).

### **BLOOD SAMPLING CONDITIONS**

$18 \text{ cm}^3$  of blood was obtained by puncture of an antecubital vein, always in the same conditions (fasting, between 8:00 and 8:30 a.m.). To determine ROS, blood was mixed with 1% EDTA, while for TBARS assay – with standard ACD solution (citric acid, citrate, glucose; 5:1; v/v). Platelet activating factor, thiobarbituric acid and trichloroacetic acid have been purchased at the Sigma-Aldrich company.

### **ISOLATION OF BLOOD PLATELETS**

Platelet-rich plasma was obtained by centrifugation of fresh human blood at  $250 \times g$  for 10 minutes at room temperature. Platelets were isolated by centrifugation at  $500 \times g$  for 10 minutes at room temperature; platelet pellet was rinsed twice with Tyrode buffer, composed of Hepes 10 mM, NaCl 140 mM, KCl 3 mM,  $\text{MgCl}_2$  0,5 mM,  $\text{NaHCO}_3$  5 mM, glucose 10 mM, at pH 7.4. Platelet number in the Tyrode buffer was determined spectrophotometrically, by measuring absorbance at  $\lambda=800 \text{ nm}$  (SEMCO spectrophotometer)<sup>(24)</sup>. Platelet suspension at a concentration of  $5 \times 10^8/\text{ml}$  was incubated with PAF ( $10^{-9} \text{ M}$ ) for 2 minutes at  $37^\circ\text{C}$ . ROS level was measured in stimulated and in non-stimulated platelets using the chemiluminescence technique. Platelet preparation was carried out in plastic test tubes only.

### **DETERMINATION OF CONCENTRATION OF TBARS<sup>(25)</sup>**

After incubation for a defined time, 0.5 ml of suspension of blood platelets (PAF-stimulated and non-PAF-stimulated) was added to 0.5 ml 15% TCA in 0.25 M HCl and 0.5 ml 0.37% TBA in 0.25 M HCl. Samples were mixed and heated in boiling water-bath for 10 minutes. Next, platelet suspension was centrifuged for 15 minutes (centrifuge 8000 rev/min; SIGMA 3K30). Absorbance of supernatant was determined in a SEMCO spectrophotometer, at a wavelength  $\lambda=535 \text{ nm}$  in a 1 cm-thick cuvette. Concentration of TBARS was calculated based on absorbance value, using molar absorption coefficient ( $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ )<sup>(26)</sup>. TBARS values were expressed as concentration in nmol/ml. All tests were performed in duplicate.

### **OZNACZANIE STĘŻENIA ZWIĄZKÓW REAGUJĄCYCH Z KWASEM TIOBARBITUROWYM (TBARS)<sup>(25)</sup>**

Do 0,5 ml zawiesiny płytek krwi (niestymulowanych lub stymulowanych PAF), po inkubacji w określonym czasie, wprowadzano 0,5 ml 15% TCA w 0,25 M HCl i 0,5 ml 0,37% TBA w 0,25 M HCl. Próby mieszano i ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej przez 10 minut. Następnie zawiesinę płytek odwirowywano przez 15 minut (8000 obr./min, wirówka SIGMA 3K30). Absorbancję supernatantu oznaczano w spektrofotometrze SEMCO przy długości fali  $\lambda=535$  nm, w kuwecie o grubości warstwy 1 cm. Stężenie TBARS obliczano na podstawie wartości absorbancji, korzystając z molowego współczynnika absorpcji ( $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ )<sup>(26)</sup>. Wartości TBARS zostały wyrażone w postaci stężenia w nmol/ml. Wszystkie badania wykonano w dwukrotnych powtórzeniach.

### **OZNACZENIE POZIOMU REAKTYWNYCH FORM TLENU METODĄ CHEMILUMINESCENCJI<sup>(27)</sup>**

Do 1 ml zawiesiny płytek krwi wprowadzano 20  $\mu\text{l}$  2 mM luminolu w buforowanej soli fizjologicznej. Pomiar chemiluminescencji przeprowadzano w ciągu 5 minut w analizatorze luminescencji typu Berthold LB 950 (rejestrowano całkowitą chemiluminescencję). Wartości chemiluminescencji wyrażano jako całkowitą liczbę impulsów chemiluminescencji.

