

Praca oryginalna Original paper

OLIWIA GAWLIK¹, WOJCIECH MIELICKI², JOLANTA RABE-JABŁOŃSKA¹

Wpływ litu na równowagę pro- i antyoksydacyjną *in vitro*

The effect of lithium on oxidant-antioxidant balance in vitro

¹ Klinika Zaburzeń Afektywnych i Psychotycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

² Zakład Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

STRESZCZENIE

Wstęp: Mechanizm działań terapeutycznych litu wciąż nie został w pełni poznany. Proponowane hipotezy obejmują: modulację transportu i działania neuroprzebieżników, oddziaływanie na układy drugich i kolejnych wewnątrzkomórkowych przebieżników, regulację ekspresji genów oraz efekty neuroprotektyjne i antyoksydacyjne.

Stres oksydacyjny to stan zaburzonej równowagi między procesami prooksydacyjnymi i obroną antyoksydacyjną. Prawdopodobnie odgrywa on istotną rolę w patofizjologii i przebiegu choroby afektywnej dwubiegunowej.

Cel: Celem badania była ocena wpływu litu na parametry stresu oksydacyjnego w osoczu ludzkim (*in vitro*).

Materiał i metody: Badanymi parametrami stresu oksydacyjnego były: peroksydacja lipidów i całkowity potencjał antyoksydacyjny. Peroksydację lipidów oceniano poprzez pomiar stężenia związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) (metodą Rice-Evans). Całkowity potencjał antyoksydacyjny mierzono jako zdolność neutralizacji wolnego kationorodnika ABTS^{•+} (metoda Re). Próbkę osocza od zdrowych ochotników były inkubowane ze stężeniami litu korespondującymi ze stężeniami stosowanymi w profilaktyce epizodów i leczeniu choroby afektywnej dwubiegunowej. Próbkę kontrolną przygotowano bez leku.

Wyniki: Wykazano, iż w wyniku inkubacji osocza z litem nie doszło do statystycznie znamiennych zmian w poziomie TBARS ani całkowitego potencjału antyoksydacyjnego.

Wnioski: Badanie nie dowiodło, aby lit powodował istotne zmiany parametrów stresu oksydacyjnego w osoczu ludzkim *in vitro*. Wyniki te wskazują na potrzebę prowadzenia dalszych badań na tym polu, np. *in vivo* na populacji chorych.

SUMMARY

Introduction: Mechanism of therapeutic action of lithium has not been fully understood. Proposed hypotheses include: neurotransmitters transport and signalling modulation, interference with the secondary and other intracellular messenger systems, regulation of gene expression and finally many neuroprotection and antioxidant effects.

Oxidative stress is a state of imbalance between oxidant processes and antioxidant defence. It probably plays important role in the pathophysiology and the course of bipolar disorder.

Aim: The aim of this research was to estimate the lithium's influence on oxidative stress parameters in human plasma (*in vitro*).

Material and methods: Evaluated oxidative stress parameters were: lipid peroxidation and total antioxidant capacity. Lipids peroxidation was measured by the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (the method of Rice-Evans). Measurement of total antioxidant capacity was done as a decolorization assay with the pre-formed radical monocation ABTS^{•+} (the method of Re).

Plasma samples from healthy volunteers were incubated with lithium concentrations corresponding to concentrations used in the prophylaxis and treatment of bipolar disorder. The control plasma samples were prepared without the drug.

Results: It was shown that incubation of plasma with lithium did not cause statistically significant changes of TBARS levels nor total antioxidant status.

Conclusions: The study showed that lithium did not induce any significant changes of oxidative stress parameters in human plasma *in vitro*. The results indicate the necessity for further researches in the field *in vivo* in patients.

Słowa kluczowe: lit, stres oksydacyjny, peroksydacja lipidów, choroba afektywna dwubiegunowa

Key words: lithium, oxidative stress, lipid peroxidation, bipolar disorder

WSTĘP

Sole litu to jeden z najstarszych obecnie dostępnych leków psychotropowych, jednak za doświadczeniami w stosowaniu litu nie idzie pełna znajomość mechanizmów jego działania (Lenox i Frazer, 2002; McIntyre i wsp., 2001; Young i Hammond, 2007). Pierwsze koncepcje dotyczące tych mechanizmów w o.u.n. wynikały z budowy chemicznej litu i dotyczyły wpływu litu na transport jonów przez błonę komórkową oraz regulowanie aktywności błonowej ATP-azy sodowo-potasowej (Huang i wsp., 2007; Layden i wsp., 2000). Z kolei, zgodnie z koncepcjami neuroprzekąźnikowymi chorób afektywnych, lit miałby pobudzać układ serotoninergiczny oraz wpływać regulująco na obrót dopaminy (Gould i wsp., 2004; Jefferson i Greist, 2006; Jope, 1999; Montezinho, 2006). Obecnie wydaje się jednak, iż najważniejszymi mechanizmami działania terapeutycznego litu są efekty wywierane na przekąźnictwo wewnątrzkomórkowe (Brandish i wsp., 2005; Chang i wsp., 1999; Coyle i Manji, 2002; Devaki, 2006; Gill, 2005; Rosach, 2002; Schlecker, 2006; Shaldubina i wsp., 2001), a w szczególności na układy wtórnych przekąźników cyklicznej adenylozylowej oraz fosfatydyloinozytolu (PI) i system białka G, czy kinazy białkowej C (PKC).

Uważa się także, że możliwe jest działanie litu na poziomie genetyczno-molekularnym, m.in. poprzez nasilenie przez jony litu wiązania białka aktywującego-1 (AP-1), jednego z najważniejszych czynników transkrypcyjnych, do miejsca jego wiązania z DNA (Brandish i wsp., 2005). Wykazano również wpływ jonów litu na selektywną ekspresję poszczególnych podjednostek białek G oraz izoenzymów S-transferazy glutationowej, a także genów dla innych białek zmienionych w przebiegu choroby afektywnej dwubiegunowej – ChAD (Lenox i Wang, 2003). Lit reguluje także długość życia komórek na poziomie DNA, modulując metylację histonów i strukturę chromatyny (McCull i wsp., 2008).

Poza wymienionymi mechanizmami rozważane są wciąż inne możliwości działania terapeutycznego litu w o.u.n., m.in. wydłużanie długości cyklu biologicznego (Yin, 2006), wpływ na neuronalną syntezę tlenku azotu (Ghasemi, 2008) lub przeciwdziałanie apoptozie poprzez wzrost stężenia jonów wapnia (Kang, 2003), a także modyfikowanie przez jony litu funkcji szkieletu komórki nerwowej.

Ostatnie lata to okres pojawiania się wyników badań wskazujących na działanie litu ochraniające komórki, gł. nerwowe (Cui i wsp., 2007; Daneshmand, 2009):

- zwiększenie ekspresji w o.u.n. czynników neuroprotekcyjnych:
 - właściwego białka bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2),
 - czynnika BAG-1,
 - BDNF (neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego) i jego receptora;
- oraz zmniejszenie ekspresji proapoptotycznych białek p53 i bax.
- hamowanie aktywności kinazy syntetazy glikogenu (GSK-3 β) – chroni to komórki m.in. przed mitochondrialną aktywnością pro oksydacyjną (King i Jope, 2005);
- hamowanie szlaku apoptotycznego kaspazy-3 (Li i El-Mallakh, 2000);
- promowanie neurogenezy w o.u.n. – obserwowano m.in. stymulację neurogenezy u zwierząt laboratoryjnych, a także wzrost objętości istoty szarej u osób długotrwale przyjmujących sole litu (Lai i wsp., 2006; Pardo i wsp., 2003; Philips i wsp., 2008; Sassi, 2002);
- działanie antagonistyczne względem neuronalnych receptorów NMDA.

Ostatnie badania wskazują, iż lit może również przeciwdziałać stresowi oksydacyjnemu, czyli stanowi zaburzenia równowagi między procesami prooksydacyjnymi i obroną antyoksydacyjną i pełniącemu prawdopodobnie istotną rolę w patogenezie i przebiegu ChAD (Machado-Vieira i wsp., 2007). Problem ten będzie szczegółowo omówiony w dalszej części pracy. Możliwość przeciwdziałania przez lit skutkom stresu oksydacyjnego wzbudza liczne kontrowersje, istnieją prace, wykazujące działanie antyoksydacyjne litu i nie potwierdzające takiego działania. Ponadto niewyjaśnione pozostają m.in. warunki, w których jony litu miałyby działać antyoksydacyjnie oraz potencjalny mechanizm tych działań.

CEL

Celem badania była ocena czy związki litu zmieniają parametry stresu oksydacyjnego w osoczu ludzkim w doświadczeniu przeprowadzonym w warunkach *in vitro*.

MATERIAŁ I METODY

Próbki krwi pobrano od pięćdziesięciu ośmiu zdrowych ochotników w wieku 20-40 lat. Na podstawie opracowanych kryteriów włączenia (Kwestionariusz dla Zdrowego Ochotnika) do badania zakwalifikowa-

no osoby bez chorób psychicznych czy somatycznych, urazów głowy, alergii, zaburzeń metabolizmu tłuszczów czy węglowodanów, z prawidłową masą ciała, nieleczone farmakologicznie, niepalące, nie używające substancji psychoaktywnych ani suplementacji antyoksydacyjnej, stosujące zrównoważoną dietę i żyjące w porównywalnych warunkach socjoekonomicznych. Ochotnicy zostali zakwalifikowani po podpisaniu zgody na udział w badaniu, zgodnie z protokołem zatwierdzonym przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (numer RNN/13/08/KE). Do oceny stanu zdrowia psychicznego ochotników zastosowano polską adaptację kwestionariusza diagnostycznego M.I.N.I. (*Mini International Neuropsychiatric Interview*).

Materiał badawczy stanowiło świeże osocze ubogopłytkowe wyizolowane z krwi (20ml) pobranej na EDTA. Krew wirowano w temperaturze 4°C przez 30 min przy 10000 obr./min w wirówce SIGMA 3K30.

Do 0,5 ml osocza ubogopłytkowego dodawano kolejno substancję czynną (Lithium Carbonicum, Sigma-Aldrich) rozpuszczoną w wodzie tak, by uzyskać stężenia końcowe jonów litu, korespondujące ze stężeniami stosowanymi w profilaktyce epizodów i leczeniu ChAD (odpowiednio 0,67 mmol/l oraz 1,00 mmol/l). Próby inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C.

Do każdej próby wykonano kontrolę – osocze z rozpuszczalnikiem, bez leku.

Po 24-godzinnej inkubacji we wszystkich próbkach oznaczano poziom peroksydacji lipidów oraz całkowity potencjał antyoksydacyjny.