### **ANALIZA STATYSTYCZNA**

W celu wyeliminowania wyników skrajnych wykonano test Grubbsa. Istotność statystyczną w generowaniu ROS i stężeniu TBARS w płytkach krwi grupy osób zdrowych i chorych na schizofrenię obliczono za pomocą testu U Manna-Whitneya. Wszystkie wartości były wyrażone jako średnia  $\pm$  SEM. Wartości generowania ROS w badanych grupach obliczono dla płytek stymulowanych i niestymulowanych PAF. Istotność różnic w emisji chemiluminescencji przez płytki krwi (stymulowane i niestymulowane) między badanymi grupami osób chorych i zdrowych obliczono za pomocą testu U Manna-Whitneya. Obliczenia wykonano za pomocą programu Statistica 6.0, firmy StatSoft Inc.

### **WYNIKI**

W płytkach krwi pacjentów chorych na schizofrenię wykazano istotnie wyższe generowanie reaktywnych form tlenu (mierzone za pomocą emisji chemiluminescencji) niż w płytkach osób zdrowych,  $p=0,01$  (rys. 1). W płytkach osób chorych na schizofrenię występowało również istotnie wyższe stężenie TBARS niż w płytkach

### **MEASUREMENT OF REACTIVE OXYGEN SPECIES BY CHEMILUMINESCENCE ASSAY<sup>(27)</sup>**

20  $\mu\text{l}$  of 2 mM luminol in buffered physiologic saline was added to 1 ml of platelet suspension. Chemiluminescence was measured during 5 minutes in luminescence analyzer (Berthold LB 950), whereby total chemiluminescence was recorded. Chemiluminescence value was expressed as total number of luminescence impulses.

### **STATISTICAL ANALYSIS**

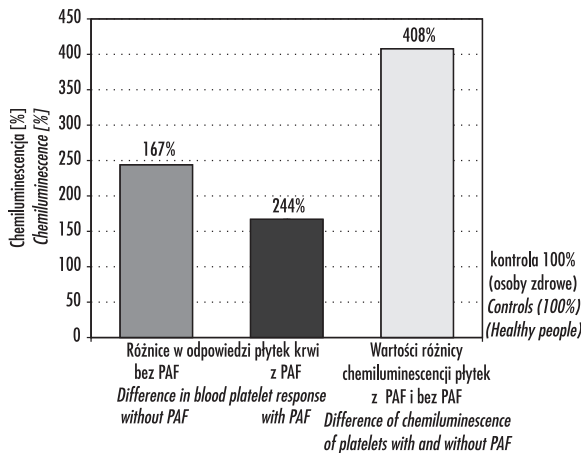
The Grubbs' test was performed in order to eliminate extreme results. Statistical significance in assessing ROS production and TBARS concentration in blood platelets in persons with schizophrenia and in healthy controls was calculated using the Mann-Whitney U-test. All calculated values were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). Intensity of ROS production in the study population was calculated for PAF-stimulated and non-PAF-stimulated platelets. Significance of difference in chemiluminescence emission by blood platelets (both stimulated and non-stimulated) between patients and healthy controls was calculated using the Mann-Whitney U-test. Calculations were performed using the Statistica v. 6.0 software (StatSoft Inc.).

### **RESULTS**

Blood platelets of patients with schizophrenia showed a significantly higher production of reactive oxygen species (measured by chemiluminescence emission) than in healthy controls ( $p=0.01$ ) (fig. 1). Blood platelets of persons with schizophrenia showed also significantly higher level of TBARS than platelets of healthy controls,  $p=2.27 \times 10^{-6}$  (fig. 2). After stimulation of platelets with PAF, changes of chemiluminescence were noticed as compared with non-stimulated platelets in both study groups. In the group of persons with schizophrenia, chemiluminescence values in PAF-stimulated blood platelets as compared with non-stimulated platelets were significantly different than in healthy controls,  $p=0.03$ . Response of blood platelets to PAF-stimulation in persons with schizophrenia vs. healthy controls as expressed by ROS production was equivalent to 408% and 100%, respectively. In the group of patients with schizophrenia, ROS production after PAF stimulation was 4-fold lower to that seen in healthy controls. This result may suggest an altered reactivity of blood platelets in patients with schizophrenia to PAF-stimulation as compared with responsiveness of platelets of healthy people.

### **DISCUSSION**

Until now, there is no generally accepted method of determination of free radical and reactive oxygen species



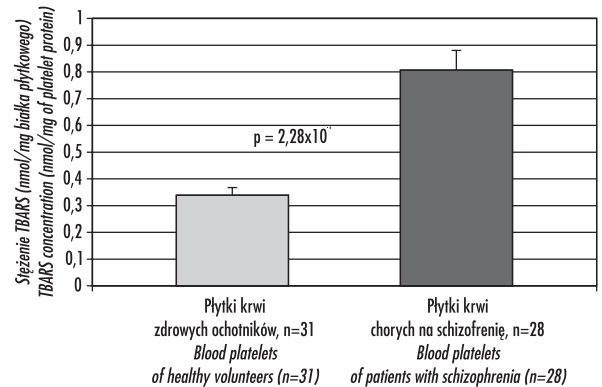
Rys. 1. Chemiluminescencja jako wskaźnik generowania ROS w płytkach osób zdrowych i chorych na schizofrenię. Wyniki wyrażono jako  $\bar{x} \pm SEM$

Fig. 1. Chemiluminescence as an indicator of ROS generation in blood platelets of healthy persons and of persons with schizophrenia. Results expressed as mean  $\bar{x} \pm SEM$

osób zdrowych,  $p=2,27 \times 10^{-6}$  (rys. 2). Po stymulacji płytek krwi czynnikiem PAF zaobserwowano w obu badanych grupach zmiany w emisji chemiluminescencji w odniesieniu do płytek niestymulowanych. Wartości chemiluminescencji płytek krwi stymulowanych PAF w porównaniu z płytkami niestymulowanymi PAF w grupie osób chorych na schizofrenię i grupie zdrowych ochotników były istotnie różne,  $p=0,03$ . Odpowiedź płytek krwi na stymulację PAF, wyrażana generowaniem ROS, w grupie osób chorych na schizofrenię wynosiła 408% w odniesieniu do grupy kontrolnej (osób zdrowych) przyjętej za 100%. Generowanie ROS w grupie osób ze schizofrenią po stymulacji PAF było czterokrotnie mniejsze niż w grupie osób zdrowych. Ten wynik świadczy o zmienionej reaktywności płytek krwi osób chorych na schizofrenię, w odpowiedzi na działanie agonistą PAF, w porównaniu z odpowiedzią płytek osób zdrowych.

## DYSKUSJA

Dotychczas nie ustalono metody oznaczania generowania wolnych rodników lub reaktywnych form tlenu w neuronach. Generowanie wolnych rodników można oznaczać w płytkach krwi, które uważa się za obwodowy model do oznaczeń niektórych przemian biochemicznych zachodzących w neuronach ze względu na ich podobieństwo do płytek krwi, w zakresie posiadania wspólnych receptorów i układów wtórnych przekaźników, a także innych cech morfologicznych i biochemicznych<sup>(28-31)</sup>. Indukowane przez ROS uszkodzenia peroksydacyjne błony komórkowej dotyczą utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, czyli fosfolipidów, których struktura i rozmieszczenie w błonach



Rys. 2. Stężenie TBARS w płytkach osób zdrowych i chorych na schizofrenię. Wyniki wyrażono jako  $\bar{x} \pm SEM$

Fig. 2. TBARS concentration in blood platelets of healthy persons and of persons with schizophrenia. Results expressed as mean  $\bar{x} \pm SEM$