Peroksydację lipidów oznaczono za pomocą metody Rice-Evans (1991) jako ilość związków reagujących z kwasem barbiturowym (TBARs). Do 0,5 ml osocza dodawano kolejno 0,5 ml 0,37% kwasu tiobarbiturowego (TBA) w 0,25 M HCl oraz 0,5 ml 15% kwasu trichlorooctowego (TCA) w 0,25 M HCl. Próby mieszano i ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej przez 10 minut. Następnie próbki odwirowywano (15 minut, 13400 obr./min) w celu otrzymania supernatantu, którego absorbancję mierzono przy długości fali 535 nm (Specol, kuweta PCV 1cm). Poziom TBARs wyliczano z krzywej standardowej wyznaczonej w identycznych warunkach przy użyciu standardu MDA (Sigma-Aldrich).

Do oceny całkowitego potencjału antyoksydacyjnego zastosowano metodę kolorymetryczną Re i wsp. (1999) – pomiar zdolności antyoksydantów zawartych w próbce do redukcji kationorodnika ABTS^{•+} (kwas 2,2-azydo-bis 3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy). ABTS^{•+} o stabilnej fioletowej barwie otrzymywano poprzez reakcję ABTS z nadsiarczanem pota-

su i inkubację roztworu przez 24 godziny w ciemni w temperaturze pokojowej. Do oznaczeń używano roztworu kationorodnika rozcieńczonego buforem PBS do wartości absorbancji 0,7 przy długości fali 734nm (Specol, kuweta PCV 1cm). Potencjał antyoksydacyjny oznaczano poprzez spektrofotometryczną ocenę zmiany intensywności zabarwienia po dodaniu do 1ml roztworu ABTS^{•+} 10 μ l badanego osocza i odczytanie wartości po 1 minucie. Potencjał antyoksydacyjny wyrażano w mmol/l. Wartość tą wyliczano z krzywej standardowej wyznaczonej w identycznych warunkach przy użyciu Troloxu (syntetycznego analogu tokoferolu, Sigma-Aldrich).

Oznaczenia powtarzano trzykrotnie.

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy użyciu pakietu SigmaPlot. Wyliczono średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe. Poziom istotności różnic pomiędzy stężeniami TBARs oraz wartościami TAC próbek badanych i kontrolnych oraz próbek ze stężeniem terapeutycznym i profilaktycznym litu obliczono za pomocą sparowanego testu t-Studenta.

WYNIKI

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń (jako średnie arytmetyczne z trzech pomiarów) zebrano w tabelach. Tabela 1. pokazuje stężenie TBARs (w μ molach/l) w inkubowanych próbkach, z kolei w tabeli 2. umieszczono rezultaty pomiaru TAC jako ekwiwalenty jednostek Troloxu wyrażone w mmolach/l.

Po przeprowadzeniu analiz statystycznych, nie stwierdzono istotnych różnic ($p > 0,05$) w stężeniu związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARs) pomiędzy osoczem kontrolnym a osoczem inkubowanym z węglanem litu, zarówno przy stężeniu profilaktycznym jak i terapeutycznym litu. Nie wykazano także takich różnic między próbkami z różnymi stężeniami litu (rycina 1.).

Inkubacja próbek z węglanem litu nie wpłynęła także w sposób istotny na wartość całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza – brak znamienności statystycznej ($p > 0,05$) różnic w poziomie TAC zarówno między kontrolą i osoczem po inkubacji z różnymi stężeniami litu, jak i między próbkami osocza ze stężeniem profilaktycznym i terapeutycznym leku (rycina 2.).

Tabela 1. Peroksydacja lipidów jako stężenie związków reagujących z kwasem barbiturowym w $\mu\text{molach/l}$

l.p.	A [μM]	B [μM]	C [μM]	l.p.	A [μM]	B [μM]	C [μM]
1	1,18	1,24	1,23	30	0,76	0,72	0,66
2	0,97	0,91	0,97	31	0,86	0,71	0,79
3	0,69	0,67	0,7	32	0,67	0,61	0,61
4	0,43	0,42	0,44	33	0,69	0,78	0,58
5	1,04	0,94	0,83	34	0,88	0,89	0,84
6	0,59	0,62	0,61	35	0,63	0,49	0,44
7	0,88	0,91	0,83	36	0,93	1,01	0,85
8	1,06	1,16	1,09	37	0,6	0,66	0,65
9	0,38	0,41	0,38	38	0,84	0,8	0,76
10	0,53	0,48	0,47	39	0,52	0,44	0,38
11	0,59	0,57	0,6	40	0,61	0,6	0,58
12	0,5	0,49	0,51	41	0,81	0,75	0,62
13	0,71	0,67	0,72	42	0,6	0,64	0,6
14	0,44	0,47	0,46	43	0,68	0,76	0,69
15	0,6	0,66	0,63	44	0,82	0,78	0,74
16	0,51	0,5	0,51	45	0,6	0,61	0,56
17	0,68	0,62	0,72	46	0,68	0,69	0,74
18	0,84	0,76	0,85	47	0,5	0,53	0,59
19	0,42	0,56	0,39	48	0,78	0,9	0,8
20	0,45	0,52	0,44	49	0,92	0,92	0,89
21	0,54	0,6	0,54	50	0,97	1,08	1,06
22	0,56	0,6	0,59	51	1,24	1,31	1,37
23	0,63	0,66	0,65	52	0,99	0,96	0,93
24	0,94	1,01	0,99	53	0,77	0,84	0,92
25	0,95	0,96	0,98	54	0,81	0,78	0,81
26	0,77	0,76	0,72	55	0,87	0,85	0,93
27	0,9	0,88	0,86	56	1,07	1,19	1,31
28	0,99	1,11	1,16	57	0,9	0,91	0,95
29	0,91	1,04	1,04	58	0,94	0,95	1,01
				Średnia	0,75±0,20	0,76±0,22	0,75±0,24

W tabeli przedstawiono średnią arytmetyczną z trzech pomiarów dla każdej próby. Obliczono średnią dla wszystkich prób oraz odchylenie standardowe.