production in neurons. The generation of free radicals may be measured in blood platelets, which are considered a good peripheral model for assessment of some biochemical processes taking part in neurons, due to their similarity to blood platelets in view of common receptors and second messenger systems, as well as other morphological and biochemical features<sup>(28-31)</sup>. Peroxidative damage to cell membrane, induced by ROS, relies in oxidation of polyunsaturated fatty acids, i.e. phospholipids, whose structure and distribution on cell membranes of neurons and blood platelets is similar<sup>(32)</sup>. Therefore, blood platelets may be considered a good peripheral model for assessment of generation of ROS and for studying oxidative damage. Oxidative stress in blood platelets is associated with their activation, i.e. starting the cascade of transformations of arachidonic acid, leading to increased production of one component of the cascade – malonyl dialdehyde – considered one of platelet markers of the peroxidation of phospholipids of platelet membrane, which may be determined in a reaction with thiobarbituric acid<sup>(33,34)</sup>. This reaction enables to determine products of peroxidation of lipids of cell membrane too, resulting from of activity of free radicals, not associated with arachidonic acid cascade<sup>(34)</sup>. Elevated concentration of TBARS is an indicator of increased lipid peroxidation, arguing for ongoing oxidative stress. This study revealed a significant increase of TBARS level in patients with schizophrenia, with concomitant increase of ROS generation in blood platelets, indicating severe oxidative stress in these persons. These results are concordant with other authors' studies, supporting the presence of indicators of oxidative stress in various cells and fluids of the body, e.g. erythrocytes, cerebrospinal fluid, urine and serum<sup>(35-39)</sup>. ROS may arise in blood platelets as a result of several other metabolic processes, during activation of NADPH oxidase, xanthine oxidase and nitrogen oxide synthase, as well as during stimulation of platelets by agonists<sup>(40,41)</sup>.

komórkowych neuronów i płytek krwi są podobne<sup>(32)</sup>. Tak więc płytki krwi można uznać za dobry obwodowy model do oznaczania generowania ROS i badania uszkodzeń peroksydacyjnych. Stres oksydacyjny w płytkach krwi jest związany z ich pobudzeniem, a więc uruchomieniem kaskady przemian kwasu arachidonowego, z powstawaniem m.in. zwiększonej ilości jednego ze składników tej kaskady, dialdehydu malonowego uznanego za jeden z płytkowych markerów poziomu peroksydacji fosfolipidów błony płytkowej, który może być oznaczany w reakcji z kwasem tiobarbiturowym<sup>(33,34)</sup>. W tej reakcji mogą też być oznaczane produkty peroksydacji lipidów błony komórkowej powstające w wyniku działania wolnych rodników, niezwiązane z kaskadą przemian kwasu arachidonowego<sup>(34)</sup>. Zwiększone stężenie związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) jest wykładnikiem zwiększonej peroksydacji lipidów, świadczącym o stresie oksydacyjnym. W badaniu przedstawionym w pracy stwierdzono istotnie zwiększone stężenie TBARS u chorych na schizofrenię i jednocześnie zwiększoną generację ROS w płytkach krwi, co wskazuje na zwiększony stres oksydacyjny u tych osób. Wyniki te są zgodne z badaniami innych autorów, zwracającymi uwagę na występowanie u chorych na schizofrenię różnych wskaźników stresu oksydacyjnego w różnych komórkach i płynach ciała, np. erytrocytach, płynie mózgowo-rdzeniowym, moczu czy osoczu<sup>(35-39)</sup>. ROS mogą powstawać w płytkach krwi również w kilku innych przemianach metabolicznych, w czasie aktywacji oksydazy NADPH, oksydazy ksantynowej i syntazy tlenu azotu, również w czasie stymulacji płytek agonistami<sup>(40,41)</sup>. Potencjalnym źródłem ROS w płytkach krwi stymulowanych agonistami mogą być procesy związane z metabolizmem kwasu arachidonowego, przy udziale cyklooksygenazy lub 12-lipooksygenazy, a także przemian fosfoinozytolu i cyklu glutationowego<sup>(41,42)</sup>. PAF jest silnym agonistą płytek krwi, który działa poprzez specyficzne receptory na powierzchni błony odpowiadające na PAF, stymulując hydrolizę arachidonianu z fosfolipidów i inicjując syntezę eikozanoidów. Wpływa również na aktywację kinazy białkowej C i fosfolipazy C, uruchamiając przemiany prowadzące do aktywacji płytek krwi (generowania ROS)<sup>(43)</sup>. Stymulacja receptora PAF w komórce powoduje modulowanie poziomu  $Ca^{2+}$ , który z kolei aktywuje enzymy, takie jak syntaza tlenu azotu, kalpaina, wpływa też na transkrypcję genów. W przeprowadzonych badaniach ustalono, że u chorych na schizofrenię, obok zwiększonego generowania ROS w płytkach i wyższego stężenia TBARS, występuje ich zmieniona reaktywność po stymulacji PAF. Stwierdzono, że odpowiedź płytek krwi na stymulację PAF w odniesieniu do odpowiedzi płytek niepobudzanych agonistą u chorych na schizofrenię jest czterokrotnie mniejsza niż w grupie osób zdrowych. Ponieważ wrażliwość na PAF w badanej grupie osób chorych na schizofrenię jest inna niż u osób zdrowych, może to sugerować związek ze zmianami stężenia en-