A – kontrola, B – lit 0,67 mmol/l, C – lit 1,00 mmol/l

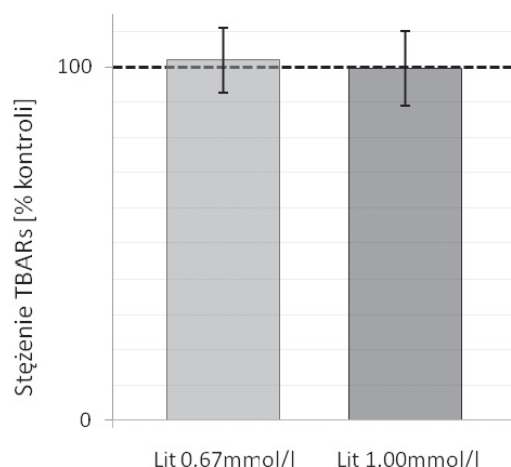
Tabela 2. Całkowity potencjał antyoksydacyjny wyrażony w jednostkach Troloxu (TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) w mmolach/l

l.p.	A [mM]	B [mM]	C [mM]	l.p.	A [mM]	B [mM]	C [mM]
1	1,22	1,16	1,13	30	1,35	1,32	1,33
2	1,11	1,09	1,09	31	1,25	1,23	1,26
3	1,02	1,14	1,15	32	1,35	1,36	1,35
4	1,1	1,12	1,1	33	1,39	1,42	1,43
5	1,07	1,12	1,09	34	1,45	1,47	1,38
6	1,2	1,22	1,2	35	1,21	1,2	1,23
7	1,25	1,23	1,21	36	1,26	1,28	1,26
8	1,18	1,15	1,12	37	1,26	1,29	1,29
9	1,2	1,18	1,18	38	1,21	1,22	1,23
10	1,12	1,15	1,14	39	1,28	1,27	1,28
11	1,21	1,19	1,17	40	1,34	1,34	1,36
12	1,31	1,26	1,3	41	1,05	1,03	1,05
13	1,14	1,16	1,17	42	1,11	1,05	1,06
14	1,32	1,37	1,33	43	1,07	1,11	1,11
15	1,43	1,43	1,44	44	1,13	1,11	1,1
16	1,37	1,35	1,37	45	1,27	1,32	1,34
17	1,43	1,42	1,46	46	1,23	1,23	1,23
18	1,29	1,27	1,31	47	1,12	1,25	1,2
19	1,23	1,33	1,37	48	1,22	1,23	1,2
20	1,23	1,34	1,34	49	1,23	1,23	1,21
21	1,29	1,29	1,29	50	1,47	1,44	1,5
22	1,32	1,34	1,3	51	1,43	1,41	1,39
23	1,39	1,32	1,33	52	1,56	1,52	1,54
24	1,36	1,32	1,25	53	1,52	1,5	1,49
25	1,3	1,36	1,34	54	1,46	1,46	1,48
26	1,36	1,38	1,37	55	1,49	1,46	1,47
27	1,46	1,47	1,5	56	1,57	1,54	1,51
28	1,35	1,48	1,44	57	1,37	1,41	1,39
29	1,39	1,37	1,4	58	1,29	1,33	1,32
				Średnia	1,29±0,13	1,29±0,13	1,29±0,13

W tabeli przedstawiono średnią arytmetyczną z trzech pomiarów dla każdej próby. Obliczono średnią dla wszystkich prób oraz odchylenie standardowe.

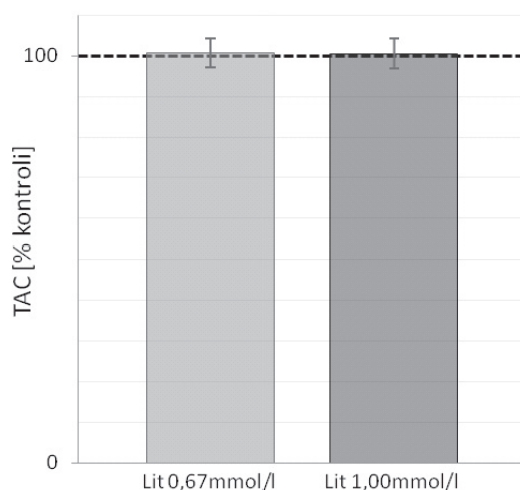
A – kontrola, B – lit 0,67 mmol/l, C – lit 1,00 mmol/l

Rycina 1. Porównanie wpływu litu w stężeniu profilaktycznym i terapeutycznym na poziom TBARs w osoczu ludzkim *in vitro*



Wyniki wyrażono procentowo, przy czym kontrola stanowi 100%.

Rycina 2. Porównanie wpływu litu w stężeniu profilaktycznym i terapeutycznym na wartość TAC w osoczu ludzkim *in vitro*



Wyniki wyrażono procentowo, przy czym kontrola stanowi 100%.

DYSKUSJA

O ile działania neuroprotekcjne wywierane przez lit są stosunkowo dobrze udokumentowane (Cui i wsp., 2007; Ferrari i wsp., 2003; Kang i wsp., 2003; Leng i wsp., 2008; Li i wsp., 2000; McColl i wsp., 2008; Nunes i wsp., 2007; Phillips i wsp., 2008; Rybakowski, 2006, 2005; Sassi, 2002), to dotychczas przeprowadzono jedynie nieliczne badania nad wpływem litu na parametry stresu oksydacyjnego, a wyniki opublikowanych badań pozostają niejednoznaczne.