A potential source of ROS in agonist-stimulated blood platelets may be processes associated with arachidonic acid metabolism in the presence of cyclooxygenase or 12-lipooxygenase, as well as the metabolism of phosphoinositol and the glutathione cycle<sup>(41,42)</sup>. PAF is strong agonist of platelets, acting by specific receptors on membrane surface, which on contact with PAF stimulate hydrolysis of arachidonic acid from phospholipids and initiates the synthesis of eicosanoids, as well as influences activation of protein kinase C and phospholipase C, starting a sequence of transformations leading to activation of platelets and generation of ROS<sup>(43)</sup>. Stimulation of cellular PAF receptor results in modulation of  $Ca^{2+}$  level, which in turn activates such enzymes as nitrogen oxide synthase, calpain and influences gene transcription. Our study revealed, that in patients with schizophrenia, besides an increased production of ROS in platelets and higher level of TBARS, there is also an altered reactivity to PAF stimulation. It was noticed, that platelet response to PAF stimulation, as compared with response of platelets non-stimulated by an agonist, in patients with schizophrenia is four-fold lower than in healthy controls. As sensitivity to PAF in the group of patients with schizophrenia studied is different than in healthy people, this may suggest an association between schizophrenia and altered level of endogenous PAF and/or altered reactivity of platelet receptor to PAF and/or platelet receptor to NMDA. Berk and Plein demonstrated that blood platelets from patients with schizophrenia have a lower calcium content and their response to glutamate is increased<sup>(21,22)</sup>. Furthermore, Teather et al. demonstrated that PAF may enhance the activity of cerebral NMDA receptor as a result of previous release of glutamate<sup>(14)</sup>. These reports suggest that in persons with schizophrenia an altered reactivity of PAF receptor to its agonist may be associated with hypersensitivity of platelet receptor to glutamate and require further confirmation. Some authors' reports suggest an increased level of endogenous PAF in patients with schizophrenia<sup>(18,19)</sup>, with might also contribute to explain a worse function of PAF receptor by its desensitization. PAF is a well known proinflammatory factor, therefore hypotheses suggesting its role in the pathogenesis of schizophrenia correspond well with autoimmune theory of this disease and sometimes noticed activation of inflammatory response<sup>(44)</sup>. Finally, activation of platelet NMDA receptors results ultimately in several alterations leading to increased level of cyclic adenosine-monophosphate (cAMP), and thus is associated with inhibition of platelet activation<sup>(43,45)</sup>. Relative paucity of ROS generation upon PAF stimulation in patients with schizophrenia than in healthy people, with concomitant significantly greater generation of ROS by unstimulated platelets explain, to a certain degree, other authors' results reported above, but the precise mechanism of these alterations requires further studies. We may assume,



dogennego PAF w schizofrenii i/lub zmienioną reaktywnością płytkowego receptora PAF i /lub receptora NMDA. Berk i Plein wykazali, że płytki krwi u osób chorych na schizofrenię mają obniżony poziom wapnia, a ich odpowiedź na działanie glutaminianu jest wzmożona<sup>(21,22)</sup>. Z kolei Teather i wsp. udowodnili, że PAF może stymulować aktywację mózgowego receptora NMDA w wyniku wcześniejszego uwalniania glutaminianu<sup>(14)</sup>. Te doniesienia sugerują, że u osób ze schizofrenią zmieniona reaktywność receptora PAF na jego agonistę może być związana z nadwrażliwością płytkowego receptora dla glutaminianu i wymagają dalszego potwierdzenia. Prace niektórych autorów, sugerujące wzrost stężenia endogennego PAF u osób ze schizofrenią<sup>(18,19)</sup>, również mogłyby odgrywać rolę w wytłumaczeniu osłabienia funkcji receptora PAF poprzez jego desensytyzację. PAF jest znanym czynnikiem działającym prozapalnie, w związku z tym hipotezy dotyczące jego udziału w patogenezie schizofrenii dobrze korespondują z autoimmunizacyjną koncepcją tej choroby i stwierdzanym niekiedy pobudzeniem odpowiedzi zapalnej<sup>(44)</sup>. Wreszcie pobudzenie płytkowych receptorów NMDA powoduje w konsekwencji wiele zmian prowadzących do wzrostu cyklicznego adenozymonofosforanu (cAMP), a więc wiąże się z hamowaniem aktywacji płytki<sup>(43,45)</sup>. Stwierdzone u chorych na schizofrenię relatywnie mniejsze niż u osób zdrowych generowanie ROS po stymulacji PAF, przy jednocześnie istotnie większym generowaniu ROS przez płytki niestymulowane, tłumaczą w pewnym stopniu cytowane wyżej wyniki badań innych autorów, ale mechanizm tych zmian wymaga dalszych badań. Można przypuszczać, że zmiany w reaktywności płytek krwi u osób chorych na schizofrenię w odpowiedzi na stymulację PAF mogą wynikać nie tylko ze zmian w aktywności płytkowych receptorów PAF i NMDA, ale również z zaburzenia aktywacji płytek krwi powstającej na skutek wtórnych przemian związanych ze stresem oksydacyjnym.

### WNIOSKI

1. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że płytki krwi osób chorych na schizofrenię z objawami pozytywnymi generują istotnie więcej reaktywnych form tlenu niż płytki osób zdrowych. W płytkach krwi tych osób występuje również istotnie wyższe stężenie związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w porównaniu z osobami zdrowymi.
2. Zwiększone generowanie reaktywnych form tlenu i istotnie wyższe stężenie TBARS w płytkach krwi osób chorych na schizofrenię, w okresie zaostrzenia objawów psychotycznych, wskazuje na występowanie u tych osób stresu oksydacyjnego.
3. Reaktywność płytek krwi osób chorych na schizofrenię, z pozytywnymi objawami tej choroby, po stymulacji PAF, istotnie różni się od reaktywności płytek krwi osób zdrowych. Płytki krwi osób chorych

that altered reactivity of blood platelets in patients with schizophrenia in response to PAF stimulation may be caused not only by a modified activity of platelet PAF and NMDA receptors, but also by a disturbed activation of platelets due to secondary lesions associated with oxidative stress.

### CONCLUSIONS

1. This study revealed, that blood platelets of persons with positive symptom schizophrenia generate significantly more reactive oxygen species than platelets of healthy persons. Platelets of persons with schizophrenia feature a significantly higher level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as compared with healthy controls.
2. Enhanced production of reactive oxygen species and a significantly higher TBARS level in platelets of patients with schizophrenia in psychotic symptom exacerbation phase, indicates the existence of severe oxidative stress in these persons.
3. Upon stimulation with PAF, reactivity of blood platelets of persons with positive symptom schizophrenia differs significantly from reactivity of platelets of healthy persons. Upon PAF stimulation, blood platelets of persons with schizophrenia generate four-fold less ROS (as compared with baseline values of non-stimulated platelets) than platelets of healthy persons.
4. Decreased reactivity of blood platelets in patients with schizophrenia after PAF stimulation, as expressed by lower production of ROS, may be due to both altered activity of platelet PAF receptor (desensitization) and/or NMDA receptor (stimulation), or to disturbed activation of blood platelets, resulting of secondary biochemical events associated with oxidative stress.
5. Causes of altered response of blood platelets in persons with schizophrenia and probably associated therewith change of function of some platelet receptors require further studies.

### PIŚMIENNICTWO:

1. Horrobin D.F., Glen A.I., Vaddadi K.S.: The membrane hypothesis of schizophrenia. *Schizophr. Res.* 1994; 13: 195-207.
2. Horrobin D.F., Manku M.S., Hillman H. i wsp.: Fatty acid levels in the brains of schizophrenics and normal controls. *Biol. Psychiatry* 1991; 30: 795-805.
3. Yao J.K., Reddy R.D., Kammen D.P.: Oxidative damage and schizophrenia. *CNS Drugs* 2001; 15: 287-310.
4. Delanty N., Dichter M.A.: Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol. Scand.* 1998; 98: 145-153.
5. Aihara M., Ishii S., Kume K., Shimizu T.: Interaction between neurone and microglia mediated by platelet-activating factor. *Gen. Cells* 2000; 5: 397-406.