W doświadczeniach prowadzonych w hodowlach linii komórkowych oraz na zwierzętach uzyskiwano niejednokrotnie sprzeczne dane.

Shao i wsp. (2005) w badaniu na kulturach komórek nerwowych kory mózgowej szczurów hodowa-

nych w warunkach toksyczności wywołanej glutamianem wykazali, iż przewlekłe stosowanie związków litu zapobiega peroksydacji lipidów błonowych, białek oraz fragmentacji DNA i śmierci komórek. W badaniu tym zespół używał stężeń litu osiągniętych w terapii ChAD. Grupa pod kierownictwem tego samego badacza w 2008 roku uzyskała wyniki świadczące, iż podłożem tego działania litu jest aktywizacja wytwarzania izoenzymów S-transferazy glutationowej na poziomie mRNA. Częściowo w zgodzie z powyższymi wynikami pozostają badania autorstwa Lai i wsp. (2006), przeprowadzone na ludzkich komórkach nerwiaka rozwojowego SH-SY5Y oraz glejaków (SVG i U87). Rezultaty tych badań ujawniły działania litu (1mM), chroniące komórki przed śmiercią wywołaną czynnikami oksydacyjnymi, lecz ochrona ta dotyczyła

jedynie komórek neuroblastoma, które pozostawały w środowisku jonów litu przez siedem dni przed działaniem stresora. Dodatkowo autorzy działanie to uznali za niezależne od hamowania przez lit aktywności GSK-3. Podobnie Allagui i wsp. (2009), także pracując na komórkach SH-SY5Y, wykazali protekcyjne działanie litu (w stężeniu 0,5mM i po sześciomiesięcznym okresie inkubacji), polegające na niższym w stosunku do kontroli poziomie peroksydacji lipidów oraz zwiększeniu przeżywalności komórek w warunkach stresu oksydacyjnego. Jednak odwrotny skutek badacze ci zaobserwowali przy stężeniach litu rzędu 6-8mM, które po okresie 4 dni powodowały działania prooksydacyjne i zwiększenie śmiertelności komórek w hodowli.

Kiełczykowska i wsp. (2006) w ośmiotygodniowym badaniu na szczurach nie wykazali jednak, aby lit (w szerokim zakresie stężeń) zmieniał parametry stresu oksydacyjnego we krwi obwodowej. Peroksydacja lipidów nie była zmieniona także w tkankach, a jedynym wyjątkiem była tkanka mózgowa, w której lit istotnie statystycznie zmniejszał ten parametr. W badaniu tym odnotowano także zmniejszenie aktywności SOD (dysmutaza nadadtlenkowa) we wszystkich badanych tkankach.

Już w 1994 r. Song i wsp. opublikowali wyniki ciekawego badania aktywności enzymów antyoksydacyjnych u dwóch różnych populacji szczurów leczonych chlorkiem litu. W doświadczeniu tym kierunki zmian aktywności katalazy (CAT), SOD i peroksydazy glutationowej (GPx) były inne u szczurów w stanie fizjologicznym, a inne w zwierzęcym modelu depresji. Także z badania Frey'a i wsp. (2006) wynika, iż w niektórych strukturach mózgu (kora przedczołowa, hipokamp) lit może zapobiegać i zmniejszać peroksydację lipidów wywołaną amfetaminą w zwierzęcym modelu manii, nie zmienia natomiast stanu równowagi procesów utleniania i redukcji w warunkach fizjologicznych. Podobne wyniki uzyskali Bhalla i wsp. (2009), którzy stwierdzili, iż lit zmniejsza peroksydację lipidów i normalizuje poziom enzymów antyoksydacyjnych w różnych obszarach mózgu zwierząt poddanych prooksydacyjnemu działaniu aluminium. Suplementacja litem poprawiała też histoarchitekturę badanych okolic o.u.n. Także Jornada i wsp. (2011) oraz Castro i wsp. (2009) dowiedli zmniejszenia pod wpływem litu nasilenia wskaźników stresu oksydacyjnego w mózgach szczurów w zwierzęcych modelach manii.

Vasconcellos i wsp. (2006) ze swojego badania, przeprowadzonego na różnych strukturach mózgu szczurów poddanych przewlekłemu stresowi, wyciągnęli jednak przeciwny wniosek. Stwierdzili, że mimo, iż lit posiada właściwości antyoksydacyjne

(zwiększona całkowita reaktywność antyoksydantów w hipokampie), to są one niewystarczające aby zapobiec uszkodzeniom wywołanym przez stres oksydacyjny *in vivo*.

Z kolei Abdalla i wsp. (1994) nie dowiedli, aby lit w jakikolwiek sposób zmieniał parametry peroksydacji lipidów i obrony antyoksydacyjnej (aktywność SOD i GPx) w erytrocytach i tkance mózgowej badanych zwierząt. W ich doświadczeniu stosowano węglan litu u zdrowych szczurów dootrzewnowo przez siedem dni. Nciri i wsp. (2010) również nie zaobserwowali zmian w statusie oksydacyjnym zachodzących pod wpływem litu – w przypadku ich doświadczenia w tkankach nerek i wątroby.

Shin i wsp. (2007) wykazali, że lit mimo działań antyapoptotycznych nie łagodzi skutków stresu oksydacyjnego w mysim modelu ALS (stwardnienie zanikowe boczne) oraz zwierzęcym modelu AD (choroba Alzheimerera).

Na drugim biegunie znaleźć można wyniki badań, których autorzy dowodzą prooksydacyjnych właściwości litu. Chadha i wsp. (2008) w kilkumiesięcznej obserwacji szczurów poddanych działaniu litu odnotowali zwiększoną peroksydację lipidów oraz istotne zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych w preparatach wątroby. Na nefrotoksyczność litu, wywołaną nasileniem stresu oksydacyjnego, wskazują z kolei badania zespołów: Nciri i wsp. (2008) oraz Oktem i wsp. (2005). Innymi narządami, w których lit zwiększa peroksydację lipidów, prowadząc do uszkodzeń strukturalnych i funkcjonalnych mogą być czerwone krwinki, o czym donoszą Malhotra i wsp. (2008) oraz Engin i wsp. (2005) (zmniejszenie zdolności obrony antyoksydacyjnej wtórne do sub- lub klinicznej niedoczynności tarczycy wywołanej litoterapią), a także tkanka płuc, co zostało opisane przez grupę badawczą Sahin i wsp. (2006).

Pojedyncze badania nad wpływem litu na parametry stresu oksydacyjnego, przeprowadzone u ludzi, dotyczą pacjentów z ChAD. Machado-Vieira i wsp. (2007) wykazali, że lit redukuje zwiększoną podczas epizodów manii peroksydację lipidów oraz przywraca do normy stosunek SOD do CAT. Podobne rezultaty uzyskał Aliyazicioglu i wsp. (2007), którzy dodatkowo wykazali zwiększenie przez lit całkowitej zdolności antyoksydacyjnej u tych pacjentów.

Wydaje się, iż efekt oddziaływania litu na wskaźniki stresu oksydacyjnego zależny jest od wielu czynników; jednym z nich jest stężenie litu, prawdopodobnie także okres jego działania w układzie/organizmie. Być może jedne z kluczowych ról odgrywają również wyjściowy stan równowagi pro- i antyoksydacyjnej oraz rodzaj tkanek docelowych.

Wyniki naszych badań, prowadzone w układzie *in vitro*, nie wykazały aby lit istotnie statystycznie zmienił stężenie markerów peroksydacji lipidów (TBARs) i całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza zdrowych ochotników, co jest zgodne z częścią wyników dotychczasowych badań i wpisuje się w wysunięte powyżej hipotezy.

Podsumowując, najwięcej danych na działanie antyoksydacyjne litu pochodzi z badań na komórkach nerwowych i o.u.n. zwierząt w warunkach znacznie zaburzonej równowagi pro- i antyoksydantów (wynikowanego stresu oksydacyjnego). Nieliczne doniesienia na temat wyników badań przeprowadzonych u ludzi dotyczą pacjentów z podwyższonym wyjściowo poziomem stresu oksydacyjnego; brak jest badań randomizowanych w tej dziedzinie.

WNIOSKI

W naszym badaniu węglan litu, zarówno w stężeniu osiąganym w profilaktyce jak i terapii chorób psychicznych, nie powodował istotnych zmian w poziomie peroksydacji lipidów ani całkowitego potencjału antyoksydacyjnego w ludzkim osoczu. Do oczywistych ograniczeń tego badania należy przeprowadzenie doświadczenia poza żywym ustrojem oraz krótki czas inkubacji. Ograniczenia te dotyczą jednak większości przeprowadzonych do tej pory badań nad wpływem litu na stres oksydacyjny. W związku z powyższym konieczne są dalsze badania w tym zakresie, zarówno w warunkach zewnątrzustrojowych (hodowle linii komórkowych) jak i w organizmie żywym (zwierzęce modele manii, pacjenci leczeni litem w różnych fazach ChAD).

Ostateczne ustalenie, czy i jaki wpływ wywiera lit na peroksydację lipidów i obronę antyoksydacyjną może mieć istotne znaczenie dla lepszego zastosowania tego leku w terapii chorób psychicznych. Pełne zrozumienie mechanizmów działania tego leku, szczególnie w kontekście przeciwdziałania stresowi oksydacyjnemu, może też poszerzyć wskazania do jego zastosowania o choroby neurodegeneracyjne jak ALS czy grupa tzw. pierwotnych otepień.

Źródła finansowania

Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi: badania własne, numer 502-11-756.

PODZIĘKOWANIA

Dziękuję Panu Profesorowi Markowi Mirowskiemu z Zakładu Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za umożliwienie przeprowadzenia eksperymentów.