- na schizofrenię po stymulacji PAF generują czterokrotnie mniej ROS (w odniesieniu do wartości kontrolnych – płytek niestymulowanych) niż płytki krwi osób zdrowych.
4. Zmniejszona reaktywność płytek krwi u osób chorych na schizofrenię, występująca po stymulacji PAF, wyrażona mniejszym generowaniem ROS, może wynikać zarówno ze zmian aktywności płytkowego receptora PAF (desensytyzacja), jak i/lub receptora NMDA (pobudzenie) oraz zaburzeń aktywacji płytek krwi, powstających na skutek wtórnych reakcji biochemicznych związanych ze stresem oksydacyjnym.
  5. Przyczyny zmienionej reaktywności płytek krwi u osób chorych na schizofrenię i związane z nimi prawdopodobnie zmiany funkcji niektórych receptorów płytkowych wymagają dalszych badań.
- 
6. Carlsson A., Hansson L.O., Waters N., Carlsson M.: Neurotransmitter aberrations in schizophrenia new perspectives and therapeutic implications. *Life Sci.* 1997; 61: 75-94.
  7. Farooqui A.A., Horrocks L.A., Farooqui T.: Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem. Phys. Lipids* 2000; 106: 1-29.
  8. Tsai G., Passani L.A., Slusher B.S. i wsp.: Abnormal excitatory neurotransmitter metabolism in schizophrenic brains. *Arch. Gen. Psychiatry* 1995; 52: 829-836.
  9. Olney J.E., Farber N.B.: Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 1995; 52: 998-1007.
  10. Nguimfack Mbodie P.C.: Do the glutamate excitotoxicity theory and potential free radicals implication in schizophrenia aetiopathogenesis provide a new enlightenment to links between: genome, environment and biology in the determinism of that disorder? *Encephale* 2002; 28: 147-153.
  11. Marcheselli V.L., Bazan N.G.: Platelet-activating factor (PAF) enhances glutamic acid release in the retina through a presynaptic receptor. *Invest. Vis. Science* 1993; supl. 34: 1049.
  12. Montague P.R.: The resource consumption principle: Attention and memory in volumes of neural tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 3619-3623.
  13. Bredt D.S., Mourey R.J., Snyder S.H.: A simple, sensitive, and specific radioreceptor assay for inositol 1,4,5-trisphosphate in biological tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 159: 976-982.
  14. Teather L.A., Packard M.G., Bazan N.G.: Differential interaction of platelets -activating factor and NMDA receptor function in hippocampal and dorsal striatal memory processes. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2001; 75: 310-324.
  15. Tabuchi S., Kume K., Aihara M. i wsp.: Lipid mediators modulate NMDA receptor currents in a *Xenopus* oocyte expression system. *Neurosci. Lett.* 1997; 237: 13-16.
  16. Chao W., Olson M.S.: Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem. J.* 1993; 292: 617-629.
  17. Stafforini D.M., Prescott S.M., Zimmerman G.A., McIntyre T.M.: PAF acetylhydrolase in human tissues and blood cells. *Lipids* 1991; 26: 979-985.
  18. Ohtsuka T., Watanabe H., Toru M., Arinami T.: Lack of evidence for associations between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency and schizophrenia. *Psych. Res.* 2002; 109: 93-96.
  19. Bell R., Collier D.A., Rice S.O. i wsp.: Systematic screening of the LDL-PLA2 gene for polymorphic variants and case-control analysis in schizophrenia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 241: 630-635.
  20. Bussolino F., Soldi R., Arese M. i wsp.: Multiple roles of platelet-activating factor in the nervous system. *Neurochem. Int.* 1995; 26: 425-433.
  21. Berk M., Plein H., Belsham B.: The specificity of platelet glutamate receptor supersensitivity in psychotic disorders. *Life Sci.* 2000; 66: 2427-2432.
  22. Berk M., Plein H., Csizmadia T.: Supersensitive platelet glutamate receptors as a possible peripheral marker in schizophrenia. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 1999; 14: 119-122.
  23. Sheehan D.V., Lecrubier Y., Sheehan K.H. i wsp.: The Mini-International Neuropsychiatric Interview (MINI): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J. Clin. Psychiatry* 1998; 59 (supl. 20): 22-33.
  24. Walkowiak B., Michalak E., Koziółkiewicz W., Cierniewski C.S.: Rapid photometric method for estimation of platelet count in blood plasma or platelet suspension. *Thromb. Res.* 1989; 56: 763-766.
  25. Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.: *Techniques in Free Radical Research*. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo 1991.
  26. Wachowicz B.: Adenine nucleotides in thrombocytes of birds. *Cell. Biochem. Function* 1984; 2: 167-170.
  27. Król W., Czuba Z., Scheller S. i wsp.: Antioxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. *Biochem. Int.* 1990; 21: 593-597.
  28. Plein H., Berk M.: The platelet as a peripheral marker in psychiatric illness. *Hum. Psychopharmacol.* 2000; 16: 229-236.
  29. Dreux C., Launay J.M.: Blood platelets: neuronal model in psychiatric disorders. *Encephale* 1985; 11: 57-64.
  30. Wirz-Justice A.: Platelet research in psychiatry. *Experientia* 1988; 44: 145-152.
  31. Stahl S.M.: The human platelet. A diagnostic and research tool for the study of biogenic amines in psychiatric and neurologic disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 1977; 34: 509-516.
  32. Horrobin D.F.: Schizophrenia as a membrane lipid disorder which is expressed throughout the body. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 1996; 55: 3-7.
  33. Janero D.R.: Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* 1990; 9: 515-540.
  34. Bartosz G.: *Peroksydacja lipidów*. W: Bartosz G.: *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. PWN, Warszawa 2003: 99-109.
  35. Mahadik S.P., Mukherjee S., Scheffer R. i wsp.: Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis. *Biol. Psychiatry* 1998; 43: 674-679.
  36. Dietrich-Muszalska A., Olas B., Rabe-Jabłońska J.: Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. *Platelets* 2005; 16: 386-391.
  37. Mahadik S.P., Mukherjee S., Correnti E.E. i wsp.: Plasma membrane phospholipid and cholesterol distribution of skin fibroblasts from drug-naive patients at the onset of psychosis. *Schizophr. Res.* 1994; 13: 239-247.
  38. Pall H.S., Williams A.C., Blake D.R., Lunec J.: Evidence of enhanced lipid peroxidation in the cerebrospinal fluid of patients taking phenothiazines. *Lancet* 1987; 2: 596-599.
  39. Peet M., Laugharne J., Rangarajan N., Reynolds G.P.: Tardive dyskinesia, lipid peroxidation, and sustained amelio-

- ration with vitamin E treatment. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 1993; 8: 151-153.
40. Wachowicz B., Olas B., Żbikowska H.M., Buczyński A.: Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets* 2002; 13: 175-182.
41. Olas B., Wachowicz B.: Rola reaktywnych form tlenu w płytkach krwi. *Post. Biol. Kom.* 2003; 2: 325-337.
42. Iuliano L., Colavita A.R., Leo R. i wsp.: Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 22: 999-1006.
43. Clemetson K.J.: Platelet receptors. W: Michelson A.D.: *Platelets. Acad. Press.* 2002: 65-80.
44. Maes M.: Cytokines in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 1996; 40: 1294-1297.
45. Franconi F., Miceli M., Alberti L. i wsp.: Further insights into the anti-aggregating activity of NMDA in human platelets. *J. Pharmacol.* 1998; 124: 35-40.

## Szanowni Autorzy!

Uprzejmie przypominamy, że zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dn. 2 października 2004 roku w sprawie sposobów dopełnienia obowiązku doskonalenia zawodowego lekarzy i lekarzy dentyistów publikacja artykułu w czasopiśmie „PSYCHIATRIA I PSYCHOLOGIA KLINICZNA” – indeksowanym w Index Copernicus – umożliwi doliczenie 20 punktów edukacyjnych za każdy artykuł do ewidencji doskonalenia zawodowego.

Podstawą weryfikacji jest notka bibliograficzna z artykułu.