PIŚMIENNICTWO

1. Abdalla DSP, Bechara EJH. The effect of chlorpromazine and Li₂CO₃ on the superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities of rat brain, liver and erythrocytes. *Biochem Mol Biol Int* 1994; 34: 1085-90.
2. Aliyazicioglu R, Kural B, Colak M, Karahan SC, Ayvaz S, Deger O. Treatment with lithium, alone or in combination with olanzapine, relieves oxidative stress but increases atherogenic lipids in bipolar disorder. *Tohoku J Exp Med* 2007; 213: 79-87.
3. Allagui MS, Nciri R, Rouhaud MF, Murat JC, Feki A, Croute F i wsp. Long-term Exposure to Low Lithium Concentrations Stimulates Proliferation, Modifies Stress Protein Expression Pattern and Enhances Resistance to Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells. *Neurochem Res* 2009; 34: 453-462.
4. Bhalla P, Dhawan DK. Protective Role of Lithium in Ameliorating the Aluminium-induced Oxidative Stress and Histological Changes in Rat Brain. *Cell Mol Neurobiol* 2009; 29(4): 513-21.
5. Brandish PE, Su M, Holder DJ, Hodor P, Szumiloski J, Kleinhanz RR I wsp. Regulation of Gene Expression by Lithium and Depletion of Inositol in Slices of Adult Rat Cortex. *Neuron* 2005; 45: 861-872.
6. Castro AA, Casagrande TS, Moretti M, Constantino L, Petronilho F, Guerra GCB i wsp. Lithium attenuates behavioral and biochemical effects of neuropeptide S in mice. *Peptides* 2009; 30: 1914-192
7. Chadha VD, Bhalla P, Dhawan DK. Zinc modulates lithium-induced hepatotoxicity in rats. *Liver Int* 2008; 28(4): 558-65.
8. Chang MCJ, Bell JM, Purdon AD, Chikhale EG, Grange E. Dynamics of docosahexaenoic acid metabolism in the central nervous system: Lack of effect of chronic lithium treatment. *Neurochem Res* 1999; 24: 399-406.
9. Coyle JT, Manji HK. Getting balance: Drugs for bipolar disorder share target. *Nat med* 2002; 8: 557-558.
10. Cui J, Shao L, Young LT, Wang JF. Role of glutathione in neuroprotective effects of mood stabilizing drugs lithium and valproate. *Neuroscience* 2007; 144(4): 1447-53.
11. Daneshmand A, Rahimian R, Mohammadi H, Ejtemaee-Mehr S, Tavangar SM, Kelishomi RB i wsp. Protective Effects of Lithium on Acetic Acid-Induced Colitis in Rats. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1901-1907.
12. Devaki R. The effect of lithium on the adrenoceptor-mediated second messenger system in the rat brain. *J Psychiatry Neurosci* 2006; 31: 246-252.
13. Engin A, Altan N, Isik E. Erythrocyte glutathione levels in lithium-induced hypothyroidism. *Drugs R D* 2005; 6 (1): 35-40.
14. Ferrari GV, Chacón MA, Barría MI, Garrido JL, Godoy JA, Olivares G I wsp. Activation of Wnt signaling rescue neurodegeneration and behavioral impairments induced by β -amyloid fibrils. *Mol Psychiatry* 2003; 8: 195-208.
15. Frey BN, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bordini K I wsp. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci* 2006; 31: 326-332.

16. Ghasemi M, Sadeghipour H, Mosleh A, Sadeghipour HR, Mani AR, Dehpour AR. Nitric oxide involvement in the antidepressant-like effects of acute lithium administration in the mouse forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol* 2008; 18: 323–332.
17. Gill R. High-resolution structure of myo-inositol monophosphatase, the putative target of lithium therapy. *Acta Cryst* 2005; D61: 545–555.
18. Gould TD, Quiroz JA, Singh J, Zarate CA, Manji HK. Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: insights from the molecular and cellular actions of current mood stabilizers. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 734–55.
19. Huang X, Lei Z, El-Mallakh RS. Lithium normalizes elevated intracellular sodium. *Bipolar Disord* 2007; 9: 298–300.
20. Jefferson JW, Greist JH. Rethinking Older Psychiatric Drugs: Lithium. *Primary Psychiatry* 2006; 13(12): 47–50.
21. Jope RS. Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium. *Mol Psychiatry* 1999; 4: 117–128.
22. Jornada LK, Valvassori SS, Steckert AV, Moretti M, Mina F, Ferreira CL. Lithium and valproate modulate antioxidant enzymes and prevent ouabain-induced oxidative damage in an animal model of mania. *Journal of Psychiatric Research* 2011; 45: 162–168.
23. Kang HJ. Calcium-Dependent Prevention of Neuronal Apoptosis by Lithium Ion: Essential Role of Phosphoinositide 3-Kinase and Phospholipase C $\{\gamma\}$. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 228–234.
24. Kielczykowska M, Pasternak K, Musik I, Wrońska-Tyra J, Hordyjewska A. The Influence of Different Doses of Lithium Administered in Drinking Water on Lipid Peroxidation and the Activity of Antioxidant Enzymes in Rats. *Polish J of Environ Stud* 2006; 15: 747–751.
25. King TD, Jope RS. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 protects cells from intrinsic but not extrinsic oxidative stress. *Neuroreport* 2005; 16: 597–601.
26. Lai JS, Zhao Z, Warsh JJ, Li PP. Cytoprotection by lithium and valproate varies between cell types and cellular stresses. *Eur J Pharmacol* 2006; 539: 18–26.
27. Layden B, Diven C, Minadeo N, Bryant FB, Mota de Freitas D. Li⁺/Mg²⁺ competition at therapeutic intracellular Li⁺ levels in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Bipolar Disord* 2000; 2: 200–204.
28. Leng Y, Liang M-H, Ren M, Marinova Z, Leeds P, Chuang D-M. Synergistic Neuroprotective Effects of Lithium and Valproic Acid or Other Histone Deacetylase Inhibitors in Neurons: Roles of Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibition. *J Neurosci* 2008; 28: 2576–2588.
29. Lenox RH, Frazer A. Mechanism of action of antidepressants and mood stabilizers. W: *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. American College of Neuropsychopharmacology, 2002; 1139–1163.
30. Lenox RH, Wang L. Molecular basis of lithium action: integration of lithium-responsive signaling and gene expression networks. *Mol Psychiatry* 2003; 8: 135–144.
31. Li R, El-Mallakh RS. A novel evidence of different mechanisms of lithium and valproate neuroprotective action on human SY5Y neuroblastoma cells: Caspase-3 dependency. *Neurosci Lett* 2000; 294: 147–150.
32. Machado-Vieira R, Andreazza AC, Viale CI, Zanatto V, Cereser Jr V, da Silva Vargas R i wsp. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci Lett* 2007; 421: 33–36.
33. Malhotra A, Dhawan DK. Zinc improves antioxidative enzymes in red blood cells and hematology in lithium-treated rats. *Nutr Res* 2008; 28(1): 43–50.
34. McColl G, Killilea DW, Hubbard AE, Vantipalli MC, Melov S, Lithgow GJ. Pharmacogenetic Analysis of Lithium-induced Delayed Aging in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 2008; 283: 350–357.
35. McIntyre RS, Mancini DA, Parikh S, Kennedy SH. Lithium revisited. *Can J Psychiatry* 2001; 46: 322–327.
36. Montezinho LP. The interaction between dopamine D2-like and beta-adrenergic receptors in the prefrontal cortex is altered by mood-stabilizing agents. *J Neurochem* 2006; 96: 1336–1348.
37. Nciri R, Allagui MS, Croute F, Vincent C, Elfeki A. Effets chroniques de faibles doses de carbonate de lithium chez la souris. Relations entre statut oxydant et modifications fonctionnelles et structurales des reins et du cerveau. *C R Biologies* 2008; 331: 23–31.
38. Nciri R, Allagui MS, Vincent C, Murat JC, Croute F, El Feki A. Chronic lithium administration triggers an over-expression of GRP94 stress protein isoforms in mouse liver. *Food and Chemical Toxicology* 2010; 48: 1638–1643.
39. Nunes PV, Forlenza OV, Gattaz WF. Lithium and risk for Alzheimer's disease in elderly patients with bipolar disorder. *Br J Psychiatry* 2007; 190: 359–360.
40. Oktem F, Ozguner F, Sulak O, Olgar S, Akturk O, Yilmaz HR i wsp. Lithium-induced renal toxicity in rats: protection by a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem* 2005; 277: 109–115.
41. Pardo R, Andreolotti AG, Ramos B, Picatoste F, Claro E. Opposed effects of lithium on the MEK-ERK pathway in neural cells: inhibition in astrocytes and stimulation in neurons by GSK3 independent mechanisms. *J Neurochem* 2003; 87: 417–426.
42. Phillips ML, Travis MJ, Fagiolini A, Kupfer DJ. Medication Effects in Neuroimaging Studies of Bipolar Disorder. *Am J Psychiatry* 2008; 165: 313–320.
43. ...
44. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(9–10): 1231–7.
45. Rice-Evans CA, Diplock AT, Symons MCR. *Techniques in Free Radical Research*. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo 1991.
46. Rosack J. Lithium Begins to Reveal Its Secrets. *Psychiatric News* 2002; 37: 24.
47. Rybakowski J. Działanie neuroprotekcjne leków przeciwdepresyjnych i normotymicznych. *Neuropsychiatria i Neuropsychologia* 2006; 1: 49–55.
48. ...
49. Rybakowski J. Wpływ leków psychotropowych na plastyczność neuronalną. *Farmakoterapia w psychiatrii i neurologii* 2005; 2: 143–153.
50. Sahin O, Sulak O, Yavuz Y, Uz E, Eren I, Yilmaz HR i wsp. Lithium-induced lung toxicity in rats: the effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Pathology* 2006; 38(1): 58–62.
51. Sassi RB. Increased gray matter volume in lithium-treated bipolar disorder patients. *Neurosci Lett* 2002; 329: 243–245.
52. Schlecker C. Neuronal calcium sensor-1 enhancement of InsP₃ receptor activity is inhibited by therapeutic levels of lithium. *J Clin Invest* 2006; 116: 1668–1675.
53. Shaldubina A, Agam G, Belmaker RH. The mechanism of lithium action: state of the art, ten years later. *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat* 2001; 25: 855–866.
54. Shao L, Cui J, Young LT, Wang J-F. The effect of mood stabilizer lithium on expression and activity of glutathione s-transferase isoenzymes. *Neuroscience* 2008; 151: 518–524.
55. Shao L, Young T, Wang J-F. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biol Psychiatry* 2005; 58: 879–884.

56. Shin JH, Cho SI, Lim HR, Lee JK, Lee YA, Noh JS. Concurrent administration of Neu2000 and lithium produces marked improvement of motor neuron survival, motor function, and mortality in a mouse model of ALS. *Mol Pharmacol* 2007; 71: 965-975.
57. Song C, Killeen AA, Leonard BE. Catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in neutrophils of sham-operated and olfactory-bulbectomised rats following chronic treatment with desipramine and lithium chloride. *Neuropsychobiology* 1994; **30**: 24.
58. Vasconcellos APS, Nieto FB, Crema LM, Diehl LA, Almeida LM, Prediger ME i wsp. Chronic Lithium Treatment has Antioxidant Properties but does not Prevent Oxidative Damage Induced by Chronic Variate Stress. *Neurochem Res* 2006; 31: 1141-1151.
59. ...
60. Yin L, Wang J, Klein PS, Lazar MA. Nuclear Receptor Rev-erb{alpha} is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. *Science* 2006; 311: 1002-1005.
61. Young AH, Hammond JM. Lithium in mood disorders: increasing evidence base, declining use? *The Br J Psychiatry* 2007; 191: 474-476.

Adres korespondencyjny:

Oliwia Gawlik,

Klinika Zaburzeń Afektywnych i Psychotycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,

ul. Czechosłowacka 8/10

92-216 Łódź

tel. 042 675 73 71

faks 042 675 74 03

e-mail: oliwia.gawlik@umed.pl
